



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Aproximación funcional a *CERKL*, un gen causante de retinosis pigmentaria, mediante el estudio de la localización intracelular de la proteína y la identificación de sus “partners” proteicos y no proteicos

POGRAMA DE DOCTORADO:

Biomedicina y Biotecnología

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Alihamze Fathinajafabadi Nasresfahani

Dirigida por: Dres. Erwin Knecht y Eva Pérez-Jiménez

Tutor: Dr. Francisco Estruch Ros



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

El **Dr. Erwin Knecht Roberto**, Investigador Principal, y la **Dra. Eva Pérez-Jiménez**, investigadora, ambos del Laboratorio de Degradación Intracelular de Proteínas y Enfermedades Raras del Centro de Investigación Príncipe Felipe,

CERTIFICAN:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por D. Alihamze Fathinajafabadi Nasresfahani, titulada “Aproximación funcional a *CERKL*, un gen causante de retinosis pigmentaria, mediante el estudio de la localización intracelular de la proteína y la identificación de sus “partners” proteicos y no proteicos”, ha sido realizada bajo su dirección y reúne a su juicio todos los requisitos necesarios para su calificación,

Valencia, febrero de 2015

Dr. Erwin Knecht Roberto

Dra. Eva Pérez-Jiménez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a mis padres por dárme todo. A mis directores de tesis, Erwin y Eva por dirigirme y orientarme en el trabajo y sus enormes esfuerzos a la hora de escribir la tesis. A Carmen Aguado y Mari Paz por su ayuda en el laboratorio y en la redacción de la tesis. Gracias también a Magda y al resto de los compañeros de I- 11 y del I- 08 por sus críticas y sus ayudas en la elaboración de los experimentos. A mi hermano y a Roberto por darme ánimos y su apoyo cuando más lo necesitaba.

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	V
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
1. EL OJO HUMANO	3
2. LA RETINA	4
3. LA FOTOTRANSDUCCIÓN	7
4. DISTROFIAS DE RETINA	9
4.1. DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD (AMD)	9
4.2. DISTROFIA DE CONOS Y BASTONES (RCD)	10
4.3. ENFERMEDAD DE STARGARDT	11
4.4. AMAUROSIS CONGÉNITA DE LEBER (LCA)	11
4.5. RETINOSIS PIGMENTARIA	11
4.5.1. Genes implicados en la retinosis pigmentaria	14
4.5.1.1. Patrón de herencia autosómica recesiva	14
4.5.1.2. Patrón de herencia autosómica dominante	17
4.5.1.3. Patrón de herencia ligada al cromosoma X	17
4.5.1.4. Alteraciones del genoma mitocondrial	17
4.5.2. Tratamientos de la retinosis pigmentaria	18
4.5.2.1. Factores neurotróficos y de crecimiento	18
4.5.2.2. Trasplante de fotorreceptores	18
4.5.2.3. Implante de células troncales	19
4.5.2.4. Terapia génica	19
4.5.2.5. Ácidos grasos	19
4.5.2.6. Antioxidantes	20
5. CERKL	21
5.1. CARACTERÍSTICAS DEL GEN <i>CERKL</i> Y DE LA PROTEÍNA QUE CODIFICA	22
5.2. MUTACIONES DEL GEN <i>CERKL</i> QUE CAUSAN RETINOSIS PIGMENTARIA	23
5.3. POSIBLES FUNCIONES DE LA PROTEÍNA <i>CERKL</i>	25

6. OBJETIVOS DE LA TESIS	26
METODOLOGÍA	29
1. MATERIALES EMPLEADOS	29
1.1. LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFERO Y MEDIOS DE CULTIVO	29
1.2. BACTERIAS	30
1.3. PLÁSMIDOS	30
1.3.1. Mutantes puntuales	31
1.4. REACTIVOS	33
1.4.1. Compuestos químicos	33
1.4.2. Anticuerpos utilizados	34
1.5. TAMPONES Y OTRAS SOLUCIONES	35
2. METODOLOGÍA UTILIZADA	36
2.1. MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES	36
2.1.1. Transfección transitoria de cultivos celulares	36
2.1.2. Generación de clones estables	36
2.1.3. Tratamientos para producir estrés	37
2.1.4. Obtención de fracciones celulares	37
2.1.4.1. Aislamiento de una fracción de polisomas	37
2.1.4.2. Aislamiento de una fracción de citoesqueleto	38
2.1.4.3. Aislamiento de una fracción de membrana plasmática	39
2.2. IMMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS	39
2.2.1. Obtención de lisados celulares	39
2.2.2. Cuantificación de la concentración de proteína	39
2.2.3. Inmunoprecipitación de proteínas	40
2.2.3.1. Inmunoprecipitación de Flag	40
2.2.3.2. Inmunoprecipitación de HA	41
2.2.3.3. Ensayo de unión a 7-metilguanosa	41
2.2.4. SDS-PAGE, transferencia electroforética y Western blot	42
2.2.5. Inmunofluorescencia y microscopía confocal	42
2.3. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	43

2.4. MANIPULACIÓN DE RNA	44
2.4.1. Purificación de RNA	44
2.4.2. Secuenciación de RNA	44
2.4.3. Análisis de las secuencias de RNA	45
2.4.4. PCR cuantitativa a tiempo real	46
2.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS	46
2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL	51
1. La proteína CERKL se encuentra localizada en el núcleo y citoplasma y, en este, una porción de la proteína forma agregados que no colocalizan con ninguno de los principales orgánulos de la célula	51
2. CERKL colocaliza con marcadores de gránulos de estrés	55
3. La localización de CERKL en el núcleo y en los gránulos de estrés está alterada en los mutantes patológicos de CERKL	65
4. La localización de CERKL en los gránulos de estrés requiere el paso previo de la proteína por el núcleo, así como una transcripción activa	69
5. CERKL se asocia a polisomas	71
6. CERKL se asocia a partículas compactas de ribonucleoproteínas	73
7. CERKL interacciona con componentes de la maquinaria de traducción	76
7.1. Interacción de CERKL con proteínas de la maquinaria de traducción	77
7.2. Interacción de CERKL con mRNAs	80
7.3. La interacción de CERKL con las proteínas de unión a mRNAs depende de la integridad de los mensajeros	81
8. CERKL se asocia a los microtúbulos	84
8.1. Las partículas ribonucleoproteicas compactas que contienen CERKL se unen a los microtúbulos	88

8.2. La asociación de CERKL y de sus proteínas acompañantes con microtúbulos ocurre también en células neuronales diferenciadas	89
9. La proteína CERKL se une a los RNAs mensajeros de los péptidos similares a la humanina (“humanin like peptides”) y al RNA no codificante de reconocimiento de la señal RN7SL2 (“signal recognition particle RNA”)	98
10. Resumen final de los resultados obtenidos en esta tesis	115
11. Funciones de la proteína CERKL	118
CONCLUSIONES FINALES	123
BIBLIOGRAFÍA	127

ABREVIATURAS

ADFP	Proteína relacionada con la diferenciación del tejido adiposo
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AMD	Degeneración macular asociada a la edad
ANT 2	ADP/ATP translocasa 2
ArNa	Arsenito sódico
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CERK	Ceramida quinasa
CERKL	Proteína parecida a ceramida quinasa
CFH	Factor H del sistema de complemento
CHX	Cicloheximida
CNTFR	Receptor del factor neurotrófico ciliar
DAGK	Di-acil glicerol quinasa
DAPI	4, 6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro
DCC	Detectada en cáncer colorectal
DHA	Ácido docosaheptaenoico
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDC4	Proteína activadora de “decapping” del mRNA
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEF	Factor de elongación de traducción eucariótica
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EIF	Factor de inicio de traducción eucariótica

Abreviaturas

EMSA	Ensayo de cambio de movilidad electroforética
ERG	Electrorretinograma
ERGIC	Compartimento intermedio de retículo y Golgi
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
FBS	Suero bovino fetal
FMRP	Proteína de retraso mental X frágil
FPRL	Proteína parecida al receptor del péptido formil
G3BP	Proteína de unión a la proteína activadora de Ras GTPasa
GAP	Proteína activadora de GTPasa
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GCAP1	Proteína activadora de guanilato ciclasa 1
GDP	Guanosín difosfato
GFP	Proteína verde fluorescente
GMP	Guanosín monofosfato
gp130	Glicoproteína 130
GTP	Guanosín trifosfato
HA	Hemaglutinina
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2'-etanosulfónico
HL	Similar a humanina
HRP	Peroxidasa de rábano
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
IGFBP	Proteína de unión al factor de crecimiento insulina
IgG	Inmunoglobulina G
IP	Inmunoprecipitación
Lamp	Proteína de membrana asociada al lisosoma
LB	Luria-Bertani
LCA	Amaurosis congénita de Leber

MD	Degeneración macular
MEM	Medio mínimo esencial
μM	Micromolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
mRNP	Partículas ribonucleoproteicas de mRNA
nm	Nanómetro
oligo d(T)	Oligo desoxirribonucleótido-timidina
PABP	Proteína de unión a la cola poli-adenosina
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PH	Homólogo a plekstrina
PI	Yoduro de propidio
PMSF	Fuoruro de fenilmetanosulfonilo
poli A	Poliadenilato
PRPF	Factor de procesamiento de corte y empalme del mRNA
P-TEFb	Factor de elongación de transcripción positivo
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
RCD	Distrofia de conos y bastones
RIP	RNA inmunoprecipitado
RNA-seq	Secuenciación de RNA
RP9	Proteína de retinosis pigmentaria 9
RPGR	Regulador GTPasa de retinosis pigmentaria
RPL	Proteína de la subunidad 60S del ribosoma
RPS	Proteína de la subunidad 40S del ribosoma
SD	Desviación estándar

Abreviaturas

SDS	Dodecil sulfato sódico
SRP	Partícula de reconocimiento señal
SSC	Tampón citrato sódico salino
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TBS	Tampón tris salino
TBS-T	Tampón tris salino con 0,05 % Tween-20
TCA	Ácido tricloroacético
TDRD	Proteína con dominio tudor
TGN	Red trans del Golgi
TIA-1	Proteína de unión a RNA asociada a los gránulos citotóxicos
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
TRX2	Tioredoxina 2
UTR	Región no traducida del mRNA
WT	Tipo silvestre

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. EL OJO HUMANO

El ojo humano es un órgano complejo que, por su capacidad de detección de la luz, es el encargado de la visión. Está formado esencialmente por una pared constituida por tres capas (externa, media e interna), por el cristalino que actúa como una lente y por dos líquidos de relleno, uno llamado humor vítreo, que se encuentra en el espacio posterior del ojo entre la porción posterior de la pared y el cristalino, y el otro llamado humor acuoso, que rellena el espacio anterior del ojo entre el cristalino y la porción exterior de la pared del ojo o córnea (Curcio y Hendrickson, 1991) (Figura 1).

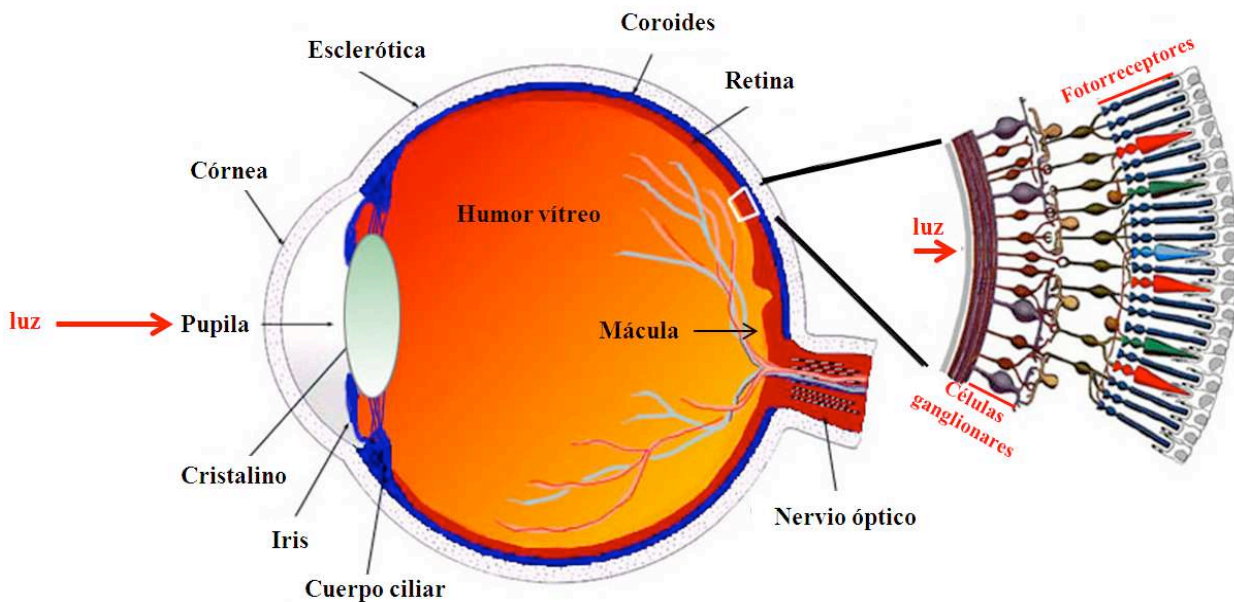


Figura 1 (adaptada Kolb *et al.*, eds., 1995). Sección esquemática del ojo humano. Se muestran las tres capas del ojo. La capa externa (en blanco), la capa media (en azul) y la interna (en rojo). A la derecha se muestra un detalle de la retina. La luz pasa a través de la pupila y del cristalino y llega a la retina, atravesándola hasta llegar a los fotorreceptores, que son células sensibles a la luz. Una vez excitadas, estas células transmiten la señal recibida hasta las células ganglionares y estas últimas, mediante sus largos axones, forman el nervio óptico que manda la señal al cerebro.

A continuación se describirán brevemente las diferentes capas de la pared del ojo.

Capa externa de la pared del ojo

Forma el tejido sostén que da resistencia al ojo. En la parte posterior de este órgano forma la esclerótica y en la parte anterior la córnea.

Capa media de la pared del ojo

Está formada principalmente por tejido conjuntivo que, debido a su alto contenido en vasos sanguíneos, tiene como principal función la de nutrir al resto de las capas de la pared del ojo. En la parte posterior del ojo forma la coroides y en la parte anterior forma el iris y el cuerpo ciliar.

Capa interna de la pared del ojo

Está formada por la retina, que constituye un tejido sensible a la luz que está encargado de convertir las señales luminosas que recibe del exterior en señales eléctricas. Su componente principal son unas células sensibles a la luz, llamadas fotorreceptores, que son en definitiva las responsables de la visión. Además, forman parte de esta capa otras células polarizadas, como son las células bipolares, las células horizontales, las células amacrinas, las células de Müller y las células ganglionares. En la parte externa de la capa interna de la pared del ojo se encuentran también las células del epitelio pigmentario.

2. LA RETINA

Forma la capa interna del ojo y sus funciones son: i) captar la señal luminosa a través de los fotorreceptores (conos y bastones) y convertirla en señal electroquímica (mediante una cascada de señalización de la transducción luminosa), y ii) transmitir la señal electroquímica a otras células retinales mediante la secreción secuencial de neurotransmisores. Esas señales llegan a las células ganglionares desde donde sus largos axones convergen finalmente en el nervio óptico que las manda al cerebro para ser interpretadas como visión.

La retina, por su parte, está formada a su vez por diversas capas (Figura 2) constituidas por diferentes tipos celulares o porciones de los mismos (Kolb *et al.*, eds., 1995). Estas capas de la retina (desde el exterior al interior) son:

1. **Epitelio pigmentario:** Es la capa más externa de la retina. Está formada por unas células no neuronales, las células del epitelio pigmentario, llamadas así porque poseen gránulos conteniendo el pigmento de color negro melanina.

2. **Capa de las células fotorreceptoras:** Formada por los segmentos más externos de los conos y los bastones. Esta capa constituye el compartimento fotosensible de la retina y es aquí donde reside la maquinaria necesaria para la cascada de la transducción luminosa.
3. **Capa limitante externa:** Formada por las uniones entre los fotorreceptores y las células de Müller.
4. **Capa nuclear externa:** Formada por los núcleos de los conos y los bastones.
5. **Capa nuclear o granular interna:** Formada por los núcleos de las células bipolares, amacrinas y horizontales.
6. **Capa plexiforme externa:** Formada por las conexiones sinápticas entre los fotorreceptores y las células bipolares.
7. **Capa plexiforme interna:** Formada por las conexiones sinápticas que se producen entre las células bipolares y las células ganglionares.
8. **Capa de las células ganglionares:** Está formada por los núcleos de las células ganglionares.

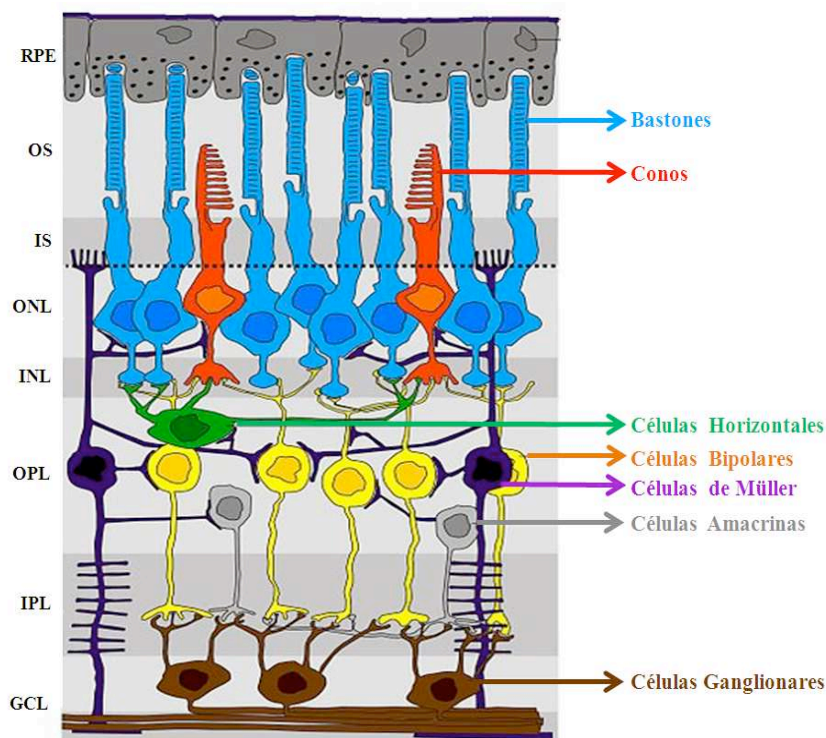


Figura 2 (adaptada de Hartmann y Schmid, 2007). Capas celulares de la retina. Se indican a la izquierda los nombres abreviados de las diferentes capas de la retina y a la derecha los tipos celulares que las componen (ver texto). *Abreviaturas:* RPE (epitelio pigmentario retinal); OS e IS (segmentos externo e interno de los fotorreceptores); ONL e INL (capa nuclear externa e interna); OPL e IPL (capa plexiforme externa e interna) y GCL (capa de células ganglionares).

En las capas mencionadas arriba se encuentran por tanto diversos tipos celulares (ver Figura 2), cuyas características describimos brevemente a continuación:

Capa de células del epitelio pigmentario: Estas células ejercen diversas funciones, entre ellas la fagocitosis de los segmentos externos de los conos y bastones para ayudar en el proceso de renovación de estos segmentos (Nguyen-Legros y Hicks, 2000), la participación en el reciclaje de la vitamina A (esencial para la visión), concretamente en la isomerización de todo-*trans*-retinol a 11-*cis*-retinal (Saari, 2012), el suministro a los fotorreceptores de nutrientes esenciales como la glucosa o los aminoácidos, la recogida de desechos tóxicos y el mantenimiento del equilibrio iónico en el espacio extracelular donde residen los fotorreceptores (Adijanto *et al.*, 2009).

Capas limitante externa y nuclear externa de las células fotorreceptoras: Están formadas por los fotorreceptores y por las células de Müller. Los primeros son las células sensibles a la señal luminosa y pueden ser de dos tipos: conos y bastones. Los segmentos externos de estas células forman la capa nuclear externa. Aparte de los núcleos, los fotorreceptores tienen segmentos internos, donde residen orgánulos celulares como las mitocondrias, el retículo endoplasmático, el complejo de Golgi y el sistema vesicular; segmentos externos, donde se localizan los discos sensibles a la señal luminosa (ver también, más adelante, la Figura 3); y el axonema. Este último es una estructura conteniendo numerosos microtúbulos y que se considera la responsable de mantener la morfología de los segmentos externos y del transporte activo del material biológico en los segmentos externos.

Las células de Müller, por su parte, son células de tipo nodriza con función de soporte y mantenimiento de otros tipos celulares de la retina, como son los propios fotorreceptores (Newman y Reichenbach, 1996). Los núcleos de estas células se sitúan en la capa nuclear interna de la retina y sus prolongaciones citoplasmáticas se extienden a lo largo de toda la retina. Entre las funciones más importantes de estas células está la de sintetizar el glucógeno y la de convertirlo en glucosa para proporcionársela a otras células retinales, incluyendo los fotorreceptores.

Capas plexiforme externa, nuclear interna y plexiforme interna: Están formadas por células bipolares, amacrinas y horizontales. Los núcleos de las células bipolares forman la capa nuclear interna de la retina. Estas células forman sinapsis con los conos y bastones y transmiten así la señal nerviosa desde los fotorreceptores a las células ganglionares de la retina (Nawy y von Gersdorff, 2011).

Las células horizontales y amacrinas son interneuronas moduladoras. Las células horizontales forman sinapsis con los conos y bastones en la capa plexiforme externa, modulando así las conexiones de estas células con las células bipolares. Las células amacrinas, por otro lado, forman sinapsis con los axones de las células bipolares y las dendritas de las células ganglionares en la capa plexiforme interna, ejerciendo una función moduladora de tipo inhibitorio en el paso de la señal electroquímica desde las células bipolares a las ganglionares (de Vries *et al.*, 2011).

Capa de las células ganglionares: En la última capa de la retina, las células ganglionares forman sinapsis con las células bipolares y son las que transmiten la señal recibida por estas al cerebro a través de sus largos axones reunidos en el nervio óptico (Sernagor *et al.*, 2001).

3. LA FOTOTRANSDUCCIÓN

Este es el proceso mediante el que la señal luminosa captada por las células fotorreceptoras se convierte en señal electroquímica y se trasfiere al cerebro, donde se interpreta como una imagen. Los segmentos externos de los fotorreceptores, mediante sus discos membranosos especializados, constituyen el compartimento que realiza el proceso, ya que disponen de toda la maquinaria necesaria para ello. Se pueden distinguir tres fases diferentes en el proceso: excitación, amplificación de la señal y recuperación (Lamb *et al.*, 2009).

En ausencia de una señal luminosa, los canales catiónicos de los segmentos externos de los bastones están abiertos. En la fase de excitación, la señal luminosa (los fotones) se capta mediante la rodopsina en la membrana de los discos de esos segmentos y la energía de los fotones causa una isomerización del 11-*cis*-retinal (derivado de la vitamina A) que está unido a la parte proteica de la rodopsina a todo-*trans*-retinal. Esta isomerización cambia la conformación de la rodopsina y, en esta nueva conformación, la proteína se une a una proteína G heterotrimérica llamada transducina y la activa, reemplazando su molécula de GDP por una molécula de GTP. La transducina activada (unida a GTP) activa a su vez a la proteína fosfodiesterasa que hidroliza el GMP cíclico y causa una bajada en la concentración de ese segundo mensajero. Esta bajada causa el cierre de los canales catiónicos de los segmentos externos, impidiendo así la entrada de cationes en la célula y, por consiguiente, produciendo una hiperpolarización de los bastones. El proceso de excitación en los conos es muy parecido al que acabamos de describir para los bastones, con la diferencia de que en los

conos, en vez de rodopsina, existen 3 tipos diferentes de opsinas responsables de distinguir los diferentes colores (Figura 3).

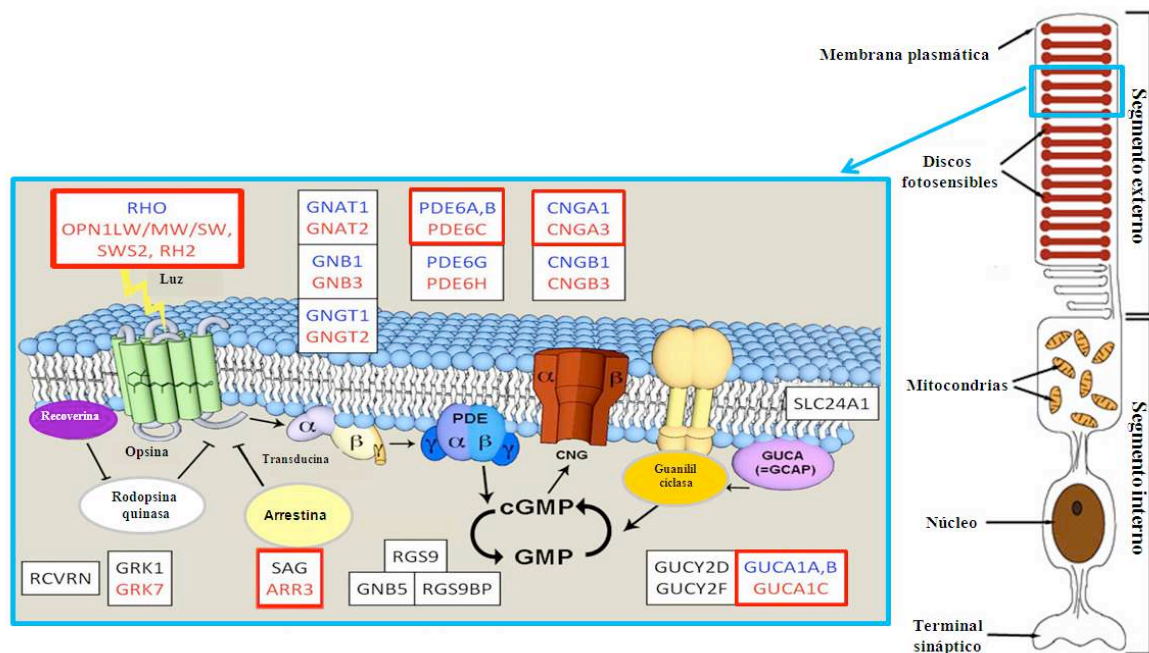


Figura 3 (adaptada de Larhammar *et al.*, 2009 y de Casiday y Frey, 2000) Componentes moleculares de la cascada de fototransducción en vertebrados. La opsina (rodopsina en los bastones) se activa mediante absorción de un fotón por el cromóforo 11-*cis*-retinal (un derivado de la vitamina A), que está asociado a ella y que se convierte en todo-*trans*-retinal. La rodopsina activada se une entonces a la proteína transducina (una proteína G heterotrimérica) que a su vez activa a fosfodiesterasas (PDE) de GMP cíclico (cGMP) que hidrolizan a este segundo mensajero. La disminución en la concentración de cGMP cierra los canales catiónicos (CNG) de la membrana plasmática de los segmentos externos impidiendo la entrada del catión Na^+ , hiperpolarizando los fotorreceptores. En la fase de recuperación la opsina se fosforila mediante una quinasa y, junto a la unión de arrestina, el complejo se inactiva y se separa de la transducina, lo que, por consiguiente, inactiva a la fosfodiesterasa. En paralelo, debido a la bajada de concentración del calcio, la proteína GCAP activa, mediante un cambio conformacional, a la enzima guanilato ciclasa y esta última produce cGMP que activa a los canales catiónicos y permite la entrada de Na^+ . Ver más detalles en el texto. En los cuadros se indica el nombre de los genes codificantes para cada proteína, con color rojo en los conos y color azul en los bastones. Los recuadros rojos muestran los genes (en azul) mutados en la retinosis pigmentaria con un patrón de herencia autosómico recesivo.

Durante el proceso de transducción existen dos pasos de amplificación de la señal. Primero, cada molécula de rodopsina activada es capaz de activar a su vez a muchas moléculas de transducina. Después, cada molécula de fosfodiesterasa activada es capaz de hidrolizar a varias moléculas de GMP cíclico. Como consecuencia de esto, con un único fotón se produce una señal nerviosa amplificada y más potente (Lamb y Pugh Jr., 2006).

La última fase de la transducción es la de recuperación. Durante ella, el estado de activación/desactivación de las proteínas involucradas en la fototransducción vuelve a su

situación de inicio. Durante esta fase, la rodopsina activada se une a la proteína arrestina y se inactiva al producirse su fosforilación por la proteína rodopsina quinasa. En esas condiciones, la rodopsina vuelve a estar lista para volver a ser excitada mediante otra señal luminosa. Además, en este paso la molécula de todo-*trans*-retinal unida a la rodopsina excitada se reemplaza con una molécula de 11-*cis*-retinal (el cromóforo fotoexcitable). La enzima transducina activa y unida a GTP hidroliza el GTP y vuelve a unirse a una molécula de GDP, retornando a su estado inactivo inicial y perdiendo también su interacción con la fosfodiesterasa de GMP cíclico. Al inactivarse la fosfodiesterasa, la enzima guanilatociclasa produce, a partir del GTP, GMP cíclico, que se une a los canales catiónicos y los mantiene abiertos. Esto permite la entrada de cationes a los segmentos externos de los fotorreceptores y, de esta manera, se neutraliza la hiperpolarización producida durante el proceso de excitación, con lo que la carga iónica de los segmentos externos vuelve a su estado inicial (ver Figura 3).

4. DISTROFIAS DE RETINA

Las distrofias de retina engloban a todas aquellas patologías que afectan a la retina de forma hereditaria. En este tipo de patologías pueden afectarse diferentes tipos de células retinales por alguna anomalía de origen genético que cause la muerte de los fotorreceptores y la pérdida de la visión (Francis, 2006).

Hay diferentes tipos de retinopatías, siendo las más frecuentes la degeneración macular asociada a la edad, la distrofia de conos y bastones, la enfermedad de Stargardt, la amaurosis congénita de Leber y la retinosis pigmentaria. A continuación describiremos brevemente esas retinopatías.

4.1. DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD (AMD)

La mácula se encuentra en la parte central de la retina (ver Figura 1), donde hay un elevado número de conos y donde apenas existen bastones, por lo que esta parte de la retina define la agudeza visual y permite percibir los detalles de las imágenes. Los pacientes de esta patología (AMD) sufren, al comenzar la edad adulta y de forma gradual, una degeneración de la mácula debida a la muerte de fotorreceptores (principalmente conos). La muerte de estos conos causa la pérdida de la visión central, apareciendo manchas borrosas en la visión e incapacitando a los pacientes para ver los detalles del campo visual (Michaelides *et al.*, 2003). Existe una estrecha asociación entre mutaciones en el factor H del sistema del complemento y la

enfermedad. Dicha proteína es un inhibidor de proteínas del sistema del complemento a través de su unión a marcadores de tipo glicosaminoglicanos en la superficie de las células. Esta unión inhibe el reconocimiento de estos marcadores celulares por componentes del sistema de complemento, evitando así un ataque inmunológico a las propias células. En ese sentido, se ha observado una respuesta inflamatoria en la mácula que causa la muerte celular de los conos en enfermos en los que se ha encontrado una mutación que reemplaza a la tirosina 402 en el factor H por histidina. Esto ocurre porque la afinidad del factor H por los glicosaminoglicanos disminuye, lo que produce la activación de una respuesta autoinmune (Zipfel *et al.*, 2010).

4.2. DISTROFIA DE CONOS Y BASTONES (RCD)

Es otro tipo de retinopatía donde, debido a alteraciones genéticas, se produce una degeneración más temprana de los conos seguida, de forma más tardía, por la de los bastones. Su prevalencia es de 1 individuo afectado por cada 40.000. Los primeros síntomas pueden aparecer en la edad adulta, aunque a veces se observan incluso antes, afectando a ambos ojos y empeorando con la edad. Como consecuencia de la pérdida temprana de los conos, disminuye la agudeza visual y se produce dificultad en la percepción de los colores, así como fotofobia. Después, la muerte de los bastones determina la pérdida de la visión nocturna. La distrofia de conos y bastones se considera una variedad de retinosis pigmentaria, con la diferencia de que en la retinosis pigmentaria el primer síntoma es la pérdida de la visión nocturna mientras que esta ocurre aquí, como hemos visto, de forma más tardía (Michaelides *et al.*, 2006). A nivel genético es una alteración heterogénea, en la que pueden intervenir varios genes. El gen anómalo puede tener un patrón de herencia autosómico dominante, como en el caso de las mutaciones en el gen *GUCY2D* que codifica para la guanilato ciclasa 1 retinal, una proteína que se expresa en los conos y bastones y que interviene en la transducción de la señal luminosa. El patrón de herencia puede ser también recesivo, como ocurre con la proteína ataxia espinocerebelar tipo 7 (abreviada SCA7), que actúa como un coactivador en la transcripción de genes. Los pacientes, además de presentar otras sintomatologías, como deterioro muscular, presentan también la distrofia de conos y bastones característica de la enfermedad. Finalmente, entre los genes alterados en esta forma de distrofia de retina existen genes ligados al sexo, como es el caso del regulador de GTPasa llamado RPGR, que codifica una proteína que se asocia al citoesqueleto y que interviene en el transporte intraflagelar y en la regulación del transporte a los cilios primarios (Hamel, 2007).

4.3. ENFERMEDAD DE STARGARDT

Consiste en una degeneración macular progresiva que produce una pérdida de la agudeza visual. Además, los pacientes muestran manchas ciegas en sus campos visuales y son muy sensibles a la luz. Presenta una prevalencia de una persona afectada entre 10.000 individuos. La causa mayoritaria de esta enfermedad es la disfunción del gen *ABCA4* que codifica la proteína transportadora “ATP-bindingcassette”, que se expresa exclusivamente en la retina y que se localiza en los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores. Esta proteína interviene en el reciclaje de todo-*trans*-retinol, actuando como una flipasa (proteínas que facilitan el movimiento flip-flop de lípidos en las membranas), al unirse al todo-*trans*-retinol y translocándolo desde la cara interna de la bicapa lipídica de los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores a la cara externa, donde se une a su proteína transportadora con el fin de reciclarse. Las mutaciones en este gen se heredan de manera autosómica recesiva (Han *et al.*, 2014).

4.4. AMAUROSIS CONGÉNITA DE LEBER (LCA)

En este tipo de distrofia retinal (LCA), los pacientes poseen, desde el momento del nacimiento, una afectación grave de la vista debida a la muerte de los conos y bastones. Tiene una prevalencia de un individuo afectado entre 35.000. Se conocen diversos genes, que se expresan en los fotorreceptores y en el epitelio pigmentario de la retina, cuyas mutaciones causan la enfermedad, la mayoría de una forma autosómica recesiva (Koenekoop, 2004).

4.5. RETINOSIS PIGMENTARIA

La retinosis pigmentaria es una enfermedad rara con una prevalencia aproximada en poblaciones europeas y de Estados Unidos de un afectado por cada 4.000 individuos (Parmeggiani, 2011). Su principal característica consiste en que los pacientes sufren una progresiva pérdida de visión a lo largo de sus vidas (Hartong *et al.*, 2006).

La enfermedad normalmente se manifiesta en la adolescencia, con una pérdida de la visión nocturna debida a la muerte de los bastones, seguida de la pérdida de la visión diurna debida a la muerte de los conos. La muerte de los fotorreceptores en la retina de los pacientes se inicia en la periferia, desde donde va progresando, de tal forma que los pacientes van perdiendo de forma gradual la visión periférica, lo que ocasiona una alteración en la visión que en esa situación se ha denominado como visión túnel (Figura 4).

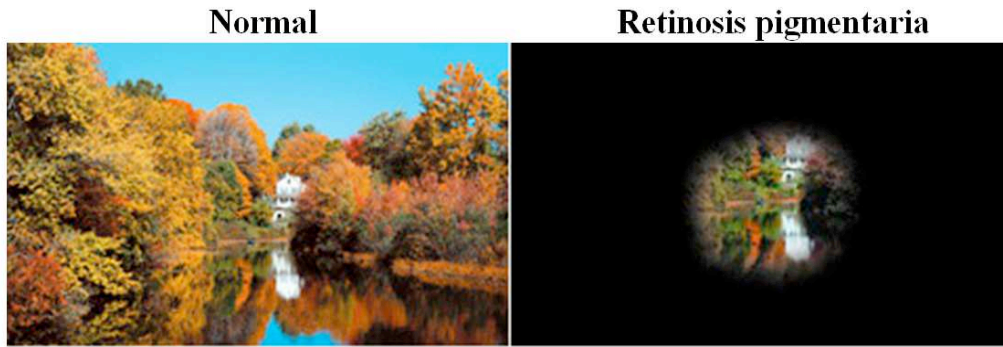


Figura 4 (tomada de Garin, 2014). Pérdida de visión periférica (efecto túnel) en la retinosis pigmentaria. En el panel izquierdo se muestra cómo ve un paisaje una persona normal y en el panel derecho se muestra el mismo paisaje visto por una persona que padece retinosis pigmentaria.

Debido a la muerte de los fotorreceptores, las células del epitelio pigmentario de la retina migran hacia la capa nuclear externa donde residen los fotorreceptores con el fin de fagocitar los restos de las células muertas. Esto se pone de manifiesto al producirse, como consecuencia del progreso de las células epiteliales hacia la capa nuclear externa para realizar la función que hemos mencionado, unos depósitos del pigmento melanina en la retina de los pacientes (Figura 5) (Jaisle *et al.*, 2010).

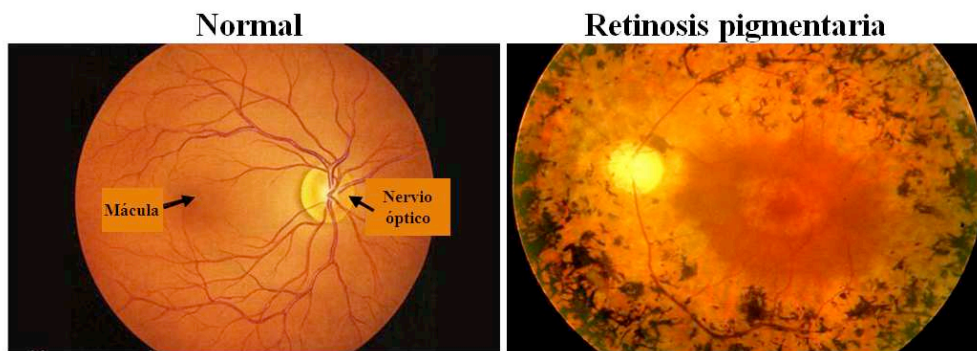


Figura 5 (adaptada de Kolb *et al.*, eds., 1995). Imagen de la retina por el oftalmoscopio, un instrumento que se emplea para ver el fondo del ojo. En la imagen de la izquierda se observa la retina de una persona normal con un fondo transparente. En la imagen de la derecha se observa la retina de un paciente de retinosis pigmentaria con un fondo formado por manchas negras, que son debidas a la migración de las células epiteliales pigmentarias a la capa nuclear externa.

La muerte celular de los fotorreceptores se manifiesta por anomalías morfológicas en sus segmentos externos y por una reducción del grosor de la región que comprende su capa nuclear externa (Figura 6).

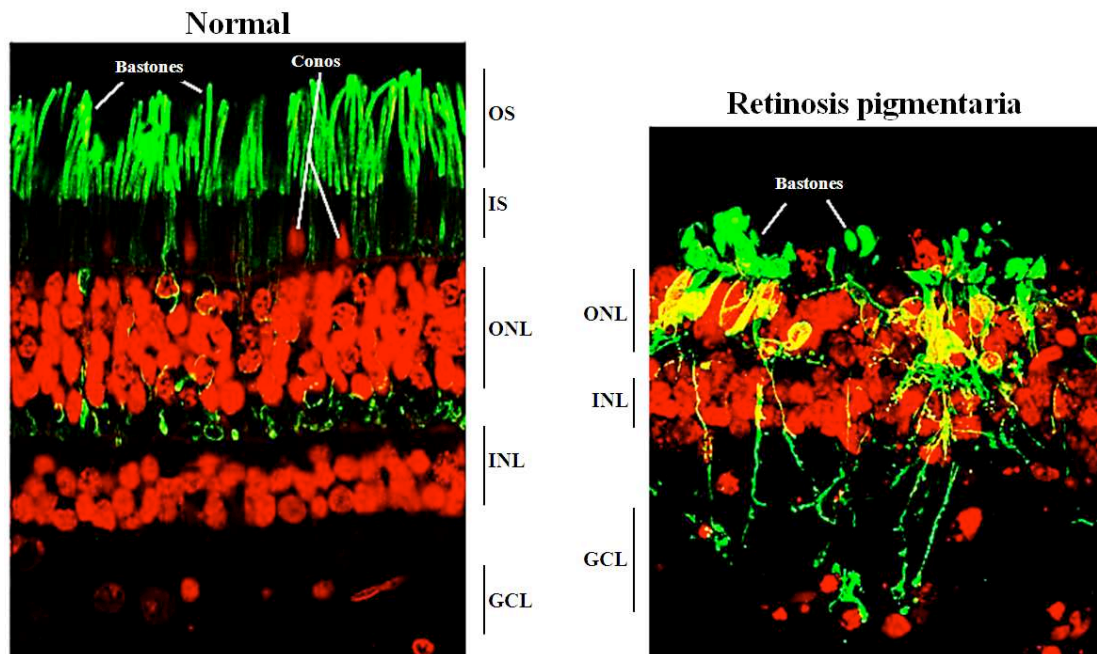


Figura 6 (adaptada de Fariss y Milam, 2009). Secciones de retina de un individuo normal (izquierda) y de un paciente con retinosis pigmentaria (derecha), observadas por microscopia de fluorescencia confocal de alta resolución. La degeneración de la capa de fotorreceptores es evidente en la imagen del paciente. Se indican abreviadas las diferentes capas de la retina. *Abreviaturas*: OS e IS (segmentos externo e interno de los fotorreceptores), ONL e INL (capa nuclear externa e interna) y GCL (capa de células ganglionares).

Durante las manifestaciones tempranas de la enfermedad, las otras capas celulares retinales muestran morfológicamente una apariencia sana, pero cuando progresa más la enfermedad estas capas también se muestran afectadas. Para conseguir retrasar la retinosis pigmentaria, e incluso para evitar la aparición de sus síntomas, es muy importante realizar una detección temprana de la enfermedad, ya que, de esta manera, pueden utilizarse a nivel clínico los tratamientos que existen hoy en día (ver más adelante, apartado 4.5.2) antes de que comience la degeneración de los fotorreceptores. Estos tratamientos incluyen, como veremos, antioxidantes, ácidos grasos y factores neurotróficos. El estudio del electroretinograma (ERG) permite el diagnóstico de la enfermedad. En este procedimiento se emplean electrodos corneales y de superficie para medir la respuesta eléctrica de las células retinales tras estimular el ojo del paciente con señales estándar para este tipo de estudios. Así, pueden distinguirse entre anomalías funcionales de diferentes tipos celulares de la retina y, por tanto,

puede tenerse una información aproximada del progreso de la enfermedad (Vincent *et al.*, 2013). Asimismo, el ERG puede poner de manifiesto anomalías precoces en la fototransducción, al detectar las señales electroquímicas incluso antes del comienzo de las primeras alteraciones de la función visual (en concreto aquí, la ceguera nocturna).

4.5.1. Genes implicados en la retinosis pigmentaria

La retinosis pigmentaria presenta una gran heterogeneidad genética, ya que hasta la fecha se han identificado más de 50 genes cuyas mutaciones causan la enfermedad. Algunos de esos genes son además responsables de otras sintomatologías que afectan a otros tejidos, como por ejemplo el gen *SAG* que codifica para la arrestina y que causa la enfermedad de Oguchi, donde los pacientes sufren una forma de ceguera nocturna por una adaptación muy lenta a la oscuridad (Waheed *et al.*, 2012) o el gen *USH2A* que codifica para la proteína usherina y que produce el síndrome de Usher tipo IIA, que además de la disfunción visual produce una pérdida en la audición (Yang *et al.*, 2010). La mayor parte de los genes cuyas mutaciones causan retinosis pigmentaria codifican proteínas con una localización abundante, pero no exclusiva, en los fotorreceptores, especialmente en los segmentos externos. Esto explica que las primeras células afectadas en esta enfermedad sean precisamente los fotorreceptores.

Como se puede observar en la Tabla 1, existe un gran número de genes implicados en la retinosis pigmentaria con tres patrones de herencia: autosómica dominante, autosómica recesiva o ligada al cromosoma X (Rivolta *et al.*, 2002; Daiger *et al.*, 2007). También mencionaremos tras describir en más detalle estos tres tipos de herencia, algunas alteraciones en el genoma mitocondrial que pueden dar origen a retinosis pigmentaria.

4.5.1.1. Patrón de herencia autosómica recesiva

Este caso corresponde a la pérdida de función de ambos alelos de un mismo *locus* (Tabla 1A). Este patrón de herencia se observa normalmente en los genes que codifican para proteínas que intervienen en la transducción de la señal luminosa, como por ejemplo los genes de canales $\alpha 1$ y $\beta 1$ regulados por nucleótidos cíclicos, de las fosfodiesterasas 6A y 6B y de la arrestina, y también en genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo de la vitamina A y en el reciclaje de todo-*trans*-retinol a 11-*cis*-retinal, como por ejemplo los de los canales de unión a ATP de la subfamilia A (ABC1), de la lecitina retinolaciltransferasa y de la proteína de unión a retinaldehído 1. El reciclaje de todo-*trans*-retinol a 11-*cis*-retinal ocurre entre los fotorreceptores y las células del epitelio pigmentario, donde la molécula de

todo-*trans*-retinol se retira de la membrana de los discos de los fotorreceptores y, mediante la unión a sus transportadores proteicos, puede llegar hasta las células del epitelio pigmentario. Allí, mediante la actuación de enzimas del retículo endoplasmático liso, el todo-*trans*-retinol se convierte en 11-*cis*-retinal. Una vez sintetizada, la molécula 11-*cis*-retinal se transporta a los discos de fotorreceptores donde se une a la opsina/rodopsina para poder excitarse de nuevo mediante la señal luminosa (Figura 7) (Lamb y Pugh Jr., 2006).

Tabla 1. Genes implicados en la retinosis pigmentaria

A. PATRÓN DE HERENCIA AUTOSÓMICA RECESIVA		
SÍMBOLO	PROTEÍNA CODIFICADA	OTRAS PATOLOGÍAS
<i>ABCA4</i>	Miembro 4 de la subfamilia A del casete de unión a ATP	Degeneración macular, Distrofia de conos y bastones
<i>CERKL</i>	CERKL: Proteína parecida a ceramida quinasa	Distrofia de conos y bastones
<i>CNGA1</i>	Canal proteico $\alpha 1$ de unión a nucleótido cíclico	Ninguna
<i>CNGB1</i>	Canal proteico $\beta 1$ de unión a nucleótido cíclico	Ninguna
<i>CRB1</i>	Proteína homóloga a Crumbs 1	Amaurosis congénita de Leber
<i>LRAT</i>	Lecitina retinol aciltransferasa	Amaurosis congénita de Leber
<i>MERTK</i>	Tirosina quinasa del proto-oncogén c-mer	Ninguna
<i>NR2E3</i>	Miembro 3 del receptor nuclear grupo E, subfamilia 2	Síndrome de incremento de conos S
<i>NRL</i>	Proteína retino-neural con cremallera de leucina	Retinosis pigmentaria dominante
<i>PRCD</i>	Proteína de degeneración progresiva de conos y bastones.	Ninguna
<i>PDE6A</i>	Fosfodiesterasa 6A	Ninguna
<i>PDE6B</i>	Fosfodiesterasa 6B	Ceguera nocturna estacionaria congénita
<i>RGR</i>	Receptor acoplado a proteína G retinal	Esclerosis coroidal dominante
<i>RHO</i>	Rodopsina	Retinosis pigmentaria dominante
<i>RLBP1</i>	Proteína 1 de unión a retinaldehído	Distrofia de retina de Bothnia
<i>RP1</i>	Proteína RP1	Retinosis pigmentaria dominante
<i>RP22</i>	Desconocida	Ninguna
<i>RP25</i>	Desconocida	Ninguna
<i>RP28</i>	Desconocida	Ninguna
<i>RP29</i>	Desconocida	Ninguna
<i>RP32</i>	Desconocida	Ninguna
<i>RPE65</i>	Proteína de 65 kDa específica de RPE	Amaurosis congénita de Leber
<i>SAG</i>	Arrestina	Enfermedad de Oguchi
<i>TULP1</i>	Proteína 1 parecida a Tubby	Amaurosis congénita de Leber
<i>USH2A</i>	Proteína de Síndrome de Usher 2A	Síndrome de Usher

B. PATRÓN DE HERENCIA AUTOSÓMICA DOMINANTE		
SÍMBOLO	PROTEÍNA CODIFICADA	OTRAS PATOLOGÍAS
CA4	Anhidrasa carbónica IV	Ninguna
CRX	Proteína Homeobox de conos y bastones	Amaurosis congénita de Leber
FSCN2	Proteína homóloga a fascina 2	Ninguna
GUCA1B	Proteína activadora de guanilato ciclasa 1B	Degeneración macular
IMPDH1	Inosina monofosfato deshidrogenasa 1	Amaurosis congénita de Leber
NRL	Proteína retino-neural con cremallera de leucina	Retinosis pigmentaria recesiva
PRPF3	Factor de procesamiento de pre-mRNA 3	Ninguna
PRPF8	Factor de procesamiento de pre-mRNA 8	Ninguna
PRPF31	Factor de procesamiento de pre-mRNA 31	Ninguna
RDS	Periferina 2	Degeneración macular, Retinosis pigmentaria digénica junto con ROM1
RHO	Rodopsina	Retinosis pigmentaria recesiva, Ceguera nocturna estacionaria congénita
ROM1	Proteína 1 de membrana del segmento externo de la retina	Retinosis pigmentaria digénica junto con periferina 2
RP1	Proteína RP1	Retinosis pigmentaria recesiva
RP9	Proteína RP9	Ninguna
RP31	Desconocida	Ninguna
RP33	Desconocida	Ninguna
SEMA4A	Semaforina 4A	Distrofia de conos y bastones
C. PATRÓN DE HERENCIA LIGADA AL CROMOSOMA X		
SÍMBOLO	PROTEÍNA CODIFICADA	OTRAS PATOLOGÍAS
RP2	Proteína XRP2	Ninguna
RP6	Desconocida	Ninguna
RP23	Desconocida	Ninguna
RP24	Desconocida	Ninguna
RP34	Desconocida	Ninguna
RPGR	Proteína reguladora de GTPasa de retinosis pigmentaria	Distrofia de conos ligada al cromosoma X, Ceguera nocturna estacionaria congénita ligada a cromosoma X

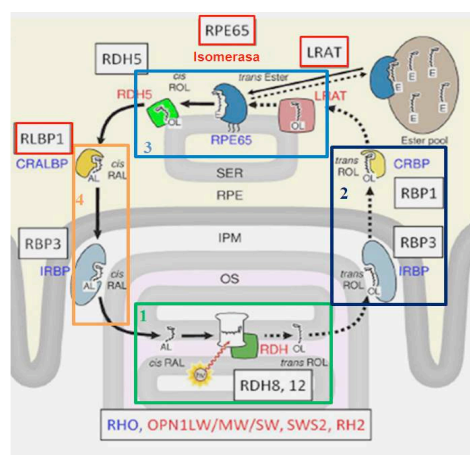


Figura 7 (adaptada de Lamb y Pugh Jr., 2006). Ciclo del retinoide. El reciclaje de retinoides ocurre en 4 etapas diferentes: (1) Liberación del todo-trans-retinol (cuadrado verde) de la membrana de los discos de los fotorreceptores. (2) Transporte del todo-trans-retinol unido a transportadores proteicos hasta las células del epitelio pigmentario retinal (RPE, cuadrado azul oscuro). (3) Conversión del todo-trans-retinol a 11-cis-retinal (cuadrado azul claro) mediante enzimas del retículo endoplasmático liso (SER). (4) Transporte del 11-cis-retinal a los discos de fotorreceptores (cuadrado naranja) donde se une a opsin/rodopsina para poder excitarse de nuevo mediante la señal luminosa. Mutaciones en los genes de los recuadros causan retinosis pigmentaria. *Abreviaturas:* OS, segmento externo; IPM, matriz inter-fotorreceptor; RPE, epitelio pigmentario de retina; SER, retículo endoplasmático liso; RAL, retinaldehído. Enzimas (en rojo): RDH, deshidrogenasa de todo-trans-retinol; LRAT, aciltransferasa de lecitina:retinol; RDH5, 11-cis-retinol deshidrogenasa. Proteínas chaperonas (en azul): IRBP, proteínas de unión a retinol inter-fotorreceptor; CRBP, proteína de unión al retinol celular; RPE65, proteína de 65 kDa del epitelio pigmentario retinal; CRALBP, proteína de unión al retinal celular.

4.5.1.2. Patrón de herencia autosómica dominante

Se trata de un patrón de herencia bastante común en la retinosis pigmentaria, en el que la disfunción de un solo alelo de un *locus* causa la patología (Tabla 1B). En retinosis pigmentaria, el gen mutado más frecuentemente con este patrón de herencia es el gen *RHO* que codifica la rodopsina, una proteína esencial para el comienzo de la señal luminosa y situada en la membrana de los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores (ver Figura 3). La rodopsina es una proteína integral de membrana y su porción proteica está unida a un derivado de la vitamina A, llamado 11-*cis*-retinal, que es sensible a la señal luminosa. Una vez excitado y mediante un proceso de isomerización, el 11-*cis*-retinal se convierte en todo-*trans*-retinal y esto causa un cambio conformacional en la rodopsina que señala el inicio de la fototransducción (ver Figura 3) (Lamb y Pugh Jr., 2006; Larhammar *et al.*, 2009).

Otras proteínas que presentan este patrón de herencia son varias integrales de membrana localizadas en la membrana plasmática y en la de los discos en los segmentos externos de fotorreceptores. Entre estas proteínas podemos destacar a la proteína del segmento externo de retina, a la semaforina 4A y a la periferina 2. En este grupo de proteínas, cabe mencionar también varias que intervienen en el “splicing” de los RNAs mensajeros, como son la proteína Prp3 que se encuentra en la snRNP U4/U6 y que está codificada por el gen *PRPF3*, la proteína “pre-mRNA-processing-splicing factor 8” codificada por el gen *PRPF8*, el “pre-mRNA-processing factor 31” codificado por *PRPF31* y la proteína retinosis pigmentaria 9 codificada por el gen *RP9* (Townes *et al.*, 2010).

4.5.1.3. Patrón de herencia ligada al cromosoma X

Las mutaciones en algunos *loci* presentes en el cromosoma X (Tabla 1C) pueden también causar retinosis pigmentaria. Una de las proteínas de esta clase es la proteína XRP-2 que se expresa abundantemente en los fotorreceptores. Esta proteína se localiza principalmente en la membrana plasmática de las células y actúa como una proteína GAP, es decir, como una proteína que acelera la hidrólisis del GTP unido a proteínas G. En concreto, la XRP-2 de los conos y bastones parece estar involucrada en el transporte desde el complejo de Golgi hasta la membrana ciliar (Donaldson y Jackson, 2011).

4.5.1.4. Alteraciones en el genoma mitocondrial

Finalmente, además de las mutaciones en el genoma nuclear, se ha visto también que algunas alteraciones en el genoma mitocondrial pueden dar origen a retinosis pigmentaria. Un

ejemplo de ello es la disfunción del gen mitocondrial *ATP6* que codifica una subunidad que opera junto al anillo de subunidades *c* en el canal de protones F_0 de la ATP sintasa mitocondrial, que como es sabido es la responsable de la producción por las células de la mayor parte del ATP en condiciones aeróbicas. Debido a ciertas mutaciones en dicho gen, los pacientes además de padecer retinosis pigmentaria presentan otras sintomatologías, como ataxia y debilidad muscular, que se incluyen bajo el término NARP y que corresponde a neuropatía, ataxia y retinosis pigmentaria (Nijtmans *et al.*, 2001).

4.5.2. Tratamientos de la retinosis pigmentaria

Aunque no existe todavía una cura definitiva para las distrofias retinales, entre las que se encuentra la retinosis pigmentaria, se investigan diversas formas para tratar de prevenir la muerte celular de los fotorreceptores producida por mutaciones patológicas en diferentes *loci*. Junto a su diagnóstico precoz, para retrasar la aparición de la retinosis pigmentaria, se recomienda una dieta apropiada, un ritmo de vida saludable y una protección adecuada de los ojos contra la luz solar. Además de esto, existen tratamientos algo más específicos para retrasar la manifestación de la patología que enumeramos a continuación y que, aunque no están totalmente optimizados, podrían dar lugar a nuevas terapias para la enfermedad.

4.5.2.1. Factores neurotróficos y de crecimiento

Aunque se siguen estudiando más profundamente sus efectos a nivel de investigación básica, constituyen ya uno de los tratamientos que se utilizan hoy en día a nivel clínico, puesto que ha podido comprobarse que su uso previene la muerte celular y aumenta la supervivencia de los fotorreceptores. Entre estos factores podemos citar el neurotrófico ciliar, el neurotrófico derivado del cerebro, el de crecimiento de fibroblastos, etc. Su uso tiene el inconveniente de la dificultad que tienen dichos factores para acceder a los fotorreceptores, ya que deben atravesar la barrera hematorretiniana. Además, cuando se suministran, pueden producir el crecimiento y la proliferación de otros tipos celulares, lo que puede dar lugar a anomalías no deseadas (Birch *et al.*, 2013).

4.5.2.2. Trasplante de fotorreceptores

Este es un método esperanzador en la cura de la retinosis pigmentaria, ya que su uso puede restablecer las funciones de los fotorreceptores que se han perdido. Existe una limitación importante en ese tratamiento que deriva de la muerte de los fotorreceptores trasplantados. En la retina, los fotorreceptores están en contacto físico entre sí y controlan su supervivencia

secretando diferentes tipos de factores de supervivencia, tanto de células del mismo tipo (conos y bastones) como de diferente tipo. Por eso, los fotorreceptores alterados en los pacientes de retinosis pigmentaria, afectarían también a los fotorreceptores sanos recién introducidos en la retina y, como resultado de estas interacciones, los fotorreceptores trasplantados acabarían también muriendo por apoptosis (Pearson *et al.*, 2012). Por eso es importante combinar el implante de nuevos fotorreceptores con la adición de factores de supervivencia, ya que estos impiden esa muerte por apoptosis de los fotorreceptores recién introducidos.

4.5.2.3. Implante de células troncales

Una de las estrategias terapéuticas más recientes consiste en la introducción de células troncales en la retina para tratar de reemplazar los fotorreceptores muertos. En esta terapia hay que impedir, en un primer paso, la muerte de los fotorreceptores del paciente mediante el empleo de factores neurotróficos, para después inducir, en las células troncales introducidas en la retina, la diferenciación hasta fotorreceptores u otras células retinales perdidas con el fin de que establezcan las conexiones adecuadas entre ellas (Tucker *et al.*, 2014).

4.5.2.4. Terapia génica

Otra estrategia para el tratamiento de la retinosis pigmentaria consiste en la introducción del gen mutado en la retina de los pacientes. De esta forma, el gen introducido codifica para una proteína funcional que sustituiría a la alterada en los pacientes. Debe aplicarse en las etapas tempranas de la enfermedad, cuando la mayoría de los fotorreceptores aún funcionan. Los dos principales métodos que se están investigando intensamente para actuar como vehículos que transporten e integren el transgen en el genoma de los fotorreceptores son los adenovirus y diferentes tipos de nanopartículas. En cualquier caso, conviene recordar que para poder aplicar adecuadamente este tipo de terapia es necesario conocer en detalle el gen que está mutado y cuál es su función (Petrs-Silva y Linden, 2014).

4.5.2.5. Ácidos grasos

Los ácidos grasos juegan un papel importante en el correcto funcionamiento de los fotorreceptores ya que, además de desempeñar numerosas funciones, constituyen un componente fundamental de los discos que se encuentran en los segmentos externos de estas células. Los ácidos grasos son un factor clave en el transporte vesicular de componentes esenciales de los discos, como el de la proteína rodopsina, que parte del complejo de Golgi y que se dirige a los segmentos externos de los fotorreceptores. Entre estos ácidos grasos hay

que mencionar el ácido docosahexaenoico (DHA), un ácido graso de la serie omega 3 que posee una larga cadena insaturada de hidrocarburos y que, en comparación con otros tejidos, se encuentra en una elevada concentración en la retina, sobre todo en los conos y los bastones donde constituye la mayor parte de los ácidos grasos de los discos. Por tanto, su correcto reciclaje es importante para el funcionamiento adecuado de los fotorreceptores. Por ello, son varios los estudios que afirman que el DHA es muy eficaz para ralentizar y retrasar los síntomas de la retinosis pigmentaria, ya que añadiendo este ácido graso a la dieta se observa una protección frente a la muerte de los fotorreceptores y un aumento en su supervivencia (Politi *et al.*, 2001; Bazan 2009). Además, al ser un producto final en el metabolismo de los ácidos grasos, puede tener un gran valor terapéutico para el tratamiento, no solo de retinopatías, sino también de otros tipos de patologías.

4.5.2.6. Antioxidantes

Debido a su exposición a la luz, la producción de radicales libres en la retina es muy elevada. En las retinopatías, entre las que se encuentra la retinosis pigmentaria, los niveles de estos radicales libres aumentan y causan daños a diversos componentes celulares por su alta capacidad oxidativa, lo que resulta, finalmente, en la muerte celular. Puesto que los antioxidantes son unos componentes indispensables para neutralizar los radicales libres, la incorporación en la dieta de los enfermos de una dosis adecuada de antioxidantes tendría efectos beneficiosos para evitar la muerte celular de los fotorreceptores. Entre los antioxidantes que se han utilizado se incluyen antocianinas, carotenoides y retinoides, como la luteína, la zeaxantina y el ácido retinoico, el ácido α -lipoico, la vitamina E, la coenzima Q10, el glutatión reducido, la vitamina C y la taurina (Komeima *et al.*, 2007).

Las antocianinas son unos pigmentos hidrosolubles que absorben los fotones de alta energía (correspondientes a la franja espectral azul) y neutralizan las especies reactivas de oxígeno, protegiendo así a los fotorreceptores frente a estos agentes que se han producido por la exposición a la luz. Los carotenos son unos pigmentos liposolubles de gran importancia en la visión y que intervienen en la activación de la rodopsina. Los retinoides, por su parte, también tienen una alta capacidad de combatir los radicales libres, por lo que son capaces de proteger a las células frente al daño oxidativo. De hecho, existe una amplia variedad de genes mutados en la retinosis pigmentaria cuyas funciones son importantes para la síntesis y el reciclaje de los retinoides (Perusek y Maeda, 2013). El ácido α -lipoico protege a los ácidos grasos de las células de la lipoperoxidación, ayudando así a las células a mantener sus membranas lipídicas intactas y sin alteraciones. La vitamina E es un potente quelante de los

radicales libres. La coenzima Q10 es un lípido que se encuentra en varias membranas, como la membrana interna de las mitocondrias, donde es un componente esencial de la cadena de transporte de electrones por lo que contribuye a la producción eficaz del ATP por las mitocondrias. Además, debido a su capacidad redox, la coenzima Q10 puede neutralizar los radicales libres. El glutatión se sintetiza inicialmente a partir del L-glutamato y la L-cisteína en el hígado. Existe en forma reducida y oxidada (esta última formando el disulfuro de glutatión, con un puente disulfuro entre dos moléculas de glutatión) y por eso posee una elevada capacidad antioxidante, neutralizando los radicales libres. Además, ayuda a que otros antioxidantes, como las vitaminas C y E, se encuentren en su forma reducida que, por tanto, está preparada para captar los electrones y neutralizar los radicales libres (Komeima *et al.*, 2006). La taurina es un ácido orgánico que se considera como un derivado del aminoácido cisteína y que interviene en la formación de la bilis. Está altamente concentrada en la retina y reduce los productos de la oxidación producida por los radicales libres en las membranas celulares (Pasantés-Morales *et al.*, 2002).

Por tanto, se considera que el suministro a los pacientes de retinosis pigmentaria de una mezcla adecuada de algunos de estos antioxidantes, como suplemento en la dieta, combatiría eficazmente las especies reactivas de oxígeno producidos en la retina, evitando la muerte de los fotorreceptores y retrasando así la aparición de los síntomas de la patología.

5. CERKL

Uno de los genes mutados en la retinosis pigmentaria es *CERKL* y el estudio de la proteína que codifica es el objeto de esta tesis. Fue identificado, en 2004, como causante de esta patología por el grupo de la Dra. Roser González-Duarte de la Universidad de Barcelona, cuando estudiaron una familia española con varios miembros afectados por retinosis pigmentaria (Tuson *et al.*, 2004). Aunque las mutaciones patológicas de *CERKL* están asociadas con la retinosis pigmentaria, hay estudios (Alemán *et al.*, 2009) que las asocian además con la distrofia de conos y bastones (ver apartado 4.2). Este gen está localizado en la región q31.3 del cromosoma 2 y debe su nombre (*CERKL*, que es la abreviatura de “CERamide Kinase Like”) a la alta homología de la proteína que codifica con la proteína CERK (“CERamide Kinase”). Esta es una quinasa de lípidos que fosforila varias especies de ceramidas y que se encuentra en varias localizaciones, incluyendo el citosol, la red *trans*-Golgi y los endosomas (Lamour *et al.*, 2007).

5.1. CARACTERÍSTICAS DEL GEN *CERKL* Y DE LA PROTEÍNA QUE CODIFICA

El gen *CERKL* está formado por 13 exones y codifica en humanos 6 isoformas de la proteína que se producen mediante “splicing” alternativo (Figura 8). El número de isoformas varía dependiendo de la especie y así, existen 7 isoformas en el ratón por ejemplo (Vekslin y Ben-Yosef, 2010), mientras que en pez cebra, rana o pollo el número de estas es de 3, 2 o 5, respectivamente (Riera *et al.*, 2013). La isoforma más conservada entre especies es la isoforma a (*CERKLa*), que tiene 532 aminoácidos (ver la primera de todas las isoformas en la Figura 8). *CERKL* tiene una expresión que es específica de tejido. Sus niveles son mayores en la retina y en el cerebro, aunque también se expresa, con niveles mucho más bajos, en células del epitelio pulmonar y en el riñón (Tuson *et al.*, 2004). Si bien la proteína está presente en mayor cantidad en el citoplasma celular (Tuson *et al.*, 2009), contiene, en su porción N-terminal, dos señales de entrada al núcleo y, en su porción C-terminal, tiene también señales de salida del núcleo, lo que indica su posible ciclaje entre el núcleo y el citoplasma (Inagaki *et al.*, 2006). Existe controversia respecto a su localización en el citoplasma, pero parece que *CERKL* no se asocia ni a mitocondrias ni a varios componentes del sistema endosomal-lisosomal (lisosomas, endosomas tempranos y tardíos) (Tuson *et al.*, 2009). Aunque se ha descrito la asociación de *CERKL* con el retículo endoplasmático y con el complejo de Golgi (Tuson *et al.*, 2009), otros trabajos no han encontrado esa asociación (Bornancin *et al.*, 2005). En la retina, *CERKL* se expresa de forma abundante en los conos, donde está presente tanto en los núcleos como en los segmentos externos. También se expresa con un nivel elevado en la células ganglionares y, en menor cantidad, en las células bipolares de la retina (Mandal *et al.*, 2013).

Se han identificado (ver la Figura 8) tres dominios en la proteína *CERKLa* (*CERKL* WT). En primer lugar, existe un dominio del tipo PH (“Pleckstrin Homology”) situado en la porción N-terminal de la proteína y que comprende los aminoácidos 48 hasta el 160. Se han descrito dos funciones diferentes para estos dominios, una de unión a lípidos y otra de unión al citoesqueleto. Un segundo dominio en la proteína *CERKL* WT es el DAGK (DiAcyl Glycerol Kinase), que se encuentra entre los aminoácidos 165 y 332 y que se ha identificado también en varias quinasas de lípidos (de diacilglicerol, de ceramida o de esfingosina). Finalmente, existe un tercer dominio en la porción C-terminal de la proteína que es muy parecido al dominio de unión a la calmodulina de la proteína *CERK* (Vekslin y Ben-Yosef, 2010) y que, en principio, podría relacionarse con algún tipo de regulación por calcio.

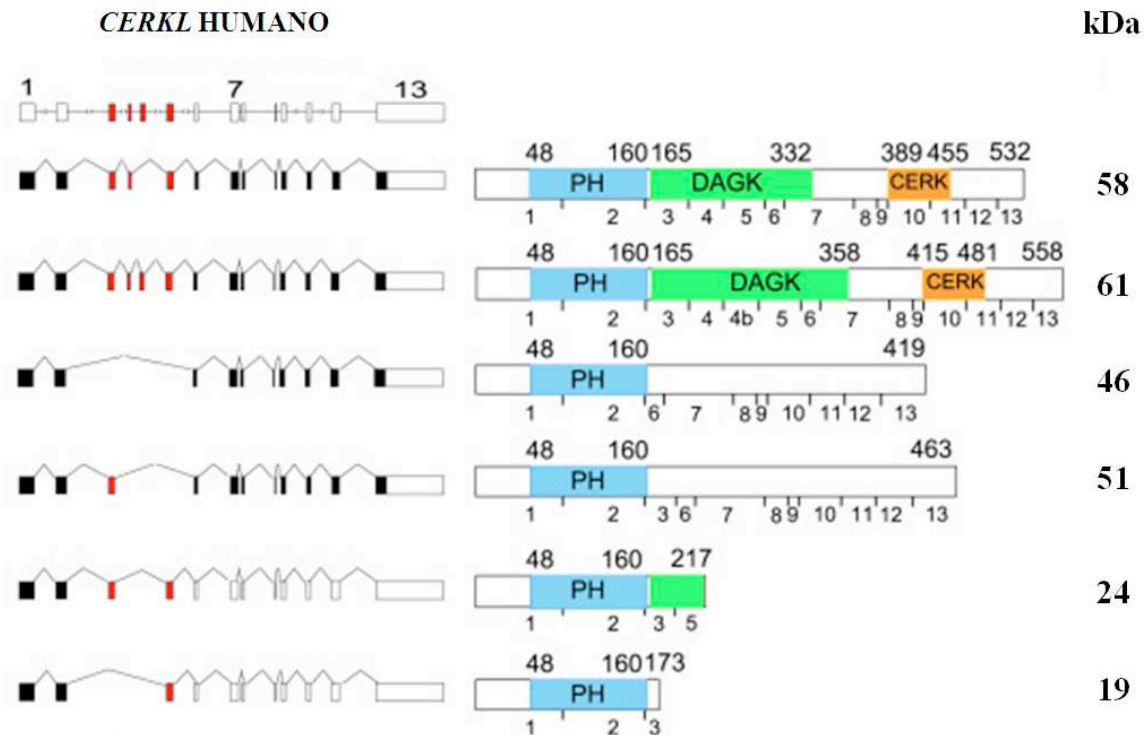


Figura 8 (adaptada de Vekslin y Ben-Yosef, 2010). El gen *CERKL* y su “splicing” en humanos. Arriba a la izquierda se puede observar el gen *CERKL* y abajo las diferentes variantes que se generan mediante “splicing” alternativo. A la derecha se puede ver el producto proteico de cada variante. Los cuadrados negros representan los exones y los rojos los exones de “splicing” alternativo. En las proteínas codificadas se muestran los dominios de “pleckstrin homology” (PH), de “diacyl glycerol kinase” (DAGK) y el que se parece al dominio de unión a calmodulina de la proteína ceramida quinasa (CERK). También se muestran en las proteínas el comienzo y el final de cada dominio, los exones que la codifican (abajo) y la masa molecular de cada una en kDa (derecha).

5.2. MUTACIONES DEL GEN *CERKL* QUE CAUSAN RETINOSIS PIGMENTARIA

Se han identificado diferentes mutaciones patológicas en el gen *CERKL* (ver Tabla 2) y todas ellas actúan de forma recesiva. Las mutaciones más frecuentes se pueden agrupar en tres clases diferentes. La primera corresponde a mutaciones que causan la conversión de un aminoácido en un codón de parada y que, por tanto, dan lugar a proteínas truncadas. Este es el caso de la conversión de la citosina 769 a timina dentro del exón 5 del gen *CERKL* y que produce un cambio en la codificación de la arginina 257 por un codón de parada (Tuson *et al.*, 2004). Esta mutación (R257X), que fue identificada en una familia española en 2004, da origen a una forma severa de retinosis pigmentaria con degeneración macular y depósitos periféricos de pigmentos. Otro caso dentro de esta misma primera clase consiste en la conversión del codón que codifica el residuo cisteína 362 del exón 8 del gen en un codón de

parada (Alemán *et al.*, 2009). Esta mutación se encontró asociada en heterocigosis a la mutación R257X anterior.

Una segunda clase de mutaciones corresponde a aquellas que causan un cambio en la pauta de lectura, alterando la secuencia de aminoácidos que existe tras el lugar donde se ha producido este. Un ejemplo de este tipo de mutaciones en el gen *CERKL* es la conversión de la guanina 238+1 en una adenina, lo que altera el “splicing” del intrón 1 en el RNA mensajero. Esta mutación se encontró por primera vez en una familia yemení y produce una sintomatología de la enfermedad muy severa y temprana (Auslender *et al.*, 2007).

Tabla 2. Mutaciones del gen *CERKL* que producen retinosis pigmentaria

MUTACIÓN	CAMBIO EN LA PROTEÍNA	FENOTIPO	REFERENCIA
c.769C>T	p.R257X	Retinosis pigmentaria severa, Degeneración macular y depósito de pigmentos periféricos en la retina	Tusón <i>et al.</i> , 2004
c.1086C>T	p.C362X	Retinosis pigmentaria severa y temprana	Aleman <i>et al.</i> , 2009
c.238+1G>A	Alteración del “splicing” del intrón 1, provocando un cambio en la pauta de lectura	Retinosis pigmentaria temprana y muy severa	Auslender <i>et al.</i> , 2007
c.318A>G	p.R106S	Retinosis pigmentaria moderada y más tardía	Ali <i>et al.</i> , 2008
c.375C>G	p.C125W	Retinosis pigmentaria, distrofia de conos y bastones y atrofia macular	Littink <i>et al.</i> , 2010
c.734T>C	p.L245P	Distrofia de conos y bastones que comienza por la periferia de la retina afectando a la zona central de forma tardía, disminuyendo la agudeza visual	Khan y Abu-Safieh., 2014

La tercera clase de mutaciones corresponde a aquellas que causan un cambio puntual en un único aminoácido. Dos ejemplos de estas son la conversión de la arginina 106 en serina y que fue identificada en 2008 en una familia paquistaní (Ali *et al.*, 2008) y la conversión de la cisteína 125 en triptófano que fue identificada en 2010 (Littink *et al.*, 2010). Ambas mutaciones se encuentran en el dominio “pleckstrin homology” de la proteína, lo que indica la importancia de este dominio para su funcionalidad. Otra de estas mutaciones puntuales, que fue identificada por primera vez en una familia saudí, ocurre cuando el residuo de leucina

245 de CERKL se convierte en prolina (Khan y Abu-Safieh, 2014). Los pacientes con esta mutación sufren una distrofia de los fotorreceptores (la típica RCD por “rod-cone dystrophy”, ver apartado 4.2) que inicialmente ocurre de forma periférica, pero que con el tiempo afecta al centro del campo de visión y a la agudeza visual.

5.3. POSIBLES FUNCIONES DE LA PROTEÍNA CERKL

La función de la proteína CERKL es desconocida. En un primer momento, debido a su dominio DAGK y su alta homología con la proteína CERK, se pensó que su función sería la de fosforilación de ceramidas. Sin embargo, diversos estudios, tanto *in vitro* con cultivos celulares como *in vivo* generando ratones “knockout” de *CERKL*, no han obtenido ninguna evidencia de que esta proteína, a diferencia de lo que ocurre con CERK, tenga algún papel en la fosforilación de ceramidas o incluso en la de otros lípidos (Graf *et al.*, 2008; Nevet *et al.*, 2012).

En los estudios con modelos animales y en contra de lo que se esperaba, los ratones “knockout” que se han generado no presentan alteraciones visuales severas (Graf *et al.*, 2008; Garanto *et al.*, 2012). Más recientemente, sin embargo, se han generado modelos “knockdown” de CERKL en pez cebra (Riera *et al.*, 2013) utilizando oligonucleótidos de 25 bases del tipo morfolino (Summerton y Weller, 1997) para reducir la expresión de CERKL al unirse específicamente a la secuencia de su RNA mensajero e inhibir su traducción. En esas condiciones, sí pudieron ponerse de manifiesto diversas anomalías en el desarrollo del ojo (Riera *et al.*, 2013). Además, las células retinales en estos modelos son más sensibles al estrés luminoso y se observa una mayor muerte celular, especialmente en las células fotorreceptoras (Li *et al.*, 2014). De hecho, en otro estudio se pudo comprobar el papel protector de la proteína CERKL en células cultivadas frente a un estrés oxidativo causado por agua oxigenada (Tuson *et al.*, 2009), ya que ese estrés se reducía de manera significativa cuando se superexpresaba la proteína CERKL.

Otra de las estrategias utilizadas para poder entender mejor la función de CERKL ha sido identificar las proteínas que interactúan con ella mediante procedimientos de doble híbrido o de inmunoprecipitación y “pull-down”. Una de las proteínas identificadas en estos estudios ha sido la proteína activadora de guanilatociclasa 1 (GCAP1), que es un sensor de calcio localizado en los segmentos externos de los fotorreceptores y que interviene en la fototransducción. La interacción de CERKL con esta proteína depende de la presencia del

calcio. En el mismo estudio se identificó además a la recoverina, que también interviene en la fototransducción, como otra proteína que interacciona con CERKL (Nevet *et al.*, 2012). Finalmente, otra proteína que interacciona con CERKL fue identificada en un estudio más reciente. Se trata de la proteína mitocondrial tioredoxina 2 (TRX2) implicada en funciones antioxidantes y cuya interacción con CERKL mantiene a TRX2 en su estado redox reducido que, por tanto, debe ayudar a proteger a las células frente a los radicales libres (Li *et al.*, 2014).

6. OBJETIVOS DE LA TESIS

En resumen, la función biológica de CERKL a nivel molecular no está aún bien definida y conocerla sería un paso importante para comprender su papel en la retina y para explicar por qué mutaciones en el gen que la codifica producen retinosis pigmentaria. Por eso, en esta tesis nos hemos planteado dos **objetivos principales** para poder aproximarnos al conocimiento de la función de CERKL:

- 1- Estudiar en detalle la localización intracelular de CERKL WT y de los mutantes patogénicos mediante técnicas microscópicas y de subfraccionamiento celular.
- 2- Identificar las interacciones de CERKL con proteínas y con otras moléculas mediante técnicas de análisis masivo, comparándolas con las que presentan los mutantes patogénicos.

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

1. MATERIALES EMPLEADOS

1.1. LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFERO Y MEDIOS DE CULTIVO

Las líneas celulares utilizadas en este estudio fueron las siguientes:

COS-7: fibroblastos de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*).

HeLa: células epiteliales humanas (*Homo sapiens*) procedentes de un adenocarcinoma cervical.

HEK-293T: células embrionarias de riñón humanas (*Homo sapiens*).

661W: células derivadas de fotorreceptores de ratón (*Mus musculus*).

SH-SY5Y: células de neuroblastoma humanas (*Homo sapiens*).

Las líneas celulares COS-7, HEK-293T y HeLa se obtuvieron de la “European Collection of Animal Cell Cultures” (Salisbury, UK). Las células SH-SY5Y se obtuvieron de la “American Type Culture Collection” (ATCC, LGC Standards). Las células 661W (Fitzgerald *et al.*, 2008) fueron cedidas por la Dra. Roser González-Duarte de la Universidad de Barcelona. Todas esas líneas celulares se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Dulbecco y Freeman 1959; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS), L-glutamina (4 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml); todos estos productos procedentes de Gibco Invitrogen Co. (Carlsbad, CA, EE.UU.). El medio de cultivo de las células 661W se suplementó con 0,002% de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich).

Para la diferenciación de las células SH-SY5Y se cultivaron en medio DMEM suplementado con 0,5% de FBS y ácido retinoico 10 µM (Sigma-Aldrich) durante 36 horas.

Donde está indicado, las células se han tratado con leptomicina B (40 nM), actinomicina D (1 µg/ml) y α -amanitina (100 µg/ml) durante 2 horas o con cicloheximida (CHX; 100 µg/ml) durante los tiempos indicados. Todos estos productos procedían de Sigma-Aldrich. Todas las líneas celulares se mantuvieron en un incubador TC2323 Shel Lab. de Sheldon Manufacturing Inc. (Cornelius, OR, EE.UU.) a una temperatura de 37 °C y una atmósfera con un porcentaje de CO₂ del 5%. Todo el trabajo con cultivos celulares

se realizó en una campana de flujo laminar Bio II A de Telstar Industrial (Terrassa, España).

1.2. BACTERIAS

La cepa de *Escherichia coli* utilizada para las transformaciones, obtención de clones y crecimiento de los plásmidos fue la DH5 α . Las bacterias se cultivaron en medio LB (Luria-Bertani) (1% bactotripton, 1% NaCl, 0,5% extracto de levadura; Sambrook *et al.*, 1989) suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich).

Para la preparación y transformación de células competentes, la purificación de plásmidos, el aislamiento de fragmentos de DNA y las clonaciones se ha seguido la metodología descrita en el libro *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, 1989).

1.3. PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados en este estudio fueron:

pCDNA-CERKL WT-HA: derivado del vector pCDNA (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, EE.UU.) que contiene el cDNA codificante de la isoforma a de la proteína CERKL (NM_201548.4) marcado con el epítipo HA (YPYDVPDYA). Este vector fue generado en el laboratorio de la Dra. Roser González-Duarte de la Universidad de Barcelona.

pCDNA-CERKL WT-Flag: derivado del vector pCDNA (Clontech Laboratories, Inc.) que contiene, además del cDNA codificante de la isoforma a de la proteína CERKL (NM_201548.4), el epítipo Flag (DYKDDDDK). Este plásmido fue generado en el laboratorio para la realización específica de este trabajo.

pCDNA-CERKL 1-256: derivado del vector pCDNA (Clontech Laboratories, Inc.) que contiene el cDNA codificante de esta variante mutante de CERKL, cedido por la Dra. Roser González-Duarte de la Universidad de Barcelona.

pEAK-10-Flag-GFP: derivado del vector pEAK-10 que contiene el cDNA codificante de la proteína GFP. Este plásmido fue cedido amablemente por el Dr. Adrian T. Ting (Mount Sinai School of Medicine, New York, EE.UU.).

pEGFP-LC3: derivado del vector pEGFP que contiene el cDNA codificante de la proteína LC3 fusionada con GFP. Este plásmido fue cedido amablemente por el Dr. Mizushima (Tokyo Metropolitan Institute of Medical Sciences, Tokio, Japón).

1.3.1. Mutantes puntuales

Para la generación de los mutantes puntuales utilizados en este trabajo utilizamos el kit “QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis” (Stratagene/Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.), siguiendo el protocolo del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados para cada una de las construcciones se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la generación de mutantes puntuales

MUTANTE	OLIGO	SECUENCIA (5'-3')
R106S	Directo	CTGTGAAACTGAAACGG AGT TGTTCTG
	Reverso	CAGAACA ACT CCGTTTCAGTTTCACAG
C125W	Directo	TAGGTATCACACTCTTCAT CTGG TTGAAAAAGGAACAAAATAAACT
	Reverso	AGTTTATTTTGTTCCTTTTTCA ACC AGATGAAGAGTGTGATACCTA
W151A	Directo	TTTAAGTGAAGACCACTGTGACATA GCG TTTAGACAGTTCAAGAAAATATTG
	Reverso	CAATATTTICTTGA ACT GTCTAA CGC TATGTCACAGTGGTCTTCACTTAAA

En rojo se indican los tripletes que cambian con respecto al cDNA de CERKL WT y que codifican para el nuevo aminoácido y en rojo más intenso se han destacado los nucleótidos que cambian con respecto a la secuencia original (R106: CGT ; C125: TGC; W151: TGG).

La inserción de la mutación se comprobó mediante secuenciación, analizando la secuencia obtenida con el programa 4Peaks (Nucleobytes B.V., Amsterdam, Países Bajos) y la correcta expresión de las distintas proteínas se analizó mediante Western blot (Figura 9).

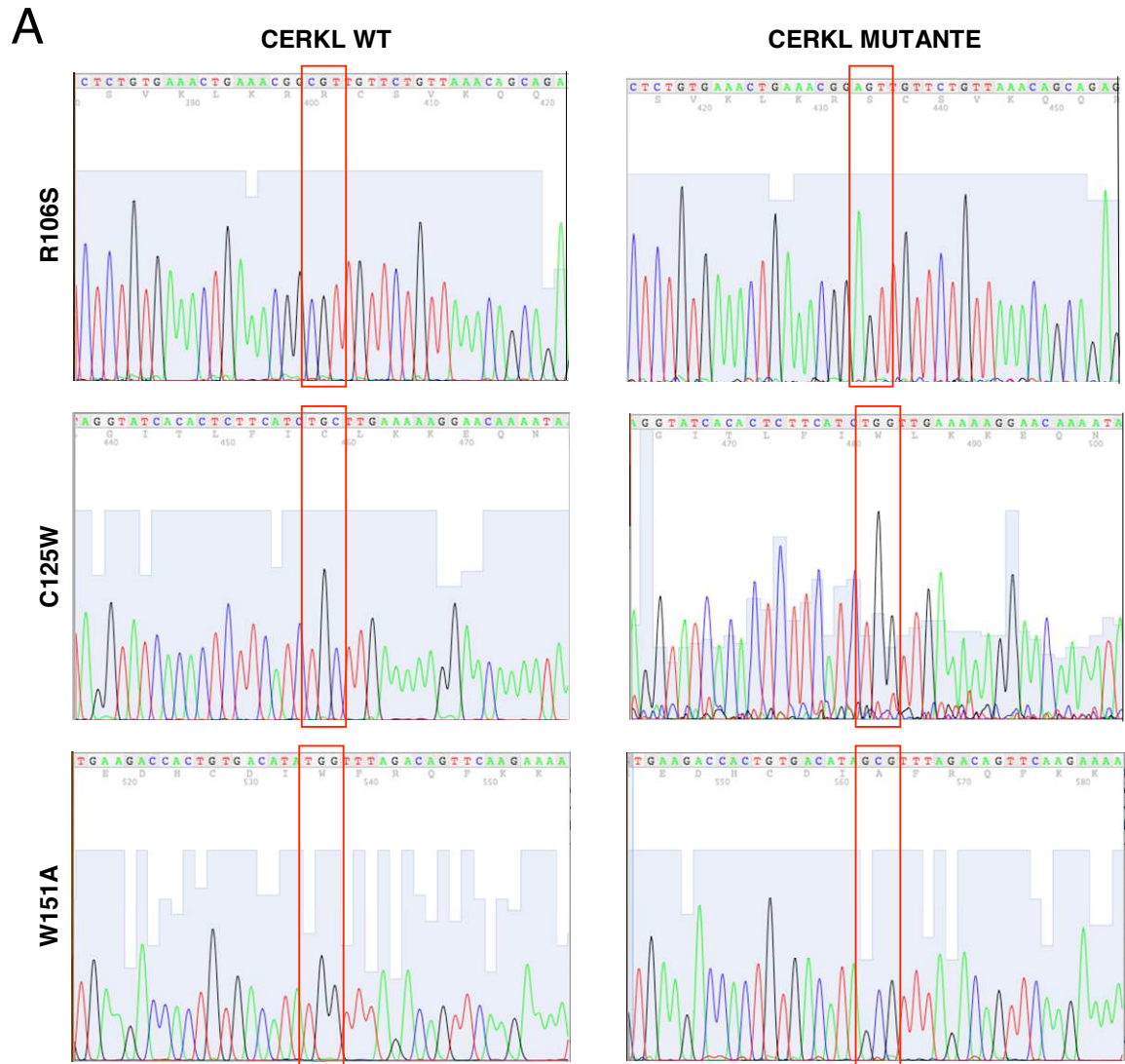
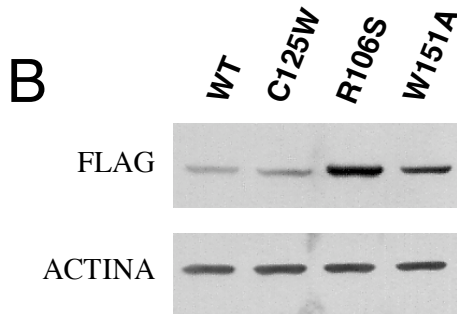


Figura 9. Mutantes puntuales de CERKL. (A) Análisis de la secuencia de los plásmidos generados. Se muestra la secuencia obtenida al secuenciar los plásmidos que codifican para CERKL WT (columna izquierda) y los distintos mutantes generados (columna derecha, de arriba a abajo: R106S, C125W y W151A). El recuadro rojo marca el triplete que codifica para los aminoácidos cambiados. **(B) Comprobación de la expresión de los distintos mutantes.** Se transfectoron células HEK-293T con los plásmidos que codifican las distintas proteínas y el epítipo Flag y, tras 48 horas, se recogieron los extractos celulares y se analizó la expresión de las diferentes formas de CERKL mediante Western blot.



1.4. REACTIVOS

1.4.1. Compuestos utilizados

A continuación se enumeran, por orden alfabético, los principales productos utilizados en este trabajo.

Los productos procedentes de la casa comercial VWR Merck (Radnor, PA, EE.UU.) fueron: acetona, ácido tricloroacético, amonio peroxidisulfato, CaCl_2 , desoxicolato de sodio, glicerol, KCl , KH_2PO_4 , NaCl , Na_2CO_3 , NaF , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaOH , $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, NH_4Cl , Nonidet P-40, sacarosa, tartrato sódico-potásico, TEMED y Tris (Tris-hidroximetil-aminometano).

De la casa Sigma-Aldrich fueron: 2-mercaptoetanol, α -amanitina, ácido retinoico, actinomicina D, albúmina de suero bovino (BSA), arsenito de sodio, azida sódica, azul de bromofenol, cicloheximida, citrato trisódico, colchicina, CuSO_4 , DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro), EDTA, fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF), reactivo de Folin-Ciocalteau, leptomicina B, MgCl_2 , Na_3VO_4 , pepstatina, péptido Flag, proteinasa K, ribonucleasa A (RNasa A), rojo Ponceau, sulfato de dextrano, Tritón X-100, Tween-20 y yoduro de propidio.

Finalmente, los productos que proceden de casas comerciales diferentes a las anteriores fueron los siguientes: acrilamida de Amresco Inc. (Solon, OH, EE.UU.), bactotripton y extracto de levadura de Pronadisa (Torrejón de Ardoz, Madrid, España), ditiotreitól (DTT), dodecil sulfato de sodio (SDS) y formamida de USB (Cleveland, OH, EE.UU.), glicina y geneticina (G418) de Roche (Roche Diagnostics, Basel, Suiza), HCl y NaOH de Fisher Scientific-Afora (Barcelona, España), HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2'-etanosulfónico) de Serva (Heidelberg, Alemania), isopropanol y etanol de Scharlab (Sentmenat, Barcelona, España) y leupeptina de Peptide Institute (Osaka, Japón)

1.4.2. Anticuerpos utilizados

Los anticuerpos utilizados en este estudio se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados

ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA INMUNOFLUORESCENCIA			
PROTEÍNA RECONOCIDA	ORIGEN/DILUCIÓN	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
ACETIL- α -TUBULINA	Ratón/1:100	Abcam ¹	ab24610
ADFP	Conejo/1:100	Abcam	ab52355
β -TUBULINA	Conejo/1:100	Abcam	ab6046
CALNEXINA	Conejo/1:100	Abcam	ab10286
EDC4	Conejo/1:100	Cell Signaling ²	2548
EEA1	Conejo/1:100	Cell Signaling	2411
eIF3B	Conejo/1:100	Abcam	ab40799
eIF4E	Conejo/1:200	Abcam	ab1126
ERGIC53	Conejo/1:100	Sigma-Aldrich	E-1031
HA	Ratón/1:100	Abcam	ab18181
LAMP2a	Ratón/1:100	Abcam	ab25631
P62 (SQSTM1)	Conejo/1:100	Enzo ³	PW-9860-0025
PABP	Conejo/1:300	Abcam	ab21060
PERICENTRINA	Conejo/1:100	Abcam	ab4448
POLIUBIQUITINA	Ratón/1:200	Enzo	PW-0150-0025
RPS3	Conejo/1:100	Cell Signaling	2579
TGN46	Conejo/1:100	Abcam	ab50595
ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA WESTERN BLOT			
ACETIL- α -TUBULINA	Ratón/1:1.000	Abcam	ab24610
ACTINA	Ratón/1:10.000	Sigma-Aldrich	A-2066
CALNEXINA	Conejo/1:1.000	Abcam	ab10286
EGFR	Rata/1:1.000	Abcam	ab231
eIF3B	Conejo/1:2.000	Abcam	ab40799
FLAG	Ratón/1:5.000	Sigma-Aldrich	F3165
GAPDH	Conejo/1:1.000	Trevigen ⁴	2275-PC-1
HA	Ratón/1:1.000	Abcam	ab18181
HISTONA H3	Conejo/1:2.000	Cell Signaling	9715
HSP70	Conejo/1:2.000	Enzo	ADI-SPA-812D
LAMINA	Conejo/1:2.000	Abcam	ab16048
PABP	Conejo/1:2.000	Abcam	ab21060
PORINA	Conejo/1:1.000	Abcam	ab3434
RNasa A	Conejo/1:1.000	Abcam	ab6610

RPL26	Conejo/1:2.000	Abcam	ab59567
RPS3	Conejo/1:2.000	Cell Signaling	2579
RPS6	Conejo/1:2.000	Cell Signaling	2217
α -TUBULINA	Conejo/1:2.000	Abcam	ab126165
β -TUBULINA	Conejo/1:2.000	Abcam	ab6046
VIMENTINA	Ratón/1:1.000	Abcam	Ab8069
ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
IgG-RATÓN-HRP	1:10.000	Sigma-Aldrich	A-4416
IgG -CONEJO-HRP	1:10.000	Sigma-Aldrich	A-6154
IgG -RATA-HRP	1:7.500	Sigma-Aldrich	A-9037
IgG -RATÓN-ALEXA 488	1:400	Invitrogen	A11001
IgG -CONEJO-ALEXA 594	1:400	Invitrogen	A11012

¹ Abcam (Cambridge, Reino Unido)

² Cell Signaling (Beverly, MA, EE.UU.)

³ Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, EE.UU.)

⁴ Trevigen (Gaithersburg, MD, EE.UU.)

1.5. TAMPONES Y OTRAS SOLUCIONES

Los principales tampones y soluciones usados en este trabajo fueron:

Solución de “stripping”: glicina 0,1 M, ajustada a pH 2,3.

Solución de Lowry A: Na₂CO₃ 20 mg/mL y NaOH 4 mg/mL.

Solución de Lowry B: tartrato sódico-potásico 10 mg/mL y CuSO₄ 5 mg/mL.

Tampón de carga de Laemmli para SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida): Tris-HCl 62,5 mM, glicerol 10%, SDS 2,5%, 2-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,001%, ajustado a pH 6,8.

Tampón de electroforesis: Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1%, pH 8,3.

Tampón de transferencia: Tris 25 mM y glicina 192 mM, pH 8,3.

Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 136,9 mM, Na₂HPO₄·2H₂O 16 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM y KCl 2,68 mM, ajustado a pH 7,2-7,4.

Tampón HBS: HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM y CaCl₂ 2,5 mM, pH 7,3.

Tampón HEBS: HEPES 50 mM, NaCl 300 mM y Na₂HPO₄ 1,5 mM, pH 7,05

Tampón RIPA: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, Nonidet P-40 1%, desoxicolato de sodio 0,5 %, suplementado con leupeptina 100 μ M y PMSF 1 mM y ajustado a pH 7,8.

Tampón Tris salino (TBS): Tris 50 mM y NaCl 150 mM, ajustado a pH 7,4.

TBS-Tween (TBS-T): TBS suplementado con Tween 0,05 %.

Tampón de lisis para inmunoprecipitación: 1% Tritón X-100, NaCl 150 mM y Tris/HCl 20 mM, ajustado a pH 7,4.

Tampón de elución para inmunoprecipitación: Tris 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0,2 mM, Tritón X-100 0,1% y glicerol 15%, ajustado a pH 7,4.

Tampón para la incubación de anticuerpos para Western blot: BSA 2% y azida sódica 0,05% en TBS-T.

Tampón citrato sódico salino (SSC) 2x: NaCl 0,3 M y citrato trisódico/HCl 30 mM, ajustado a pH 7,0.

Tampón Tris-EDTA: Tris/HCl 10 mM, EDTA sal disódica 1 mM, ajustado a pH 8,0.

2. METODOLOGÍA UTILIZADA

2.1. MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

2.1.1. Transfección transitoria de cultivos celulares

Para la transfección transitoria de los cultivos celulares se emplearon diferentes agentes en función del tipo celular. Para las células HeLa y COS-7 se utilizó FuGene HD (Roche Diagnostics) y para las SH-SY5Y Metafectene Pro (Biontex Laboratories, München, Alemania), siguiendo en cada caso las instrucciones de los fabricantes. Brevemente, se utilizaron monocapas subconfluentes (80%) de células y tanto el DNA plasmídico como el agente de transfección se diluyeron en medio Opti-MEM de Life Technologies S.A. (Alcobendas, España). La transfección transitoria de las células HEK-293T se realizó mediante fosfato cálcico, adaptando el protocolo de Jordan *et al.*, 1996. Brevemente, se utilizaron monocapas de células al 30% de confluencia, sobre las que se añadió el DNA disuelto en un volumen final correspondiente a una décima parte del volumen del medio HEBS que se añadía suplementado con 125 mM de CaCl₂.

2.1.2. Generación de clones estables

Para la generación de clones estables de células HeLa que expresasen tanto CERKL WT como las formas mutantes, se transfectaron monocapas subconfluentes de células con los distintos plásmidos, utilizando FuGene HD. Tras 48 horas, se añadió a los cultivos G418 (Invivo Gen, San Diego, CA, EE.UU.) (25 µg/ml). Previamente, se determinó la concentración de G418 necesaria para producir la muerte de estas células en aproximadamente 5 días, mediante el análisis de las curvas de crecimiento de las células

a distintas concentraciones del antibiótico. Se mantuvo esta concentración de G418 en el medio de cultivo durante el tiempo suficiente para que la mayoría de las células murieran y quedasen solamente las que tenían resistencia al antibiótico y, por tanto, las que expresaban el plásmido que codificaba para CERKL. Una vez formados los clones, se recogieron con discos de papel Whatmann (VWR) empapados en tripsina y se transfirieron a placas de 96 pocillos. Los clones se dejaron crecer y se comprobó, mediante Western blot, la expresión de las proteínas de interés. La Figura 10 muestra un ejemplo de esas comprobaciones.

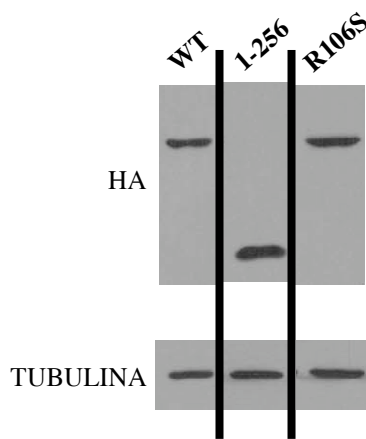


Figura 10. Clones estables de células HeLa que expresan las diferentes formas de la proteína CERKL. Tras seleccionar los clones, las células CERKL WT (WT), CERKL 1-256 (1-256) y CERKL R106S (R106S) se lisaron y la expresión de CERKL se analizó mediante Western blot utilizando anticuerpos anti-HA (arriba). Como control de carga se utilizó anti-tubulina (abajo).

2.1.3. Tratamientos para producir estrés

Para inducir un estrés en los cultivos celulares se utilizaron dos procedimientos. En el primero, se añadió al medio de cultivo arsenito de sodio (ArNa; Sigma-Aldrich) 0,5 mM durante media hora. El segundo procedimiento consistió en un estrés térmico, para el que las células se incubaron a 42-44 °C durante 30 minutos. En los experimentos en los que se añadió cicloheximida tras un tratamiento de estrés, esta se adicionó a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ al medio de cultivo durante los tiempos que se indican en los diferentes experimentos y 15 minutos después de la inducción del estrés.

2.1.4. Obtención de fracciones celulares

2.1.4.1. Aislamiento de una fracción de polisomas

Los polisomas se aislaron según se ha descrito previamente (Bor *et al.*, 2006; Esposito *et al.*, 2010), con algunas modificaciones. Las células HeLa que expresan CERKL WT-HA de forma estable se trataron con cicloheximida (100 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 minutos, se lavaron dos veces con PBS frío y se resuspendieron en una solución que contenía 0,25

M sacarosa, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ y 50 mM Tris pH 7,4, en la que se incubaron durante 10 minutos en hielo. Terminado el tiempo de incubación, las células se homogenizaron utilizando una bomba de cavitación de nitrógeno (Parr Instruments Co., Moline, IL, EE.UU.) durante 7 minutos a 32 psi (~2,2 bar). El homogenado resultante se pasó 5 veces por una aguja de 25G y se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 g. En los controles en los que se disgregaron los polisomas, el sobrenadante de 10.000 g se trató, antes de aplicarlo al gradiente discontinuo de sacarosa (ver abajo), con 15 mM de EDTA durante 15 minutos en hielo o con 100 µg/ml de RNasa A durante 45 minutos a temperatura ambiente. Esta concentración de EDTA permite la disociación de los polisomas pero no disgrega otras partículas ribonucleoproteicas, por lo que se considera un buen control para la detección de proteínas asociadas a polisomas. El sobrenadante, tratado o no, se aplicó sobre un gradiente discontinuo de sacarosa con 4 capas de sacarosa (0,5/1,35/1,6/2,1 M), suplementado con MgCl₂ y 1 mM DTT. Tras centrifugar a 53.000 rpm durante 2 horas en un rotor 70.1 Ti (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, EE.UU.), se recogieron 7 fracciones de 1 ml y el sedimento se resuspendió en tampón de carga de Laemmli. Las fracciones recogidas se precipitaron con ácido tricloroacético al 10% y, después de un par de lavados con acetona fría, las proteínas precipitadas se resuspendieron en tampón de carga de Laemmli y se sometieron a dos ciclos de 80 °C durante 5 minutos, separados por una agitación en vórtex. Estos extractos, junto con el sedimento del gradiente, se analizaron a continuación por Western blot.

En los experimentos realizados para determinar la naturaleza de las fracciones más ligeras del gradiente discontinuo, las fracciones seleccionadas (fracciones 2 y 3 o el sedimento del gradiente discontinuo) se sometieron a un segundo gradiente continuo de sacarosa (0,3-1,5 M), que se centrifugó a 28.000 rpm durante 4 horas en un rotor SW40 (Beckman Coulter). Se recogieron 10-11 fracciones de 1 ml, que se procesaron como se ha descrito arriba para el gradiente discontinuo.

2.1.4.2. Aislamiento de una fracción de citoesqueleto

La fracción de citoesqueleto se obtuvo utilizando el kit de fraccionamiento subcelular de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El sedimento de citoesqueleto obtenido se resuspendió en el tampón de lisis para inmunoprecipitación y se sonicó dos veces a una potencia de 6 vatios durante 20 segundos cada vez, utilizando un sonicador Microson Ultrasonic (QSonica, LLC, Newtown, CT, EE.UU.). La muestra se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos a 4 °C

y el sobrenadante (que corresponde a la fracción citoesquelética) se utilizó para los análisis posteriores.

2.1.4.3. Aislamiento de una fracción de membrana plasmática

La membrana plasmática se obtuvo utilizando el mismo protocolo que el descrito en el apartado 2.1.4.1. para el aislamiento de polisomas, realizando una centrifugación a 20.000 g durante 1 hora previa al gradiente de sacarosa. En este caso, las fracciones ricas en membrana corresponden a las fracciones 2 y 3 del gradiente discontinuo de sacarosa (0,5/1,35/1,6/2,1 M). Una vez recogidas estas fracciones, se precipitaron con ácido tricloroacético al 10%, se lavaron con acetona fría y las proteínas así precipitadas se resuspendieron en tampón de carga de Laemmli y se sometieron a dos ciclos de 80 °C durante 5 minutos, separados por una agitación en vórtex, para su posterior análisis por Western blot.

2.2. IMMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS

2.2.1. Obtención de lisados celulares

Para obtener los extractos celulares, las células se lavaron con PBS, se añadió tampón RIPA (NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, SDS al 0,1% y Tris/HCl 50 mM, pH 7,8), suplementado con PMSF 1 mM y leupeptina 100 µM) y las células se rasparon utilizando un “rubber-policeman” y se recogieron en hielo en tubos de 1,5 ml. Las muestras se sometieron a continuación a 8-10 ciclos de congelación-descongelación, agitando en un vórtex cada vez. Tras centrifugar las muestras a 10.000 g durante 10 min a 4 °C para separar el sedimento, se recogió el sobrenadante, que contiene las proteínas a analizar.

2.2.2. Cuantificación de la concentración de proteína

La cantidad de proteína en los extractos celulares se cuantificó utilizando el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), un método colorimétrico basado en la reducción de los grupos fenólicos de las proteínas. A la muestra se le añade, en primer lugar, una mezcla de dos soluciones (A y B, ver apartado 1.5.) en una proporción 1:1 (v:v) y se incuba durante 10 minutos. La solución A alcaliniza el medio, mientras que el Cu²⁺ que contiene la solución B forma complejos con los enlaces peptídicos de las proteínas, produciendo un cambio conformacional de forma que se exponen los grupos aromáticos

presentes en los triptófanos sobre todo, aunque también en tirosinas. A continuación, se añade la solución de Folin-Ciocalteu 0,07 N y se incuba durante 30 minutos. En este tiempo, la mezcla de los ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico de la solución de Folin-Ciocalteu se reduce por la presencia de los residuos aromáticos, que se oxidan, lo que produce que la solución cambie su color de amarillo a azul de una manera proporcional a la concentración de residuos de triptófano y tirosina en las proteínas. La medida de la absorbancia a 750 nm, con referencia a un patrón de proteínas de concentración conocida, nos indica la cantidad de proteína en cada muestra. La absorbancia se midió utilizando un espectrofotómetro Spectra Max M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.).

2.2.3. Inmunoprecipitación de proteínas

2.2.3.1. Inmunoprecipitación de Flag

La inmunoprecipitación de las proteínas fusionadas con el epítipo Flag se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por O'Donnell *et al.*, 2011, con algunas modificaciones. Las células HEK-293T, expresando de manera transitoria la proteína fusionada con Flag, se lavaron con PBS frío y se lisaron en el tampón de lisis para inmunoprecipitación (Tritón X-100 al 1%, NaCl 150 mM, Tris/HCl 20 mM, pH 7,4), suplementado con leupeptina 0,1 mM, PMSF 1 mM, pepstatina A 10 mM, NaF 50 mM y Na₄P₂O₇ 30 mM. Las células se incubaron en hielo durante 10 minutos y se sonicaron 3 veces durante 20 segundos cada vez a una potencia de 9 vatios utilizando el sonicador Microson Ultrasonic ya mencionado en el apartado 2.1.4.2. El lisado se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4 °C y se recogió el sobrenadante con cuidado. El sobrenadante se incubó durante 1 hora con la resina de agarosa sin conjugar, previamente bloqueada con BSA al 5% durante 1 hora a 4 °C y con agitación. Esta incubación permite eliminar las proteínas que se unen inespecíficamente a la resina de agarosa. Durante este tiempo se bloquea, con BSA al 5% disuelto en tampón de lisis, la resina conjugada con el anticuerpo anti-Flag (M2, Sigma-Aldrich), también a 4 °C. A continuación, el lisado celular se centrifugó a 1.200 rpm durante 2 minutos para separar la resina de agarosa. El sobrenadante obtenido se aplicó ahora a la resina M2 y se incubó durante 1 hora a 4 °C en agitación. A continuación, las muestras se centrifugaron a 1.200 rpm durante 2 minutos y la resina se lavó 5 veces (10 minutos para cada lavado) con el mismo tampón de lisis, pero aumentando la concentración de NaCl a 450 mM, y

una vez más con tampón de elución (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0,2 mM, Tritón X-100 0,1%, glicerol 15%, pH 7,4). Para eluir las proteínas unidas al anticuerpo M2, se incubó la resina en tampón de elución suplementado con 300 $\mu\text{g/mL}$ del péptido Flag (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a 4 °C y en agitación. Después, para recuperar las proteínas, el eluido se pasó por columnas provistas con un filtro de acetato de celulosa con poros de 0,45 μm (Thermo Fisher Scientific) que permitían separar la resina del eluido. Los tratamientos del lisado con RNasa A se realizaron después de incubar el lisado con la resina de agarosa empleada para eliminar las proteínas que se unen inespecíficamente a la resina y justo antes de incubar con la resina M2. Para ello se añadió a los lisados RNasa A (100 $\mu\text{g/mL}$) en presencia de diferentes concentraciones salinas durante 45 minutos a temperatura ambiente y en agitación. En el caso de la inmunoprecipitación a partir de la fracción de citoesqueleto (ver apartado 2.1.4.2), esta fracción se resuspendió en el tampón de lisis para inmunoprecipitación y se sonó 2 veces a una potencia de 5 vatios durante 20 segundos. En este caso, el tiempo de incubación con la resina M2-Flag se amplió a 16 horas. En la inmunoprecipitación a partir de las fracciones 2 y 3 del gradiente discontinuo de sacarosa, esas fracciones se diluyeron en el mismo volumen de tampón de lisis para inmunoprecipitación con el fin de reducir su alta densidad debida a la presencia de sacarosa. Aquí también, el tiempo de incubación con la resina M2 fue de 16 horas.

2.2.3.2. Inmunoprecipitación de HA

Para la inmunoprecipitación con resina de agarosa conjugada con el anticuerpo anti-HA (Thermo Fisher Scientific) se llevaron a cabo los mismos procedimientos que para la inmunoprecipitación de Flag (ver apartado 2.2.3.1), excepto en la elución, que se realizó resuspendiendo la resina en tampón de carga de Laemmli 2X y calentándola a 80 °C durante 10 minutos.

2.2.3.3. Ensayo de unión a 7-metilguanosina

El inmunoprecipitado procedente de la inmunoprecipitación de Flag se incubó con resina de Sefarosa conjugada con 7-metilguanosina (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, EE.UU.), que es un análogo de la estructura 5'CAP del RNA mensajero. Como control se utilizó resina de Sefarosa 4B sin conjugar (GE Healthcare Life Sciences), que también se usaba para preclarificar las muestras. Las muestras se incubaron durante 12 horas a 4 °C en agitación, tras lo que se centrifugaron a 5.000 g

durante 5 minutos y se lavaron 3 veces con el tampón de lisis para inmunoprecipitación, suplementado con NaCl 450 mM. Las proteínas se eluyeron incubando la resina en tampón de carga de Laemmli durante 10 minutos a 70 °C, y se separaron de la resina utilizando columnas de acetato de celulosa de Thermo Fisher Scientific.

2.2.4. SDS-PAGE, transferencia electroforética y Western blot

Las muestras de proteínas fueron analizadas mediante electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (geles desnaturizantes de SDS-PAGE). El porcentaje de acrilamida varió dependiendo del peso molecular de la proteína de interés. Los geles se montaron sobre soportes verticales Mighty Small de Hoefer (San Francisco, CA, EE.UU.) y se sometieron a un voltaje continuo de 120 voltios. Para la transferencia de las proteínas desde los geles de SDS-PAGE a membranas de PVDF (EMD Millipore, Billerica, MS, EE.UU.) se empleó el sistema de transferencia húmeda. El gel y la membrana de PVDF previamente activada en metanol se colocaron entre papeles Whatman-3MM empapados en el tampón de transferencia. La transferencia se efectuó a 30 voltios durante toda la noche a 4 °C. Tras verificar la transferencia mediante tinción reversible con el colorante rojo Ponceau S (Rojo Ponceau S al 0,2% en ácido tricloroacético del 3%), las membranas se bloquearon con una solución de leche en polvo desnatada disuelta al 5% en TBS-T (Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 0,05%, pH 7,4) durante 2 horas a temperatura ambiente y se incubaron con el anticuerpo correspondiente durante 16 horas a 4 °C. Las membranas se lavaron 3 veces en TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T y el revelado de las bandas de proteína se efectuó mediante el sistema Lumi-Light de Roche Diagnostics o el ECL Prime (GE Healthcare Life Sciences), exponiendo una película autorradiográfica Medical X-Ray Film de Kodak (Rochester, NY, EE.UU.).

Para la detección de más de una proteína en la misma membrana de PVDF se realizó un “stripping” con tampón glicina/HCl 0,1 M, pH 2,5 durante 10 minutos, tras lo que se lavó la membrana varias veces con TBS, se volvió a bloquear y se incubó con los anticuerpos correspondientes.

2.2.5. Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Las células se sembraron sobre cubreobjetos y, tras los tratamientos correspondientes, se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (al 4% en PBS, pH 7,4) durante

20 minutos a temperatura ambiente. Para las inmunolocalizaciones de las proteínas del citoesqueleto acetil α -tubulina y β -tubulina, las células se fijaron en paraformaldehído al 2% durante 10 minutos. En los controles en los que se disgregaron los microtúbulos, se realizó un tratamiento previo de las células con 1 μ g/ml de colchicina (Sigma-Aldrich) durante 2 horas. Tras varios lavados, las células se trataron con NH_4Cl (75 mM) y glicina (20 mM) durante 10 minutos y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,3% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras varios lavados con PBS, las células en los cubreobjetos se incubaron con una solución de bloqueo (BSA al 5% y Tritón X-100 al 0,05% en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron los cubreobjetos durante 1 hora a 37 °C con un anticuerpo dirigido contra el epítipo HA junto con uno de los siguientes anticuerpos (ver apartado 1.4.2): anti-calnexina, anti-TGN46, anti-EEA1, anti-LAMP2a, anti-eIF4E, anti-eIF3B, anti-PABP, anti-ADFP, anti-EDC4, anti-pericentrina, anti acetil α -tubulina y anti- β -tubulina, anti ERGIC 53, anti-RPS3, anti-proteínas poliubiquitinadas y anti-P62/SQSTM1 en la misma solución. Después de lavar los cubreobjetos con la misma solución de incubación de los anticuerpos (tres lavados de 10 minutos), las células se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con Alexa-488 o Alexa-594 durante 1 hora a 37 °C. A continuación, se llevó a cabo una incubación adicional con el reactivo DAPI (1 μ g/ml; Sigma-Aldrich) para teñir el DNA, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con FluorSave (Merck-Calbiochem, Darmstadt, Alemania) o Fluoprep (BioMérieux, Marcy l’Etoile, Francia). Para la obtención de las imágenes se utilizó un microscopio confocal SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) o un microscopio Axio Observer Z1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania) equipado con un sistema de seccionamiento óptico ApoTome. Los controles se llevaron a cabo en ausencia de anticuerpos primarios. En los estudios de colocalización, los controles de cruzamiento de anticuerpos secundarios se realizaron incubando las células con cada anticuerpo primario seguido del anticuerpo secundario de otra especie.

2.3. HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Para detectar los RNAs mensajeros con colas de poli-adenosina, utilizamos una sonda sintética de poli-timidina de 50 nucleótidos marcada con biotina en su extremo 5' (Sigma-Aldrich). Las células, sembradas sobre cubreobjetos, se trataron como se explica en el apartado 2.2.5, exceptuando que en la solución de bloqueo se añadieron

tRNAs de *E. coli* a una concentración de 1 mg/ml (cedido por el laboratorio de la Dra. Armengod). Las células se equilibraron a temperatura ambiente durante 10 minutos en el tampón SSC 2X (NaCl 0,3 M, citrato trisódico/HCl 30 mM, pH 7,0) conteniendo formamida al 15% y NaH₂PO₄ 10 mM. La hibridación con la sonda se realizó durante 2 horas a 37 °C en NaH₂PO₄ 20 mM, formamida al 15%, BSA al 1%, sulfato de dextrano al 10%, todo en SSC 2X y conteniendo 0,5 mg/ml de tRNAs de *E. coli*, 0,5 mg/ml de DNA desnaturalizado de esperma de salmón y 250 ng/ml de la sonda. Terminado el tiempo de hibridación, las células se lavaron en formamida al 15% en SSC 2X (ver apartado 1.5) a 37 °C durante 20 minutos y tres veces en SSC 1X durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, las células se incubaron con estreptavidina conjugada con Alexa 488 (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific) a una dilución 1/300 durante 1 hora a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados de 15 minutos en agitación con la solución de incubación de los anticuerpos (BSA al 5% y Tritón X-100 al 0,05% en PBS). Por último, se realizó una última incubación con DAPI para marcar los núcleos y las preparaciones se montaron con el líquido de montaje como en el apartado 2.2.5. Como control, las células se incubaron directamente con la estreptavidina conjugada con Alexa 488 sin una incubación previa con la sonda.

2.4. MANIPULACIÓN DE RNA

2.4.1. Purificación de RNA

El RNA se purificó utilizando el kit “MasterPureTM Purification Kit” de Epicentre (Madison, WI, EE.UU.). Brevemente, la muestra se digirió con Proteinasa K (0,16 µg/µl) durante 15 minutos a 65 °C, tras lo que se procedió a la precipitación de los ácidos nucleicos presentes en ella con isopropanol. Tras dos lavados con etanol al 70%, se resuspendieron los ácidos nucleicos totales en tampón Tris-EDTA y se eliminó el DNA contaminante con DNasa I (0,025 U/µl). Tras varios lavados, el RNA se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol al 70%. El RNA purificado, resuspendido en tampón Tris-EDTA, se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

2.4.2. Secuenciación del RNA

La secuenciación del RNA purificado a partir de la inmunoprecipitación de CERKL-Flag y Flag-GFP se llevó a cabo por el Servicio de Genómica del Parque Científico de

Madrid. Para este fin se utilizó el sistema Illumina GAIIx, que se basa en el uso de los cuatro nucleótidos (A, C, T, G) marcados con fluorescencia de distintos colores. Estos nucleótidos modificados contienen terminaciones reversibles, lo que permite que cada ciclo del proceso de secuenciación ocurra en presencia de los cuatro nucleótidos simultáneamente. Como material de partida se utilizaron 2 μg del RNA purificado en la inmunoprecipitación, que se volvió a purificar, tras lo que el RNA se fragmentó mediante el uso de cationes divalentes a altas temperaturas. A continuación, estos fragmentos se utilizaron como molde para sintetizar el DNA complementario (cDNA) que se clonó generando una librería que se utilizó para la secuenciación posterior utilizando un secuenciador Genome Analyzer IIX System (GAIIx, Illumina, San Diego, CA, EE.UU.).

2.4.3. Análisis de las secuencias de RNA

Las muestras secuenciadas por el sistema Illumina GAIIx fueron previamente demultiplexadas y se pasaron por control de calidad usando la herramienta FASTQC (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>). En base a los datos de calidad y a un cartografiado previo de prueba, se aplicó un filtro de calidad suave usando la herramienta Prinseq-Lite (Schmieder y Edwards, 2011), eliminando el primer nucleótido en el extremo 5' dada la frecuencia de indeterminaciones en esta posición, y se eliminaron aquellas secuencias cuya calidad promedio no superase una calidad de al menos 5 (asumiendo PHRED 33 como 0), al tiempo que también se aplicaron cortes en ambas colas para aquellas secuencias cuyas colas no superasen dicha calidad mínima establecida. Se usó el “splice junction mapper” TopHat (Kim *et al.*, 2013) para cartografiar sobre la referencia humana hg19 de UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>). Se utilizó la herramienta RIPSeeker (Li *et al.*, 2013) para realizar predicciones a partir del RNA inmunoprecipitado (RIP) mediante perfiles HMM sobre la muestra de CERKL, usando la muestra GFP como control y con anotación basada en ENSEMBL_ID vía Biomart. Mediante este análisis se obtuvieron 5.557 predicciones sobre transcritos asociados a la proteína CERKL, a las que se aplicó un filtro en base al valor obtenido por eFDR (“empirical FALSE DISCOVERY RATE”) establecido a un corte de 0,25. Se usó igualmente la herramienta RIPSeeker para determinar el enriquecimiento (GO) en el contexto genómico asociado a los RIPs de la muestra CERKL. Mediante la herramienta RIPSeeker y combinando los comandos “ComputeRPKM” y “RulebaseRIPSeek” se

cuantificó la expresión en unidades de RPKM (“reads per kilobase of exon per million mapped reads”) y se determinó el incremento entre ambas muestras.

2.4.4. PCR cuantitativa a tiempo real

Para la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real, se utilizaron 5 ng de RNA purificado como molde junto con 10 μ L de 2X SYBER Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), 5 U de transcriptasa reversa (Applied Biosystems), 2 U de inhibidor de RNasa (Applied Biosystems) y 0,1 mM de los cebadores (directo y reverso) del mensajero de interés en un volumen final de 20 μ L. La PCR se llevó a cabo en un termociclador StepOne™ System (Applied Biosystems) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las parejas de cebadores utilizadas fueron las siguientes:

- Gen MTRNR2L2: Directo: 5' AGCGTTCAAGCTCAACACCT 3'
Reverso: 5' TGGCTTGTTGGTTGGTTGTA 3'
- Gen MTRNR2L6: Directo: 5' CATATGTTCAACGGCCACAG 3'
Reverso: 5' TCATGTTTCGCCTCTTCACAG 3'
- Gen MTRNR2L8: Directo: 5' TGGCTCCACGAGGGTTCA 3'
Reverso: 5' CTTACGGGCAGGTCAATTT3'
- Gen RN7SL2: Directo: 5' ATCGGGTGTCCGCACTAAGT 3'
Reverso: 5' CACCCCTCCTTAGGCAACCT3'
- Gen GAPDH: Directo: 5' GCCCCCGGTTTCTATAAATTG 3'
Reverso: 5' GTCGAACAGGAGGAGCAGAGA 3'
- Gen ANT2: Directo: 5' CGGGTTGACTTCCTATCCATTT 3'
Reverso: 5' CACCCCTCCTTAGGCAACCT 3'
- Gen β -ACTINA: Directo: 5' TGAGCGCGGCTACAGCTT 3'
Reverso: 5' TCCTTAATGTCACGCACGATT 3'

2.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Las proteínas inmunoprecipitadas (ver apartados 2.2.3.1. y 2.2.3.2.) se separaron mediante geles de poliacrilamida al 8 y al 20% y los geles se remitieron al servicio de proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe para su posterior tratamiento. Los geles se tiñeron con plata y las bandas diferenciales que se encontraban presentes en la muestra de CERKL con respecto al control GFP se seccionaron y se digirieron con

tripsina (Shevchenko *et al.*, 1996). Tras concentrar las soluciones peptídicas obtenidas, se inyectaron en una columna de cromatografía líquida, donde, después de separar los diferentes péptidos, se analizaron mediante espectrometría de masas (Nano ESQqTOF, AB SCIEX, Framingham, MA). La identificación de las proteínas se realizó mediante el programa ProteinPilot (AB SCIEX), utilizando la base de datos de ExPasy como referencia. Se consideraron válidas las proteínas representadas por al menos tres péptidos con una puntuación >50 (minimum overall MASCOT score >50).

2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos para determinar la significancia de las diferencias encontradas entre los distintos grupos se realizó mediante el test de análisis de la varianza (ANOVA). Para analizar las diferencias entre dos grupos se realizó un test t de Student. Se consideraron significativos valores de p menores de 0,05: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$.

RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

1. La proteína CERKL se encuentra localizada en el núcleo y citoplasma y, en este, una porción de la proteína forma agregados que no colocalizan con ninguno de los principales orgánulos de la célula

Una primera aproximación para intentar comprender la función de la proteína CERKL, implicada en retinosis pigmentaria (ver Introducción general), consiste en estudiar su localización intracelular y la de sus mutantes. Puesto que los niveles de expresión de CERKL endógeno en la mayoría de las células son muy bajos (Bornancin *et al.*, 2005), transfectamos células COS-7 con un plásmido que codificaba para la isoforma conservada de 532 aminoácidos de CERKL y que además estaba marcada con el

CERKL WT-HA

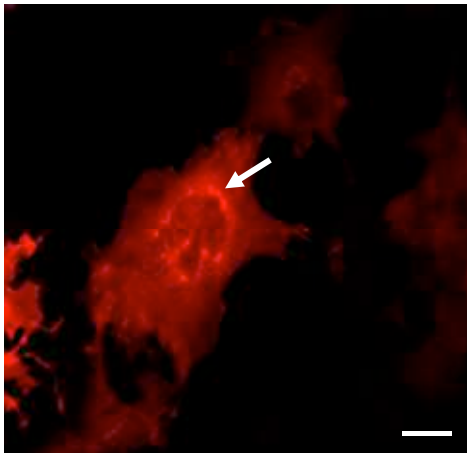


Figura 11. CERKL se encuentra localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma de células COS-7. Se transfectaron transitoriamente células COS-7 con el plásmido CERKL WT-HA y, al cabo de 48 horas, se fijaron y se incubaron sucesivamente con el anticuerpo anti-HA y el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594. Se observa la localización de CERKL en el núcleo y en el citoplasma. En este último, la proteína se encuentra tanto con una distribución difusa como en forma de acúmulos (flecha). Barra: 10 μ m.

epítipo HA (CERKL WT-HA). Después, analizamos su localización mediante inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo anti-HA. Observamos así que CERKL se encontraba tanto en el núcleo como en el citoplasma (Figura 11). En el citoplasma, aunque la mayor parte de CERKL presenta un patrón difuso, la proteína se encuentra a veces (aproximadamente en un 35% de las células) formando unos agregados que preferentemente se disponen con una localización perinuclear. Este patrón podría ser indicativo de una localización parcial de CERKL en algún orgánulo del citoplasma. Por eso, nos planteamos analizar la colocalización de CERKL con marcadores de los principales orgánulos celulares. De hecho, existen en la bibliografía ya datos, aunque muy contradictorios, sobre una supuesta localización de CERKL en algún orgánulo celular. Así por ejemplo, algunos autores describen la colocalización de CERKL

con marcadores del retículo endoplasmático y del complejo de Golgi (Tuson *et al.*, 2009), mientras que otros afirman lo contrario (Rovina *et al.*, 2009).

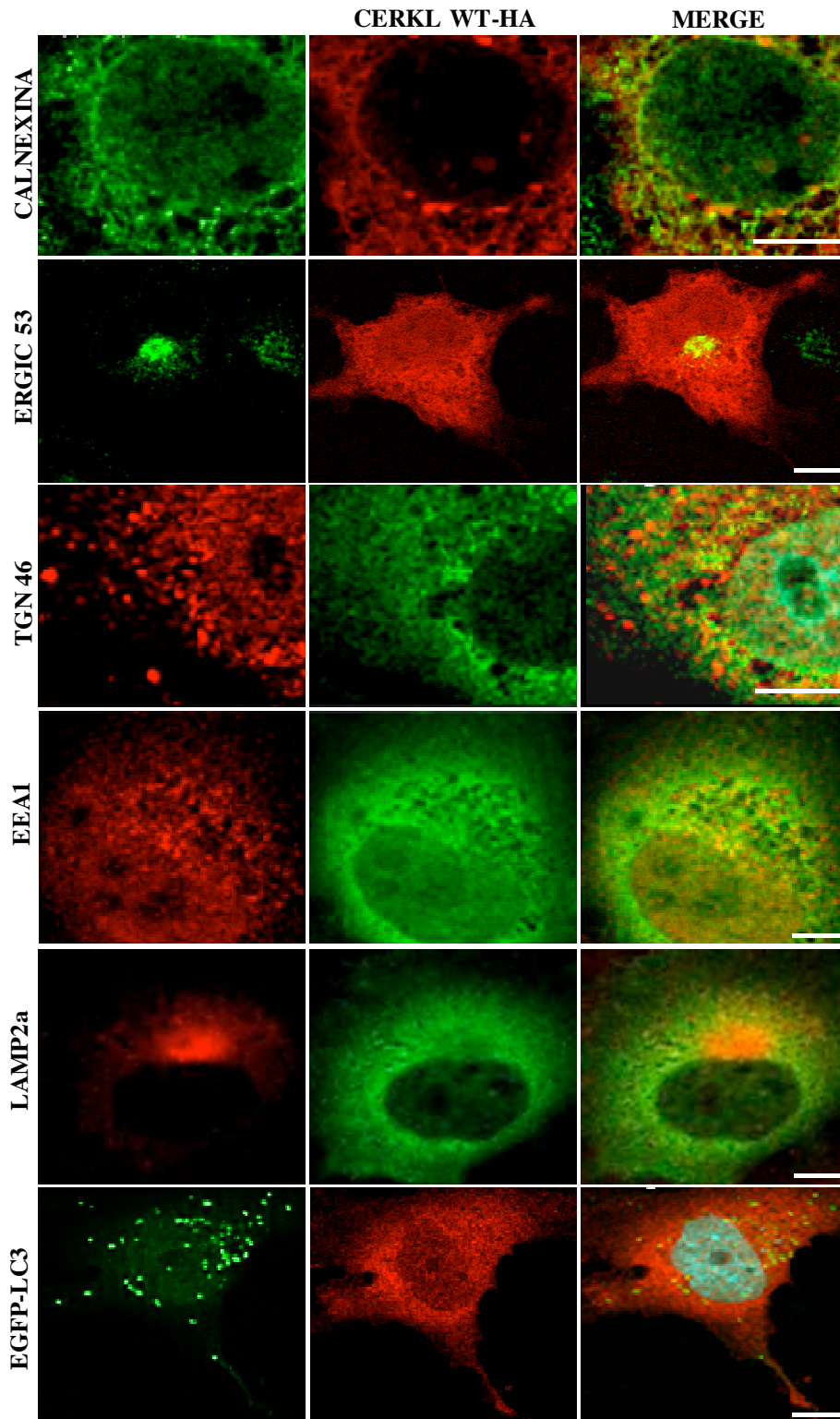


Figura 12. Análisis de una posible localización de CERKL en diferentes orgánulos celulares. Se transfectaron transitoriamente células COS-7 con el plásmido CERKL WT-HA. Tras 48 horas, se fijaron y se incubaron con el anticuerpo anti-HA y, a continuación, con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594 (rojo) o con Alexa 488 (verde). Para el marcaje de los diferentes orgánulos se han utilizado también anticuerpos que reconocen las siguientes proteínas: calnexina (retículo endoplasmático), ERGIC 53 (compartimento intermedio retículo-Golgi), TGN 46 (red *trans* del Golgi), EEA1 (endosomas tempranos), LAMP2a (lisosomas y endosomas tardíos). Para detectar LC3 (fagoforo y autofagosomas) se superexpresó la proteína fluorescente EGFP-LC3. En todos los casos no se observa colocalización alguna. Todas las barras: 10 μ m.

Nuestros resultados (Figura 12) no muestran colocalización de la proteína CERKL con los marcadores empleados para esos dos compartimentos celulares y que incluyen a la calnexina (del retículo endoplasmático), a la proteína ERGIC 53 (del compartimento intermedio entre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi o, en inglés, “endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment”, ERGIC) y a la proteína TGN46 (del la red *trans*-Golgi, TGN). Asimismo, tampoco encontramos colocalización alguna de CERKL con proteínas de compartimentos relacionados con el sistema endosomal-lisosomal, como la proteína EEA1 (de endosomas tempranos), LAMP2a (de endosomas tardíos y lisosomas) o, tras transfectar las células con un plásmido que codifica para la construcción EGFP-LC3, con la proteína LC3-II (marcadora del fagoforo y de autofagosomas) (ver Figura 12). Finalmente y de acuerdo con otros datos, CERKL tampoco colocalizó con marcadores de mitocondrias (datos no mostrados).

Debido a la elevada homología de CERKL con la proteína CERK (una quinasa de ceramidas), se ha postulado que CERKL podría intervenir en la modificación y/o en el metabolismo de lípidos (Tuson *et al.*, 2004). Por tanto, era posible que los agregados de CERKL colocalizasen con las gotas/cuerpos lipídicos/os de la célula. Estas son unas estructuras que actúan como reserva energética y que están formadas por un núcleo de triglicéridos y ésteres de colesterol revestidos por una monocapa de fosfolípidos con proteínas asociadas (Pol *et al.*, 2014). Como marcador de estas estructuras utilizamos una de esas proteínas, la proteína ADFP (proteína relacionada con la diferenciación adiposa), que se localiza en la membrana de las gotas lipídicas y que interviene en la diferenciación de los adipocitos (Brasaemle *et al.*, 1997). Una vez más, no pudimos observar una colocalización clara de CERKL con la estructura analizada, en este caso las gotas lipídicas marcadas con la proteína ADFP (Figura 13A), lo que nos indica que los agregados observados de CERKL tampoco se encuentran en esos componentes celulares. Por otro lado, puesto que esos agregados de CERKL no colocalizaban con ninguno de los orgánulos analizados, era posible que su formación fuese debida a la agregación en el citosol de la proteína CERKL causada por su superexpresión y precipitación al estar producida en exceso y/o por su mal plegamiento. Para comprobar si los agregados de CERKL se formaban mediante estos procesos, comparamos, con anticuerpos específicos, su localización con la de cadenas de poliubiquitinas, ya que es sabido que la mayoría de los agregados de proteínas se poliubiquitina para actuar como una señal que marque las proteínas para, posteriormente, tratar de degradarlas por los proteasomas 26S y 30S (Yokota *et al.*, 2000; Knecht *et al.*, 2009). Sin embargo, y una

vez más, tampoco aquí observamos un marcaje en los agregados de CERKL con los anticuerpos que reconocen a las cadenas de poliubiquitina (Figura 13B), lo que nos indica que esos acúmulos tampoco se deben a que la superexpresión de CERKL produzca la formación de agregados de la misma que estén poliubiquitinados. Esta conclusión está apoyada además por el hecho de que no hayamos observado tampoco colocalización de los agregados de CERKL con otro marcador de esas estructuras, como es la proteína p62 (Figura 13C), que está encargada mayoritariamente del transporte de las proteínas poliubiquitinadas a la vía macroautofágica para ser degradadas, aunque también se ha observado que p62 se acumula cuando los proteasomas están inhibidos.

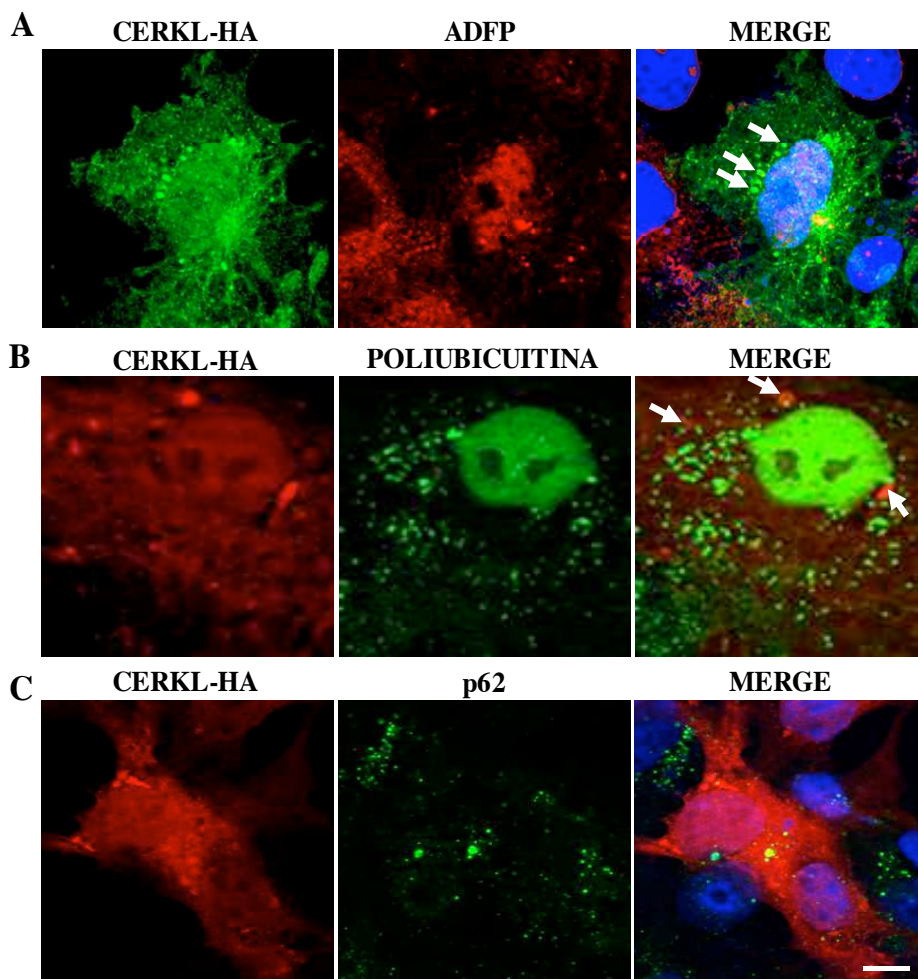
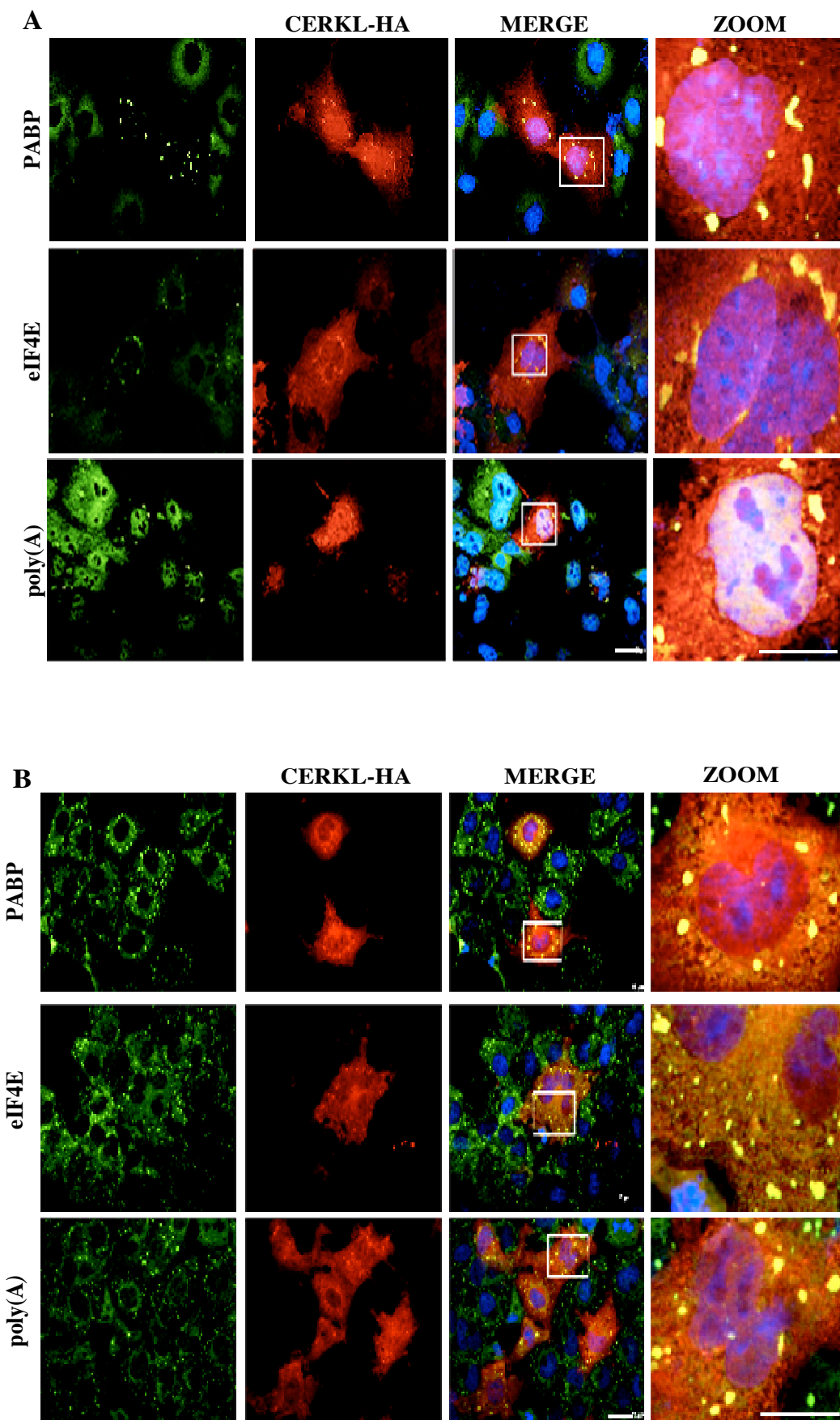


Figura 13. Análisis de la posible colocalización de CERKL con cuerpos lipídicos y con acúmulos proteicos. Se transfectaron transitoriamente células COS-7 con el plásmido CERKL WT-HA y, tras 48 horas, se fijaron y se incubaron sucesivamente con el anticuerpo anti-HA y el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594 (rojo) o Alexa 488 (verde). Para el marcaje de los cuerpos lipídicos se utilizaron anticuerpos que reconocen a la proteína ADFP (A) y, para los acúmulos proteicos, anticuerpos anti-poliubiquitina (B) y anti-p62 (C). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y las flechas muestran los acúmulos de CERKL WT-HA. Una vez más, no se observa colocalización alguna. Barra: 10 μ m.

En resumen, CERKL se encuentra en el núcleo y en el citoplasma y en este último aparece ocasionalmente con una localización puntual que no corresponde a ninguno de los orgánulos o estructuras más habituales presentes en la mayoría de las células.

2. CERKL colocaliza con marcadores de gránulos de estrés

Otro tipo de estructuras citoplasmáticas presentes en las células son los gránulos de estrés, que consisten en agregados ribonucleoproteicos formados por RNAs mensajeros (mRNAs) y por proteínas asociadas (Anderson y Kedersha, 2002; Kedersha y Anderson, 2007). Estos agregados se forman en respuesta a diferentes tipos de estrés, permitiendo que la mayor parte de los mensajeros queden retenidos en estos compartimentos en una forma inactiva traduccionalmente. Esto supone un ahorro energético para la célula estresada a nivel de la síntesis de proteínas y, a su vez, evita la degradación de los mRNAs (Kedersha y Anderson, 2009). Una vez desaparece el estrés, los gránulos se desensamblan y los mRNAs vuelven a formar parte de los polisomas, permitiendo así recuperar con rapidez la traducción de las proteínas para las que codifican (Anderson y Kedersha, 2002). Puesto que CERKL se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma (ver Figura 11), existía la posibilidad de que su función se relacionase de alguna manera con los mRNAs y, por tanto, que la localización de los agregados de CERKL correspondiera, al menos en parte, con la de esos gránulos de estrés. Utilizando diversos marcadores de estos gránulos, como por ejemplo la proteína PABP (proteína de unión a poli-A), el factor de iniciación eIF4E y la propia presencia de mRNAs detectada mediante hibridación *in situ* utilizando una sonda de oligo-d(T), observamos que, efectivamente, los agregados de CERKL colocalizaban claramente con ellos (Figura 14A). Por otro lado, se sabe que al someter las células a situaciones de estrés, como por ejemplo un tratamiento con ArNa o un choque térmico, la proporción de gránulos de estrés aumenta (Grousl *et al.*, 2009). Por eso, transcurridas 24 horas de la transfección que realizábamos para visualizar CERKL, sometimos también a las células COS-7 a un tratamiento con ArNa (500 μ M) durante 30 minutos (Figura 14B), o bien las incubamos a 44 °C durante 30 minutos también (Figura 14C). En ambos casos pudimos observar que, como era de esperar, la formación de gránulos de estrés aumentaba y que también lo hacía la colocalización de CERKL con los mismos. Por tanto, estos resultados venían a confirmar la conclusión de que los agregados de CERKL observados en el citoplasma en las condiciones empleadas para visualizar CERKL corresponden mayoritariamente a gránulos de estrés.



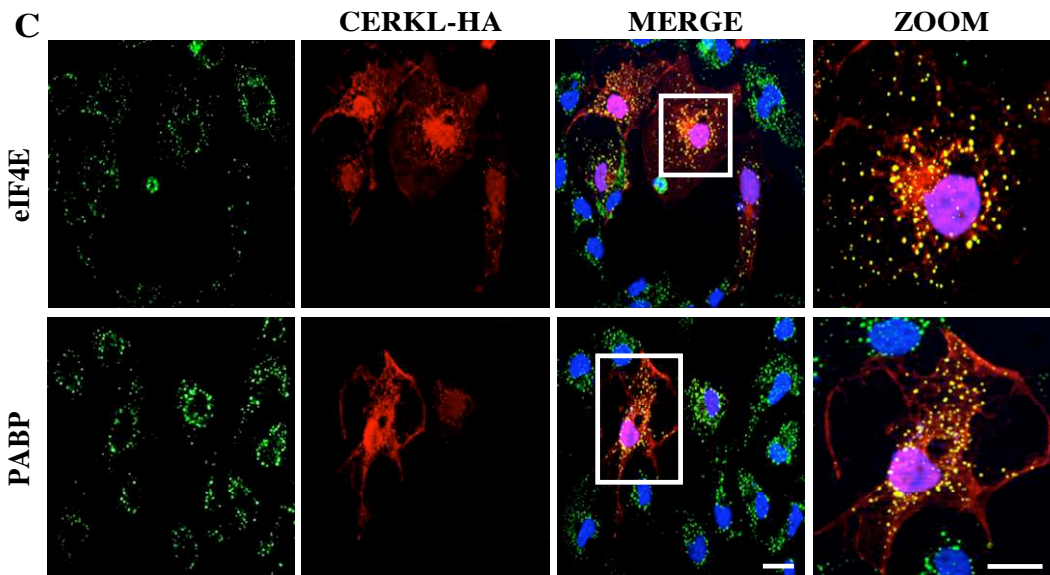


Figura 14. En células COS-7, la proteína CERKL se encuentra en parte localizada en gránulos de estrés. Se transfectaron transitoriamente células COS-7 con el plásmido CERKL WT-HA y, tras 48 horas, se fijaron y se incubaron sucesivamente con el anticuerpo anti-HA y el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594 (rojo) o Alexa 488 (verde). Para el marcaje de los gránulos de estrés se han utilizado anticuerpos que reconocen a las proteínas PABP y eIF4E y para detectar la cola poli A de los mRNAs la sonda oligo d(T). (A) Células no tratadas. (B) Células incubadas con arsenito sódico ($500 \mu\text{M}$) durante 30 min. (C) Células sometidas a choque térmico ($44 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 30 min. Los rectángulos en MERGE corresponden a la ampliación mostrada en ZOOM. Todas las barras: $10 \mu\text{m}$.

Uno de los mecanismos que induce la formación de gránulos de estrés es la entrada de material genético exógeno en las células, como ocurre tras una infección por patógenos (Beckham y Parker, 2008). Esto explicaría que la entrada de DNA plasmídico en ellas pudiera ser un inductor de la formación de los gránulos de estrés que observábamos en las células transfectadas para que expresasen niveles detectables de CERKL. Además, la propia superexpresión de proteínas a partir de un DNA plasmídico puede suponer un estrés para muchas células, de modo que, dependiendo del tipo celular, se puede producir una mayor o menor formación de gránulos de estrés. Sin embargo, esto no implica necesariamente que cualquier proteína superexpresada forme parte de los gránulos de estrés, como se muestra en la Figura 15 para la proteína GFP que se utilizaba como control. En cambio, la superexpresión de algunas proteínas de unión a mRNA (*e.g.* G3BP, TIA-1, etc.) sí se sabe que causa la formación de gránulos de estrés y la localización en ellos de la proteína superexpresada (Gilks *et al.*, 2004). Por lo tanto, el hecho de que CERKL, al superexpresarse, induzca la formación de gránulos de estrés y se localice en ellos podría ser indicativo de que se tratase de una proteína de unión a mRNAs, una posibilidad que analizaremos más adelante.

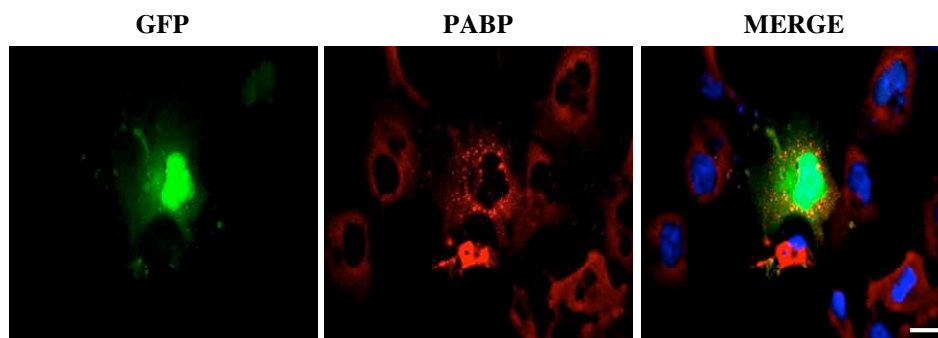


Figura 15. La superexpresión de GFP induce la formación de gránulos de estrés, pero no colocaliza con ellos. Se transfectaron transitoriamente células COS-7 con el plásmido Flag-GFP y, tras 48 horas, se fijaron y se incubaron sucesivamente con el anticuerpo anti-PABP (marcador de gránulos de estrés) y el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594 (rojo). Se observan gránulos de estrés, pero no colocalizan con GFP. Barra: 10 μ m.

A continuación, investigamos si la localización de CERKL observada en las células COS-7 era extensible a otros modelos celulares y, por tanto, no era debida al tipo celular empleado. Para ello, transfectamos células HeLa con el plásmido CERKL WT-HA. Los resultados obtenidos (Figura 16A) pusieron de manifiesto que CERKL se distribuía, como en el caso de las células COS-7, entre el núcleo y el citoplasma, pero que en este último tenían una apariencia totalmente difusa y sin llegar a formar los agregados de CERKL que habíamos localizado en los gránulos de estrés de las células COS-7. Sin embargo, al someter las células HeLa a un choque térmico (44 °C, 30 minutos) observábamos de nuevo la formación de agregados de CERKL en los gránulos de estrés, detectados aquí con los marcadores eIF4E y PABP (Figura 16B). Es decir, estos resultados sugieren que los agregados de CERKL localizados en los gránulos de estrés se producen por la superexpresión de la proteína, pero esto solo ocurre de manera manifiesta en algunas células (como COS-7) pero no en otras (como HeLa). Sin embargo, en ambos casos, CERKL sí se encontraría en esas estructuras al emplear condiciones más drásticas de estrés, como el tratamiento con ArNa o el choque térmico. Durante este trabajo, generamos también unas líneas de células HeLa que expresaban de manera estable la proteína CERKL-HA para evitar su superexpresión. Cuando estas células se cultivaron en condiciones normales no se observaron los gránulos de estrés conteniendo CERKL (datos no mostrados y ver más adelante la figura 26), como era de esperar por los resultados mostrados anteriormente (ver Figura 16A). Por el contrario, cuando se sometieron esas células a un estrés con ArNa o choque térmico, CERKL colocalizaba de nuevo y como anteriormente (ver Figura 16B) con los marcadores de

gránulos de estrés (datos no mostrados). En resumen pues, todos estos resultados permiten concluir que la localización de CERKL en gránulos de estrés no se debe solo a la superexpresión transitoria empleada para facilitar su localización ni tampoco es exclusiva de un determinado tipo celular.

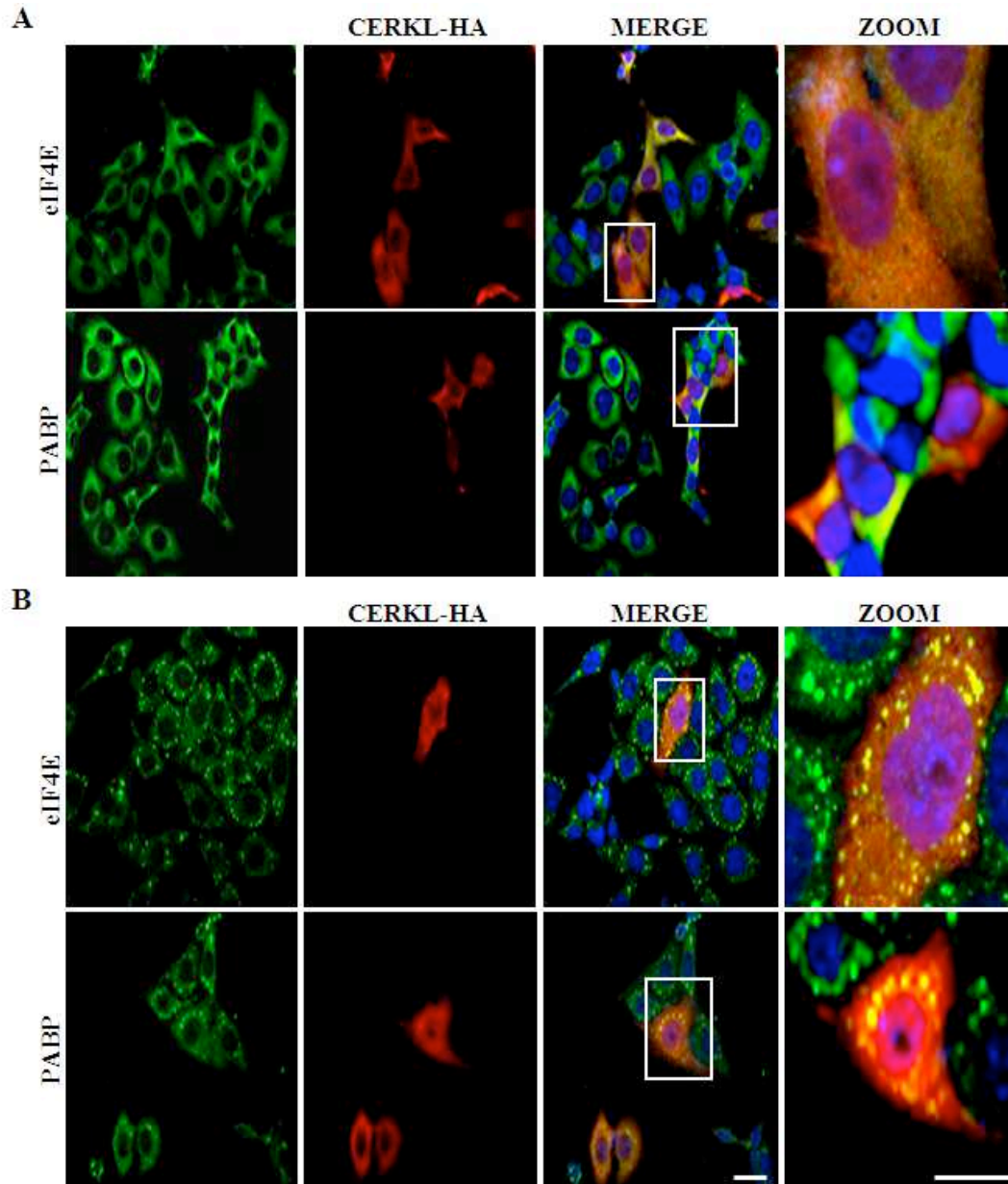


Figura 16. En células HeLa que expresan de manera transitoria el plásmido CERKL WT-HA, la proteína CERKL colocaliza con los marcadores de gránulos de estrés cuando las células se tratan con arsenito sódico, pero esto no ocurre en las células no tratadas. Se transfecaron transitoriamente células HeLa con el plásmido CERKL WT-HA y, tras 48 horas, se fijaron y se incubaron con el anticuerpo anti-HA y, como marcadores de los gránulos de estrés, con anti-PABP o anti-eIF4E. Después, las preparaciones se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 594 (rojo) o 488 (verde). **(A)** Células no tratadas. **(B)** Células sometidas a choque térmico (44 °C) durante 30 minutos. Los rectángulos en MERGE corresponden a la ampliación mostrada en ZOOM. Todas las barras: 10 μm .

Los gránulos de estrés se encuentran en equilibrio dinámico con los polisomas, de tal forma que ocurre un intercambio continuo de mRNAs y de proteínas entre ambas estructuras (Anderson y Kedersha, 2002). Al producirse un estrés, los polisomas se disocian y los mensajeros se acumulan en los gránulos de estrés unidos a los factores de pre-inicio de la traducción. Al realizar un tratamiento con cicloheximida (100 µg/ml), los ribosomas se detienen sobre los mRNAs, sin que puedan proseguir la traducción y sin poder disociarse tampoco de ellos, lo que conlleva un desensamblaje de los gránulos de estrés (Sivan *et al.*, 2007). Basándonos en estos datos, tratamos las células con cicloheximida durante 30 minutos. Como cabía esperar, observamos una disminución en el número de células que presentaban gránulos de estrés, que se reducía considerablemente cuando el tratamiento se prolongaba durante 1 hora (Figura 17A). La cuantificación de estos resultados se muestra en la Figura 17B. Tras 30 y 60 minutos de tratamiento con cicloheximida, el porcentaje de células que presentaban agregados de CERKL disminuía desde un 35% hasta un 22% y un 12%, en esos dos tiempos respectivamente (ver Figura 17B, izquierda) y el número de acúmulos de CERKL por célula, en aquellas que los presentaban, disminuía desde 10 acúmulos hasta 6 a los 30 minutos y 3 a los 60 minutos (ver Figura 17B, derecha).

Estos descensos ocurrían también cuando las células habían sido sometidas previamente a un estrés, bien con ArNa o bien mediante un choque térmico. En esas condiciones, el tratamiento durante 1 hora con el inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida, que también desensambla los gránulos de estrés, producía la práctica desaparición de estos y, junto con ellos, la de los acúmulos de CERKL (Figura 18A y B).

Para asegurarnos de que esta disminución en la formación de agregados conteniendo CERKL no se producía por un descenso en los niveles de la proteína debida al bloqueo de la síntesis de proteínas por el tratamiento con cicloheximida, tratamos de obtener una estimación de la vida media de CERKL. Para ello, transfectamos células HEK293T con el plásmido CERKL WT-HA y las tratamos con 100 µg/mL de cicloheximida durante varios tiempos, analizando para cada uno de ellos los niveles de CERKL mediante Western blot. Nuestros resultados permiten establecer que la vida media de CERKL se sitúa entre las 4 y las 6 horas (Figura 19) y que, por tanto, la desaparición observada de los agregados de CERKL tras 1 hora de tratamiento con cicloheximida se debe al desensamblaje de los gránulos de estrés y no a una disminución en los niveles totales de la proteína.

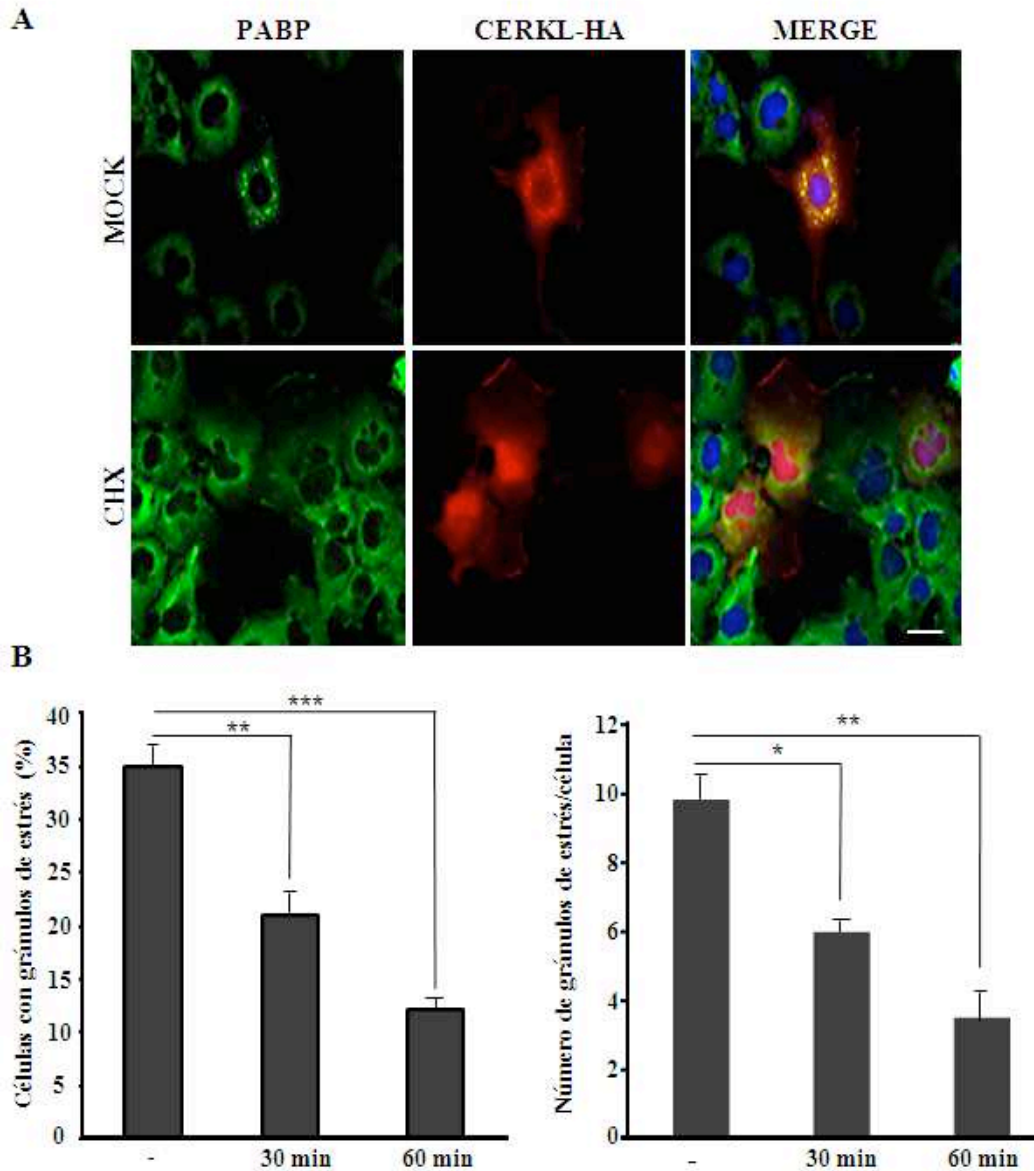


Figura 17. Efecto de la cicloheximida sobre la colocalización de CERKL con un marcador de gránulos de estrés. (A) Se transfectaron transitoriamente células COS-7 con el plásmido CERKL WT-HA y, tras 48 horas, se trataron (CHX) o no (MOCK) con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cicloheximida durante 30 min. Después, las preparaciones se fijaron y se incubaron sucesivamente con el anticuerpo anti-HA y con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594 (rojo). Para el marcaje de los gránulos de estrés se utilizaron anticuerpos que reconocen a la proteína PABP. Tras el tratamiento con la cicloheximida, los gránulos de estrés y su colocalización con la proteína CERKL disminuyen de una manera muy manifiesta. Barra: 10 μm . (B) Los histogramas muestran, tanto en condiciones control como tras el tratamiento con cicloheximida durante 30 y 60 minutos (min), el porcentaje de células COS-7 transfectadas con el plásmido CERKL WT-HA que contienen acúmulos de CERKL en forma de gránulos de estrés (parte izquierda) y el número de gránulos de estrés que se observan por célula con gránulos de estrés en esas mismas condiciones (parte derecha). Se muestra también la significación estadística respecto a los valores de las células no tratadas con cicloheximida (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$).

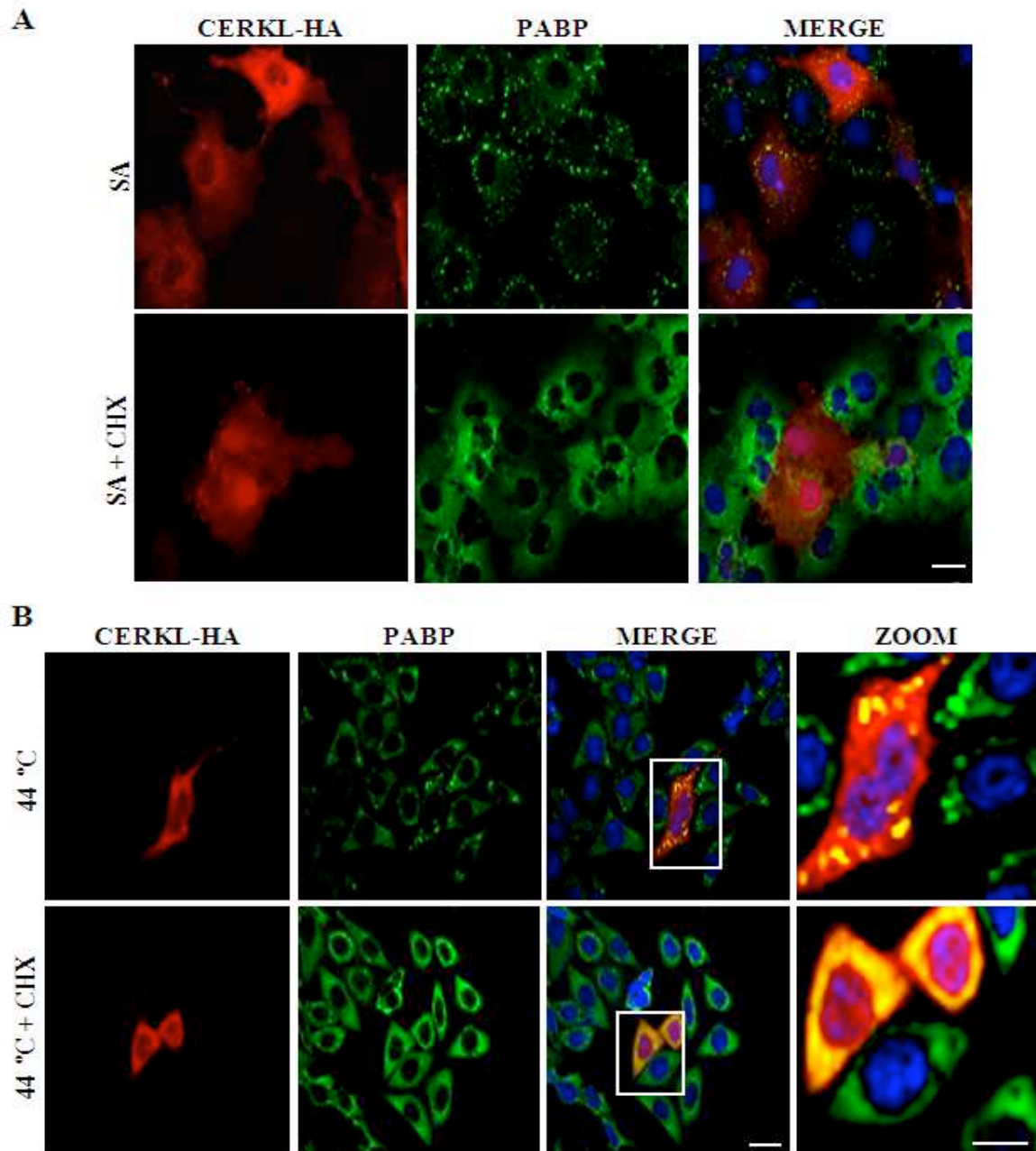


Figura 18. Efecto de la cicloheximida sobre la localización de CERKL en condiciones de estrés. Se transfectaron transitoriamente células COS-7 con el plásmido CERKL WT-HA y, tras 48 horas, las células se trataron con arsenito sódico (SA) 500 μ M (A) o se sometieron a un choque térmico de 44 °C (B), en ambos casos durante 30 min. Posteriormente, se añadió cicloheximida (CHX, 100 μ g/mL) durante 30 minutos más. La proteína CERKL se detectó por inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-HA y los gránulos de estrés empleando un anticuerpo anti-PABP. Tras el tratamiento con la cicloheximida, los gránulos de estrés desaparecen de manera prácticamente completa y no se observan ya los acúmulos de CERKL. Los rectángulos en MERGE corresponden a la ampliación mostrada en ZOOM. Todas las barras: 10 μ m.

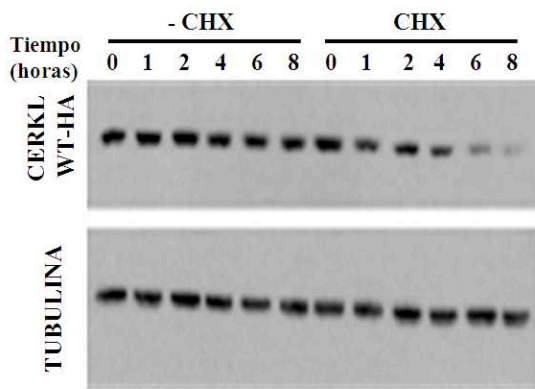


Figura 19. Estimación aproximada de la vida media de CERKL. Se trataron células HeLa que expresan establemente la proteína CERKL WT-HA con (CHX) o sin (-CHX) cicloheximida (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante los tiempos que se muestran. Tras ese tratamiento, se recogieron los extractos celulares y se analizó la presencia de CERKL-WT mediante Western blot con anti-HA (panel superior). Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-tubulina (panel inferior).

En la retinosis pigmentaria, las mutaciones de CERKL causan específicamente la muerte de los fotorreceptores de la retina. Puesto que los resultados que hemos descrito se refieren a líneas celulares sin relación con la enfermedad, analizamos también en células de origen retinal la posible presencia de CERKL en los gránulos de estrés, utilizando para ello células murinas 661W precursoras de conos. Estas células se transfectaron con CERKL WT-HA y se comparó, mediante inmunofluorescencia, su localización con la de la proteína PABP marcadora de gránulos de estrés. Como se muestra en la Figura 20, CERKL se encontraba, como ocurría en las células COS-7, en los gránulos de estrés que se formaban en las células 661W.

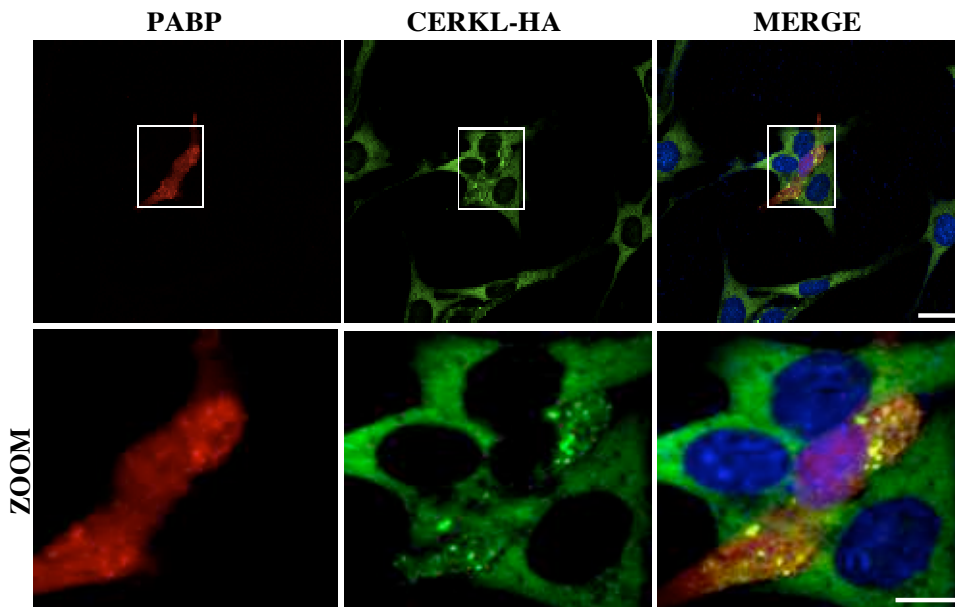


Figura 20. Colocalización de CERKL con un marcador de gránulos de estrés en células murinas 661W precursoras de conos. Se transfectaron transitoriamente células 661W con el plásmido CERKL WT-HA y, tras 48 horas, se fijaron y se incubaron con los anticuerpos anti-HA y anti-PABP, seguido por los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 594 (rojo) o 488 (verde). Los rectángulos en las imágenes de arriba corresponden a las ampliaciones mostradas en el ZOOM abajo. Se observa colocalización de CERKL con PABP. Todas las barras: 10 μm .

Por otro lado, puesto que hemos visto que la proteína CERKL se podía encontrar localizada en los gránulos de estrés, tratamos de averiguar si también colocalizaba con marcadores de los llamados cuerpos P (“P-bodies”). Este es un tipo de gránulos ribonucleoproteicos que intervienen en el control de la estabilidad y en la degradación de los mRNAs y que se encuentran en equilibrio con los gránulos de estrés y con los polisomas (Kedersha *et al.*, 2005). Utilizando EDC4 como marcador de los cuerpos P (Yu *et al.*, 2005), comprobamos, mediante inmunofluorescencia, que efectivamente CERKL colocalizaba también con estas estructuras (Figura 21).

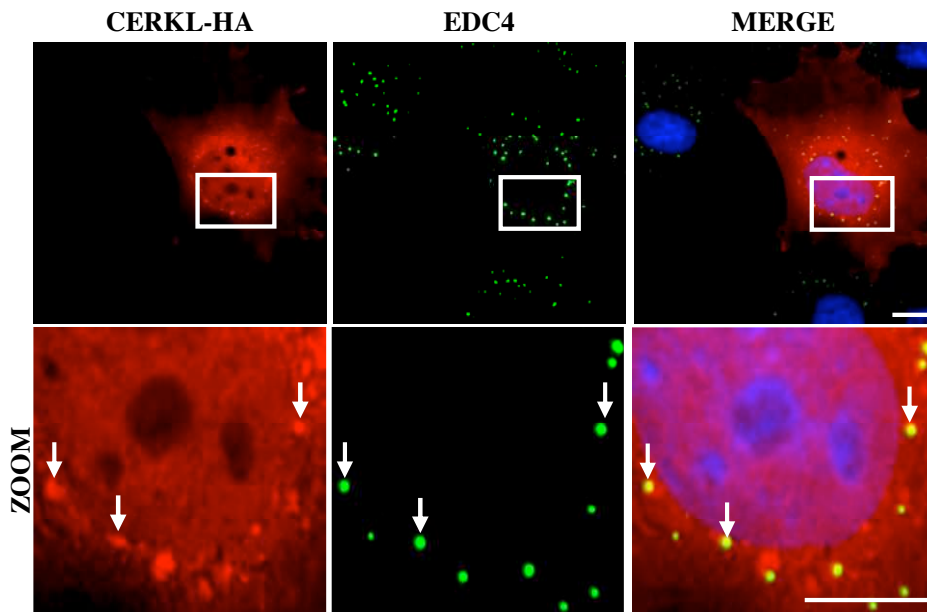


Figura 21. Colocalización de CERKL con los cuerpos P. Se transfectaron transitoriamente células COS-7 con el plásmido CERKL WT-HA y, tras 48 horas, se fijaron y se incubaron, primero con los anticuerpos anti-HA y anti-EDC4 y, después, con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 594 (rojo) o 488 (verde). Los rectángulos en las imágenes de arriba corresponden a la ampliación mostrada en el ZOOM de abajo. Las flechas indican algunos puntos donde colocalizan claramente CERKL y EDC4. Barras: 10 y 5 μ m en la imagen original (arriba) y en el ZOOM, respectivamente.

Hasta ahora nuestros resultados han mostrado que CERKL colocaliza en varias líneas celulares, incluida la línea 661W precursora de fotorreceptores, con dos tipos de complejos ribonucleoproteicos: los gránulos de estrés y los cuerpos P. Esta localización supondría un aspecto totalmente nuevo en el análisis de la patogenia de la retinosis pigmentaria que convendría considerar al tratar de entender sus bases moleculares, ya que hasta ahora no se había descrito una localización semejante para ninguna de las proteínas codificadas por genes implicados en la enfermedad (ver Introducción general). Esa localización de la proteína CERKL podría verse apoyada por resultados recientes

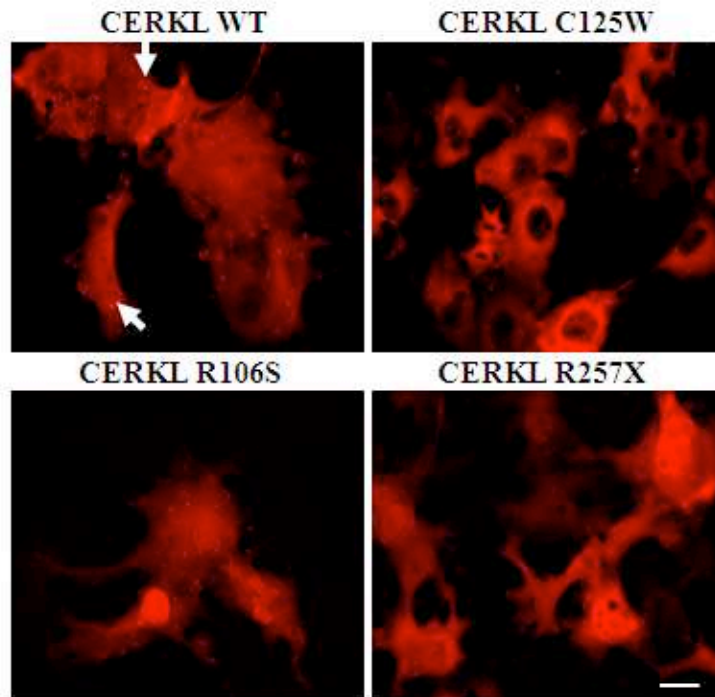
obtenidos por otros autores durante el desarrollo de esta tesis en la retina de rata (Mandal *et al.*, 2013), en los que se describe que, tras someter a los animales a un estrés lumínico (2700 lux durante 6 horas), la localización de CERKL en los segmentos externos de los fotorreceptores aumentaba, pasando esta además a tener una disposición particulada. Teniendo en cuenta nuestros propios resultados, estas partículas podrían corresponder precisamente a los gránulos de estrés que aparecerían tras el estrés lumínico, lo que podría permitir la supervivencia de los fotorreceptores. Desafortunadamente sin embargo, los autores no muestran en ese trabajo, ni tampoco posteriormente hasta ahora, datos sobre muerte celular ni sobre recuperación frente al estrés que pudieran servirnos para apoyar con más fuerza esta posibilidad.

3. La localización de CERKL en el núcleo y en los gránulos de estrés está alterada en los mutantes patológicos de CERKL

Para evaluar si la localización de CERKL en los gránulos de estrés tiene alguna relevancia fisiológica y pudiera contribuir a la patología, estudiamos la localización de varios de los mutantes patológicos de la proteína descritos hasta el momento. En estos estudios, partíamos de la premisa de que si la localización de estos mutantes estuviese alterada, esto sería indicativo de que la misma es importante para la función de CERKL. Para llevar a cabo estos experimentos generamos dos de los mutantes puntuales descritos para CERKL: CERKL R106S (Ali *et al.*, 2008) y CERKL C125W (Littink *et al.*, 2010). El mutante L245P (Khan y Abu-Safieh, 2014) se describió tras haber finalizado estos estudios, por lo que no está incluido en los experimentos. Además de los dos anteriores, utilizamos en esos experimentos un mutante truncado (R257X) también descrito previamente (Tuson *et al.*, 2004).

Una vez comprobada la correcta expresión en las células de los distintos mutantes generados (datos no mostrados y ver también la Figura 10), analizamos su localización intracelular. En primer lugar observamos que todos estos mutantes presentaban, en comparación con la proteína CERKL WT, una alteración en la localización nuclear (Figura 22A). Así, mientras que la proteína CERKL WT se encuentra localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma (ver también la Figura 11), los mutantes R106S y R257X se acumulaban sobre todo en el núcleo, mientras que el mutante C125W estaba ausente de este orgánulo. Esto indica que la localización nuclear de la proteína es importante, bien por no poder salir la proteína del núcleo o bien por no poder entrar, y que juega muy probablemente un papel en la patología.

A



B

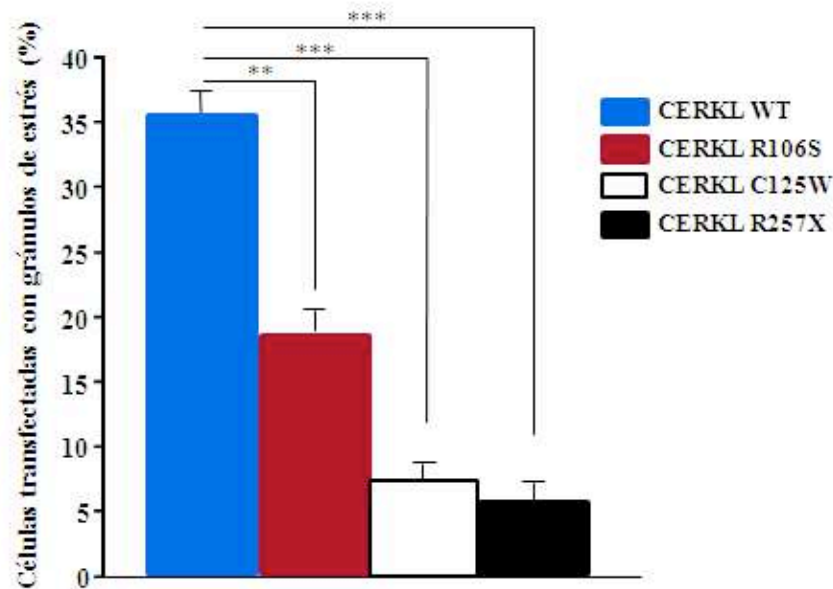


Figura 22. Los mutantes patológicos de CERKL pierden su localización en los gránulos de estrés. Se transfectaron transitoriamente células COS-7 con los plásmidos CERKL WT-HA, CERKL C125W-HA, CERKL R106S-HA y CERKL R257X-HA y, tras 48 horas, se fijaron y se incubaron sucesivamente con el anticuerpo anti-HA y el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594. Se observa en (A) la localización nuclear y citoplasmática de CERKL y su asociación con los gránulos de estrés (flechas). En cambio, el mutante C125W se encuentra ausente de este orgánulo, mientras que los mutantes R106S y R257X se acumulan sobre todo en los núcleos. Barra: 10 μ m. En (B) se cuantificó el porcentaje de células transfectadas que presentaban gránulos de estrés, utilizando PABP como marcador de estos. Los valores se expresan como media + desviación estándar de tres o más experimentos diferentes. Todos los mutantes tienen alterada tanto su localización nuclear como la formación de gránulos de estrés. Se muestra también la significación estadística respecto a los valores de CERKL WT (** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$).

A continuación, estudiamos la posible presencia de las formas mutantes de la proteína en los gránulos de estrés. Para ello, transfectamos células COS-7 con los plásmidos que codifican para las diferentes proteínas marcadas con el epítipo HA (CERKL WT-HA, CERKL C125W-HA, CERKL R106S-HA y CERKL R257X-HA) y cuantificamos, para cada uno de los mutantes, el porcentaje de las células transfectadas en las que CERKL formaba gránulos de estrés, utilizando la proteína PABP como marcador de los mismos. Como se muestra en la Figura 22B, todos los mutantes tienen alterada, en distinto grado, la formación de los gránulos de estrés conteniendo CERKL. En el caso del mutante R106S, el número de células transfectadas que presentaban gránulos de estrés disminuía hasta la mitad aproximadamente respecto a la proteína WT, mientras que los mutantes C125W y R257X presentaban una reducción aun mayor (del 80 y del 90%, respectivamente) en el número de esas células. Por tanto, al tratarse de mutantes patológicos, estos datos indicarían que la localización de CERKL en los gránulos de estrés juega un papel fundamental en la función de la proteína. Puesto que hemos llegado a una conclusión parecida analizando la localización nuclear de los mutantes de CERKL, la función de esta proteína en los gránulos de estrés y en el núcleo podría, como trataremos de establecer más adelante (ver apartado 4), estar relacionada.

Antes de entrar en eso y al considerar las variaciones observadas en la localización nuclear conviene destacar que llama algo la atención el caso del mutante C125W, que estaba prácticamente ausente del núcleo (ver Figura 22A). Este mutante no se localiza en los gránulos de estrés ni en las células COS-7, ni en las 661W (Figura 23A y C) y esta localización ni siquiera ocurre en condiciones en las que la formación de estos gránulos se induce, como por ejemplo tras un tratamiento con ArNa 500 μ M durante 30 minutos (Figura 23B). De acuerdo con estos datos, el mutante C125W, además de estar ausente del núcleo, es incapaz de dirigirse de una manera efectiva a los gránulos de estrés. Para descartar que la ausencia de ese mutante del núcleo y de los gránulos de estrés fuese debida a una vida media más corta y, por tanto, a una menor cantidad de la proteína, determinamos, por los procedimientos descritos para la proteína CERKL WT (ver Figura 19), la vida media de este y de los restantes mutantes que hemos analizado en este trabajo. A partir de estos estudios (datos no mostrados), concluimos que no existe ninguna diferencia entre las vidas medias de las proteínas mutantes y la de la proteína CERKL WT. Por tanto, podemos concluir que la ausencia en el mutante C125W de una localización nuclear y de una localización en los gránulos de estrés no se debe a unos niveles más reducidos de la proteína.

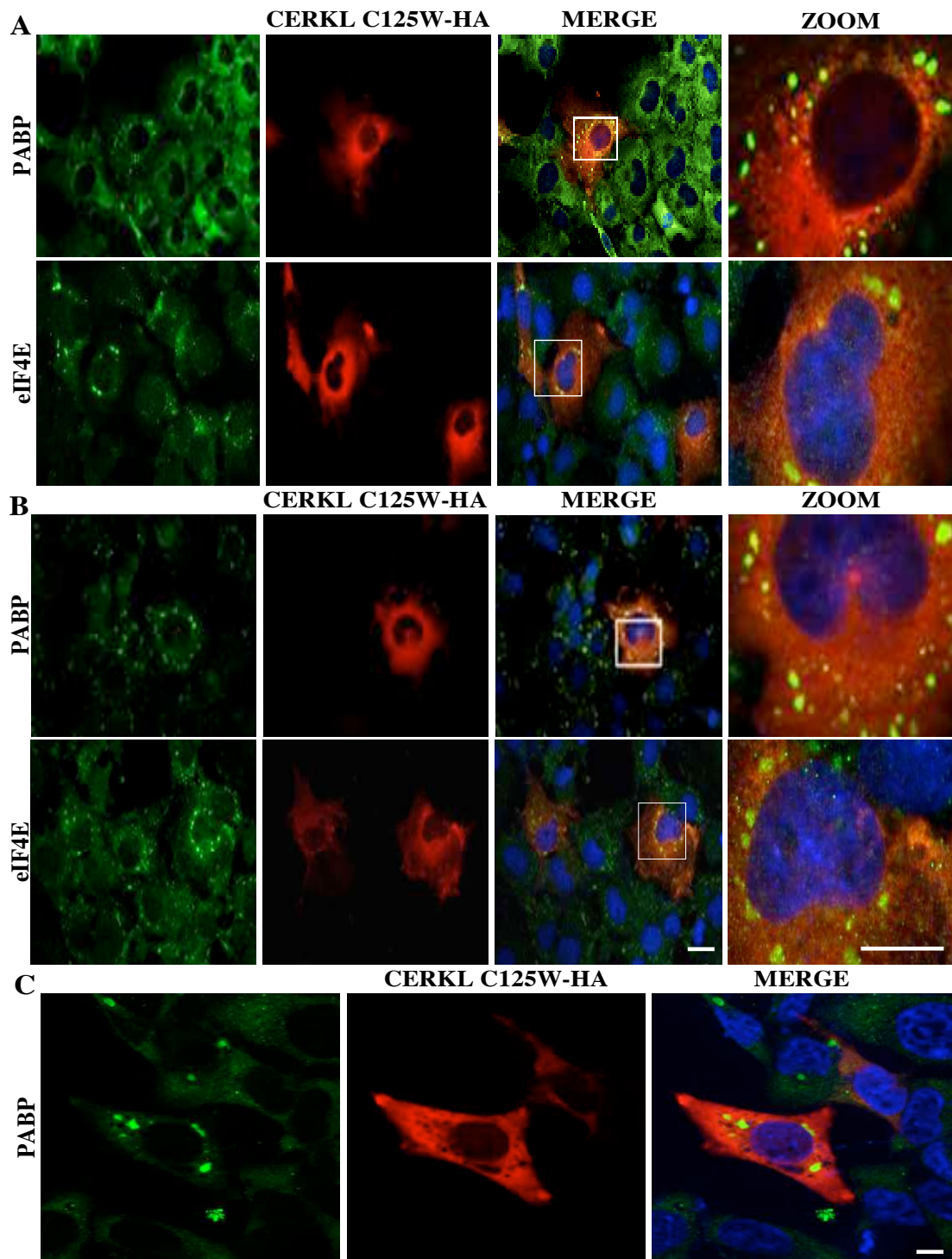


Figura 23. El mutante C125W-HA de CERKL tiene alterada su localización en los gránulos de estrés. Se fijaron células COS-7 transfectadas transitoriamente con el plásmido CERKL C125W-HA, no tratadas (A) o tratadas con arsenito sódico 500 μ M durante 30 minutos (B) y células 661W transfectadas con el mismo plásmido (C). Después, se incubaron sucesivamente con el anticuerpo anti-HA y el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594 (rojo) o Alexa 488 (verde). En (A) y (B), los rectángulos en MERGE corresponden a la ampliación mostrada en el ZOOM. Para el marcaje de los gránulos de estrés se han utilizado anticuerpos que reconocen a las proteínas PABP y eIF4E. Ni en las células COS-7, tratadas o no con arsenito sódico, ni en las 661W se observa colocalización del mutante C125W de CERKL con los marcadores de los gránulos de estrés. Todas las barras: 10 μ m.

4. La localización de CERKL en los gránulos de estrés requiere el paso previo de la proteína por el núcleo, así como una transcripción activa

Hasta ahora hemos demostrado que los mutantes patológicos tienen alterada su localización nuclear, bien porque se acumulan allí o bien porque se quedan en el citoplasma sin entrar al núcleo (ver el apartado 3). Se ha descrito para algunas proteínas que, al igual que CERKL, se asocian a los gránulos de estrés y tienen una localización nuclear y citoplasmática, como las proteínas Mdy2 y Tudor-SN, que su entrada al núcleo y su salida de él son necesarias para que se produzca esa asociación con los gránulos de estrés (Arhzaouy y Ramezani-Rad, 2012). Asimismo, la formación de los gránulos de estrés depende de la transcripción activa de los mRNAs, ya que estos son uno de sus componentes esenciales (Buchan y Parker, 2009). Por tanto, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos con las proteínas mutantes de CERKL descritos en el apartado anterior, comprobamos si una entrada y salida del núcleo y una transcripción activa eran necesarias para la asociación de CERKL a los gránulos de estrés.

Para ello utilizamos el inhibidor del transportador CRM1, leptomicina B, que impide la salida de muchas proteínas del núcleo. Tras 2 horas de tratamiento, observamos que CERKL se acumulaba en el núcleo y, lo que es más interesante, que era incapaz de colocalizar con los marcadores de los gránulos de estrés (Figura 24). Estos resultados ponen en evidencia, una vez más, que CERKL debe desempeñar una función importante en el núcleo y que cuando esta función se ve afectada, como ocurre por ejemplo en los mutantes cuya localización nuclear está alterada, se produce la enfermedad.

Puesto que una de las principales funciones celulares que ocurre en el núcleo es la síntesis de los mRNAs y teniendo en cuenta además que, como se ha dicho arriba, estos a su vez forman parte de los gránulos de estrés (Buchan y Parker, 2009), tratamos también de averiguar si una transcripción activa era necesaria para la localización de CERKL en los gránulos de estrés. Para ello, utilizamos dos inhibidores de la transcripción, la actinomicina D y la alfa amanitina. La Figura 24 muestra que también, tras esos tratamientos, la proteína CERKL, además de no encontrarse localizada en los gránulos de estrés, se acumulaba en el núcleo.

En resumen pues, todos estos resultados indican dos cosas. En primer lugar, que el tráfico entre el núcleo y el citoplasma de CERKL es necesario para que esta proteína pueda localizarse en los gránulos de estrés y, en segundo lugar, que ambos procesos requieren que ocurra una transcripción activa de mRNAs.

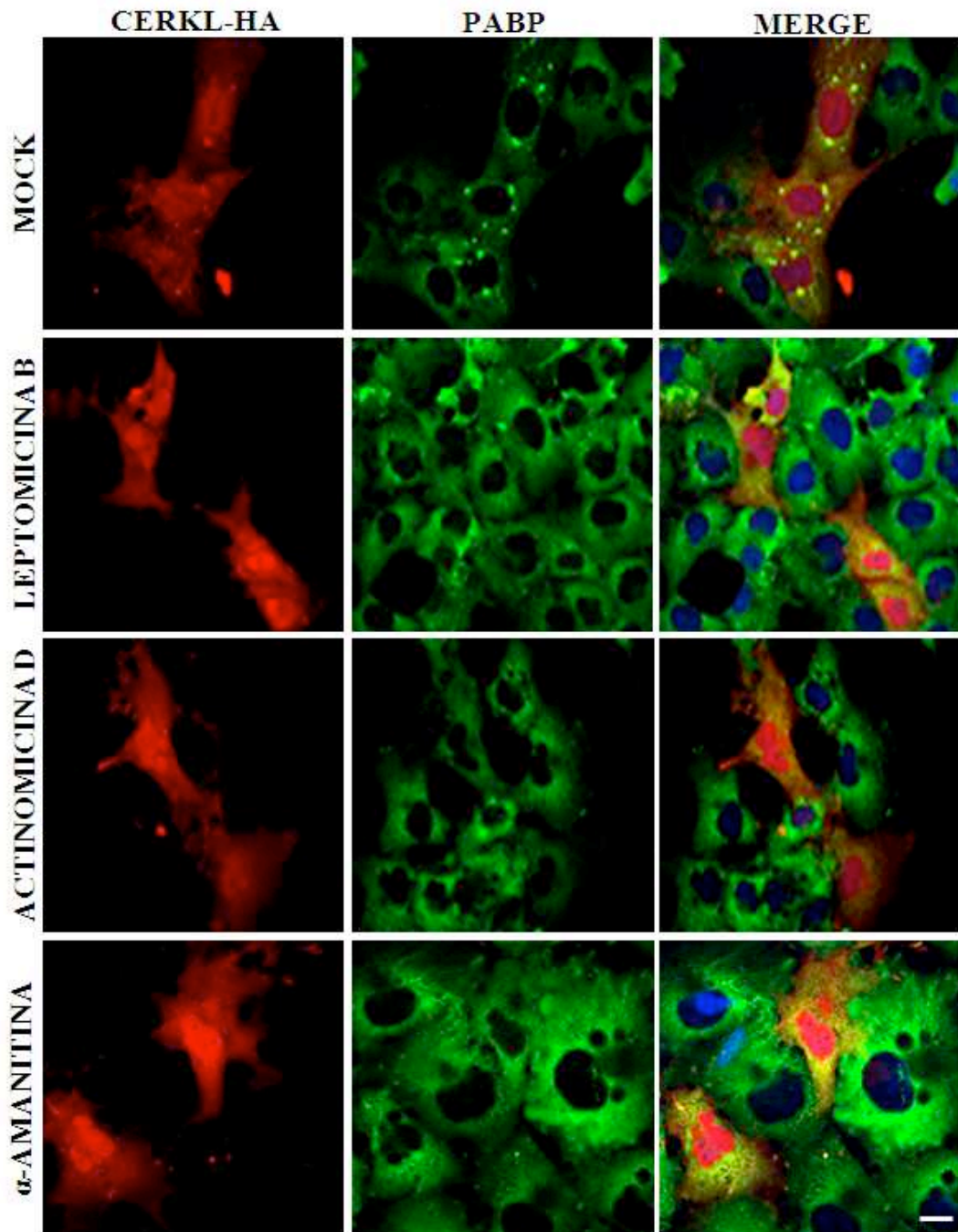


Figura 24. La localización de CERKL WT-HA en los gránulos de estrés necesita la entrada al núcleo y la salida de la proteína de él, así como la existencia de una transcripción activa. Se transfectaron transitoriamente células COS-7 con el plásmido CERKL WT-HA y, tras 48 horas, las células se trataron o no (MOCK) durante 2 horas con un inhibidor de la salida de proteínas del núcleo, la leptomicina B (40 nM), o con dos inhibidores de la transcripción, la actinomicina D (1 μ g/ml) y la α -amanitina (100 μ g/ml), como se indica a la izquierda de las diferentes filas de imágenes. Tras ese tratamiento, las células se fijaron y se incubaron con los anticuerpos anti-HA y PABP (como marcador de los gránulos de estrés) y, a continuación, con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594 (rojo) o Alexa 488 (verde). Todos esos tratamientos producen, a diferencia de lo que se observa en las células no tratadas, la acumulación de CERKL en el núcleo y la pérdida de su asociación con los gránulos de estrés. Barra: 10 μ m.

5. CERKL se asocia a polisomas

Los resultados presentados hasta el momento muestran que los agregados de CERKL corresponden a su asociación con compartimentos ribonucleoproteicos, tales como los gránulos de estrés y los cuerpos P. Sin embargo, existe una fracción substancial de CERKL que se encuentra de una forma más difusa en el citoplasma de las células. Dado que tanto los gránulos de estrés como los cuerpos P se encuentran en equilibrio dinámico con los polisomas (Figura 25), consideramos la posibilidad de que esa porción de la proteína CERKL que se encuentra en forma difusa en el citoplasma pudiera estar asociada a los polisomas.

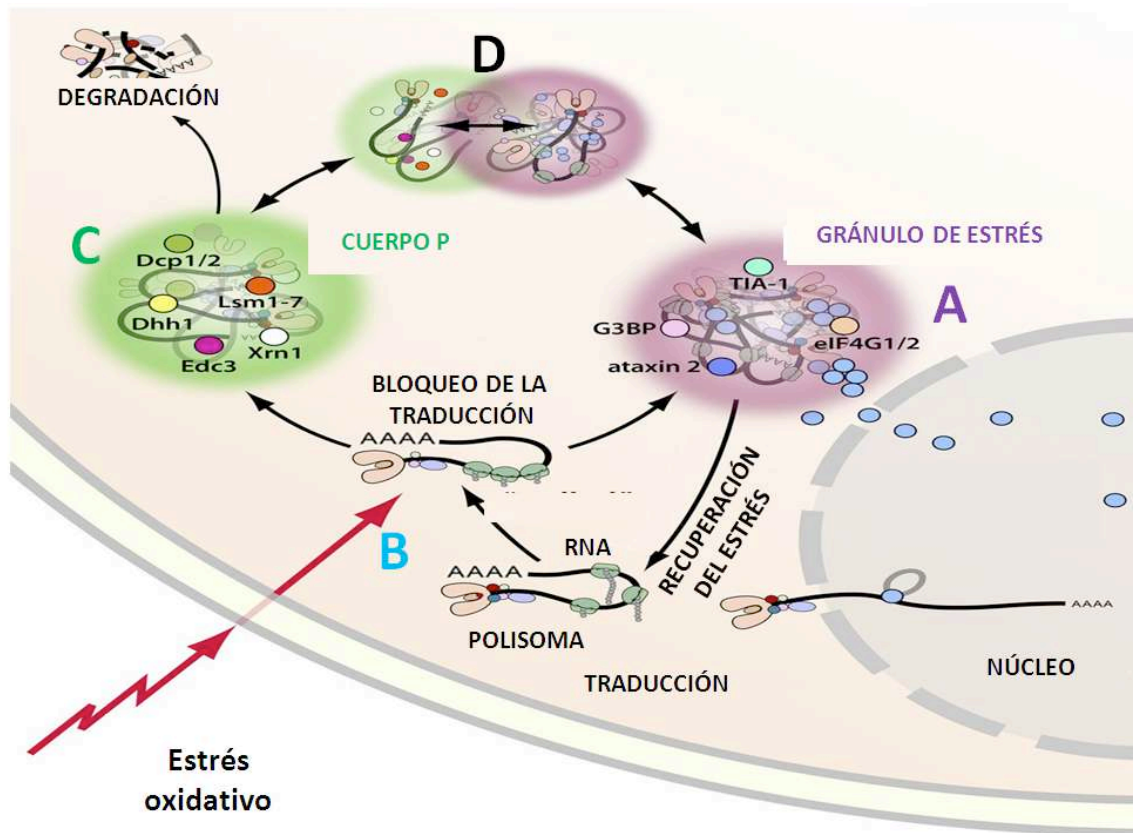


Figura 25 (adaptada de Li *et al.*, 2013). Intercambio de mRNAs entre los gránulos de estrés, los cuerpos P y los polisomas. El estrés bloquea la traducción a nivel de su inicio y causa la formación de los gránulos de estrés (A). Los gránulos de estrés son complejos ribonucleoproteicos que secuestran, en condiciones de estrés, mRNAs, factores de inicio de la traducción y otras proteínas de unión a mRNA. Cuando el estrés desaparece, estos gránulos se desensamblan y los mRNAs secuestrados forman polisomas que empiezan a traducirse de nuevo como antes del estrés (B). Alternativamente, durante el estrés los mRNAs pueden también dirigirse a otro compartimento ribonucleoproteico, los cuerpos P (C), para su degradación. Los gránulos de estrés (A) y los cuerpos P (C), además de los mRNAs, contienen diferentes proteínas, como se indica en la figura, que pueden emplearse como marcadoras de cada uno de ellos, lo que determina que sean dos compartimentos distintos aunque con un intenso intercambio de material entre ellos, como se muestra en (D).

Para comprobar esa posible asociación, purificamos mediante un gradiente discontinuo de sacarosa la fracción polisomal a partir de células HeLa que expresan, de forma estable, la proteína CERKL. Como ya se comentó antes (ver p. 58), y como también podemos observar con claridad en la Figura 26, en condiciones basales de cultivo no se forman gránulos de estrés en estas células, de forma que evitamos así cualquier posible contaminación de la fracción polisomal por estas estructuras. Como marcador de la fracción polisomal utilizamos una proteína ribosomal (RPS6) y además utilizábamos la actina para asegurarnos de que la fracción polisomal no estaba contaminada con otras fracciones más ligeras. Tras el análisis de las diferentes fracciones del gradiente de sacarosa, observamos que, en efecto, parte de la proteína CERKL colocalizaba con la fracción polisomal en el sedimento del gradiente (Figura 27A). Para validar la relevancia fisiológica de este hallazgo, aislamos los polisomas de células HeLa que expresaban de forma estable el mutante patológico CERKL R257X, que da lugar a una proteína truncada de 256 aminoácidos. Los resultados muestran en este caso que el mutante de CERKL no se asocia en absoluto a la fracción de polisomas y que, por el contrario, se acumula en las fracciones más ligeras del gradiente (Figura 27A).

CERKL WT-HA

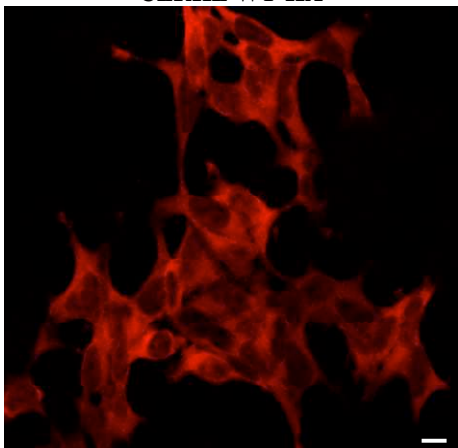


Figura 26. La proteína CERKL no colocaliza con los gránulos de estrés en células HeLa que expresan de manera estable el plásmido CERKL WT-HA. Se fijaron células HeLa que expresan de manera estable CERKL WT-HA (para su obtención ver Metodología) y se incubaron sucesivamente con el anticuerpo anti-HA y con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594. Se observa una localización de CERKL en el núcleo, pero sobre todo difusa en el citoplasma, aunque sin formar los agregados típicos que en las células COS-7 transfectadas transitoriamente con CERKL WT-HA están asociados a los gránulos de estrés (ver Figura 14A). Barra: 10 μ m.

Uno de los controles utilizados para comprobar que las proteínas están realmente asociadas a polisomas y no a otros complejos ribonucleoproteicos que hayan podido precipitar en el sedimento del gradiente, es el tratamiento del lisado celular con el quelante de cationes divalentes EDTA a una concentración de 15 mM. Este quelante disocia los polisomas, de forma que sus diferentes componentes se desplazan a las fracciones menos densas del gradiente. Al tratar de esta forma los lisados celulares, observamos que los marcadores ribosomales de las subunidades 40S y 60S se desplazaban a las fracciones menos densas del gradiente. Del mismo modo, CERKL

desaparecía del sedimento para distribuirse por las fracciones más ligeras (Figura 27B), lo que nos indica que esta proteína se encuentra efectivamente asociada a los polisomas.

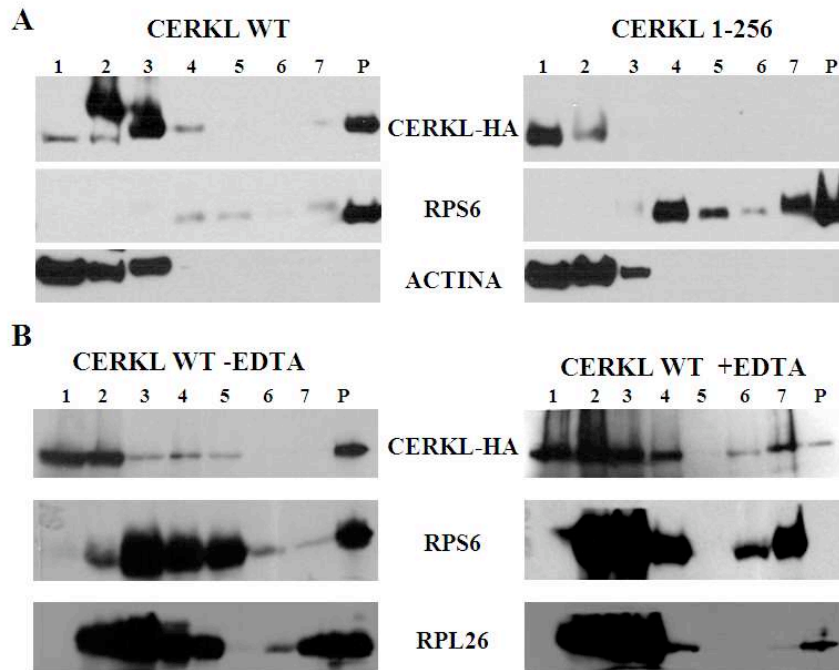


Figura 27. CERKL se asocia con los polisomas. (A) Se lisaron células HeLa que expresan de manera estable CERKL WT-HA y el mutante CERKL 1-256-HA y los polisomas se aislaron mediante centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa (0,5/1,3/1,7 y 2,1 M). Se recogieron, además del sedimento (P), siete fracciones de 1 ml (1-7) y se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos que reconocen HA o a la proteína ribosomal RPS6 (como marcador de polisomas). Como control de la contaminación citosólica se utilizó actina. (B) Se recogieron las mismas fracciones y se analizaron como en (A), pero utilizando ahora anticuerpos que reconocen a la proteína ribosomal RPL26 y no los que reconocen a la actina y partiendo de lisados tratados (+) o no (-) con EDTA a una concentración de 15 mM.

6. CERKL se asocia a partículas compactas de ribonucleoproteínas

Otro modo de disociar los polisomas es un tratamiento con la enzima ribonucleasa A (RNasa A), que degrada el mRNA de los mismos, causando su desensamblaje. Sin embargo, y contrariamente a lo que ocurría con el EDTA, al tratar los lisados celulares con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNasa A, la proteína CERKL no solo no desaparecía del sedimento sino que se acumulaba en las fracciones más densas del gradiente (Figura 28A). Para explicar este resultado, tratamos ahora independientemente con RNasa A el sedimento y dos fracciones ligeras del gradiente discontinuo de sacarosa anterior (fracciones 2 y 3) que se combinaban previamente. Después sometimos estos extractos a una segunda ultracentrifugación en un gradiente continuo de sacarosa, según se describe en el apartado de Metodología. Como era de esperar, el sedimento polisomal demostró ser sensible al tratamiento con RNasa A, de forma que CERKL, junto con los marcadores

de polisomas (por ejemplo, RPS6), desaparecía del sedimento y se desplazaba a las fracciones más ligeras del gradiente (Figura 28B). Sin embargo, al tratar las fracciones 2 y 3 combinadas observamos que tanto CERKL como la propia RNasa A se acumulaban en las fracciones más pesadas del gradiente (Figura 28C). Calculando la cantidad de RNA presente en esas fracciones, a partir de la medida de su absorbancia a 260 nm, pudimos constatar que también se acumulaba el RNA en estas fracciones (ver gráficos en la Figura 28C, abajo).

Una posible explicación para este resultado, es decir, el que CERKL precipite junto con la RNasa A y con el RNA, podría ser que CERKL se encuentre formando complejos ribonucleoproteicos compactos inaccesibles a la RNasa A y, por tanto, que esta sea incapaz de digerirlos. De esta manera, se formarían agregados de RNasa A, debido a su capacidad de formar multímeros (Libonati y Gotte, 2004), junto con las partículas ribonucleoproteicas de CERKL que se localizarían así en las fracciones más densas del gradiente de sacarosa. Para validar esta hipótesis, aumentamos la concentración de NaCl de 25 a 450 mM con el fin de relajar estos complejos ribonucleoproteicos compactos y hacerlos así accesibles a la RNasa A. Al tratar las fracciones 2 y 3 en estas condiciones, observamos que estos complejos se volvían sensibles al tratamiento con RNasa A y que tanto CERKL como el RNA se desplazaban hacia las fracciones menos densas del gradiente (Figura 28D). Estos últimos resultados, que para entender mejor su interpretación se esquematizan en la Figura 29, son totalmente consistentes con el concepto de que CERKL se asocia a partículas ribonucleoproteicas compactas.

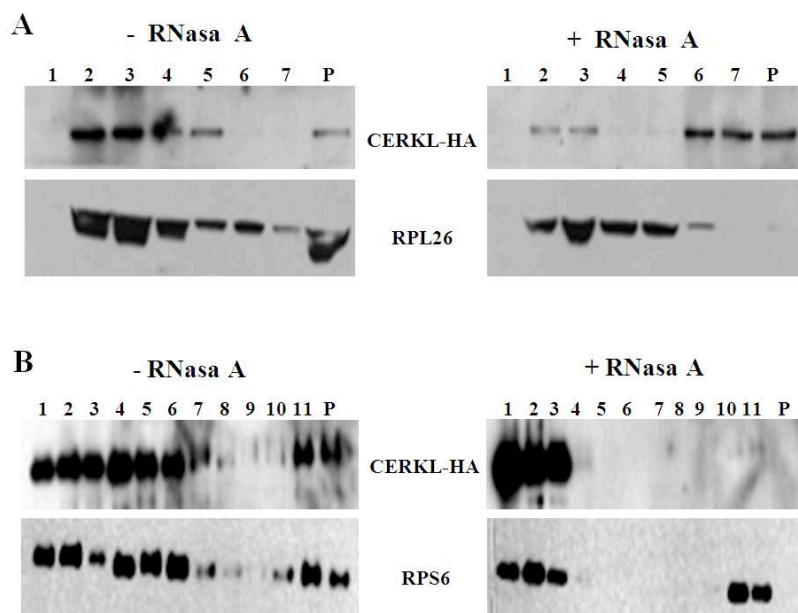


Figura 28 (ver continuación en la página siguiente).

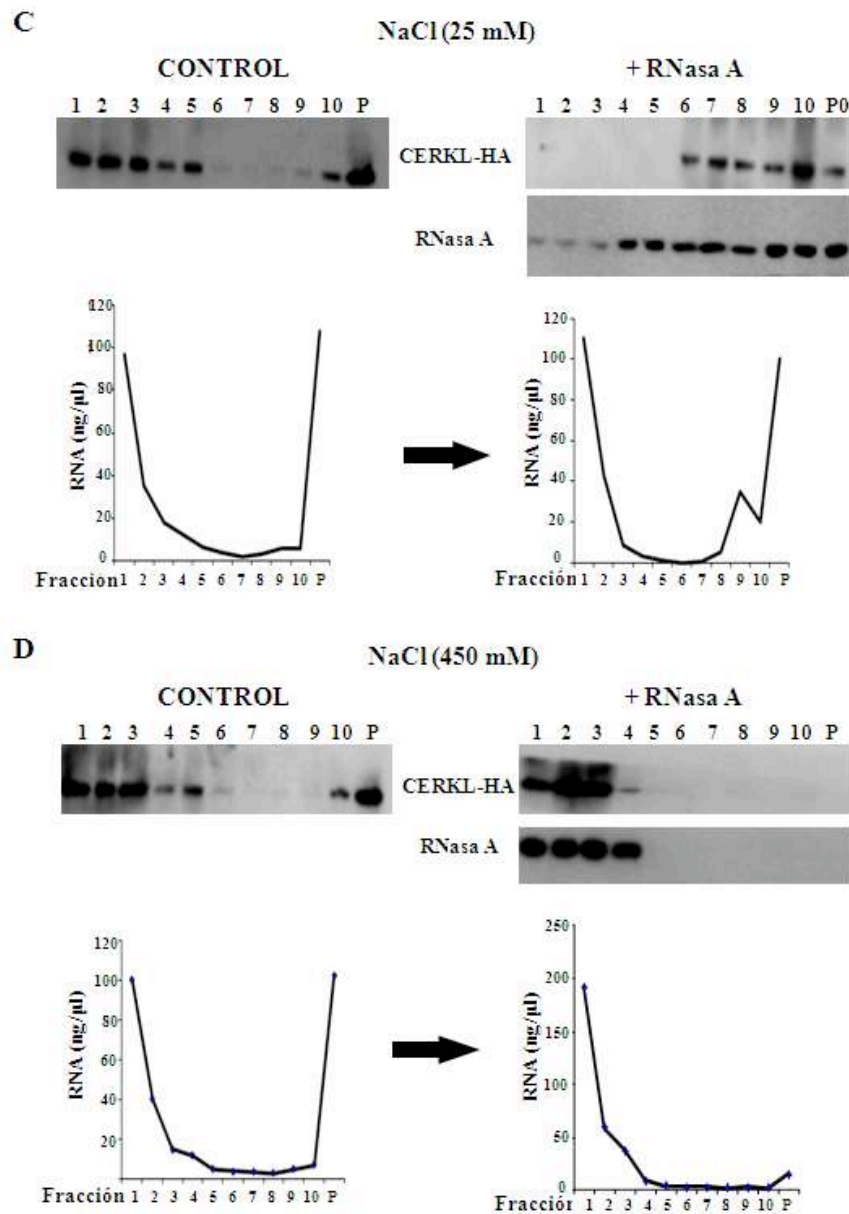


Figura 28. CERKL se asocia con partículas ribonucleoproteicas compactas que son resistentes a la RNasa A. (A) Se lisaron células HeLa expresando CERKL WT-HA de manera estable y, tras un tratamiento del lisado con RNasa A (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), las muestras se centrifugaron y procesaron como se ha descrito en la leyenda de la Figura 27. (B) El sedimento (polisomas) del gradiente discontinuo de sacarosa se resuspendió en el tampón de lisis (sin EDTA), se trató con RNasa A (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se centrifugó en un gradiente continuo de sacarosa (0,3-1,5 M) tal como se describe en el apartado de Metodología. Se recogieron aquí, además del sedimento (P), once fracciones (1-11) y se analizaron por Western blot empleando los mismos anticuerpos descritos en la leyenda de la Figura 27A. (C y D) Se lisaron células HeLa expresando CERKL WT-HA de manera estable y los polisomas se aislaron mediante centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa (0,5/1,3/1,7 y 2,1 M) como antes. Dos de las siete fracciones obtenidas (números 2 y 3) se combinaron y se trataron con RNasa A (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de dos concentraciones diferentes de NaCl, 25 (C) y 450 (D) mM. Tras el tratamiento, las preparaciones se centrifugaron en un gradiente continuo de sacarosa (0,3-1,5 M). Se recogieron, además del sedimento (P), 10 fracciones (1-10), que se analizaron por Western blot empleando anticuerpos que reconocen a HA y a la RNasa A. Se muestran también, bajo los Western blots, las concentraciones de RNA en las fracciones cuantificadas por su absorbancia a 260 nm. Los resultados se comentan en el texto y en la Figura 29.

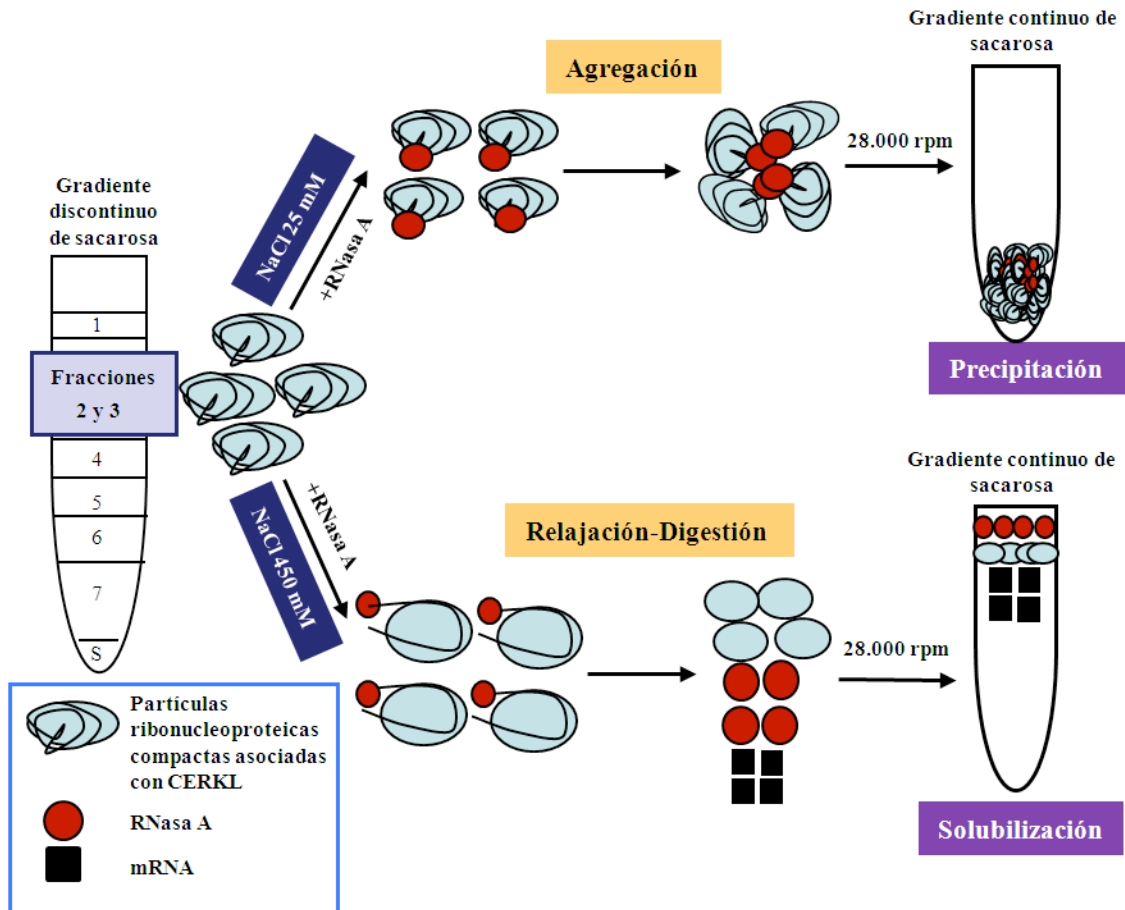


Figura 29. Esquema interpretativo de los experimentos realizados para analizar los gránulos ribonucleoproteicos que contienen a la proteína CERKL mediante dos tratamientos diferentes con RNasa A que se diferencian solamente en que se realizan en presencia de una concentración salina baja o alta. Tras la obtención de un lisado de células HeLa que expresan establemente la proteína CERKL WT-HA en una solución de NaCl (25 mM), se realizó una centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa (tubo izquierdo). Las fracciones dos y tres de esa centrifugación (marcadas en verde) contienen las partículas ribonucleoproteicas que llevan asociada a la proteína CERKL (ovoides azules claros). A una concentración baja de NaCl (25 mM, panel superior), la RNasa A (círculos rojos) se asocia a esas partículas compactas, pero es incapaz de acceder al mRNA para digerirlo. Al mismo tiempo, y debido a la capacidad de la RNasa A para formar homopolímeros, se forman unos agregados de RNasa A unida a las partículas ribonucleoproteicas que contienen la proteína CERKL. Durante la siguiente ronda de centrifugación, ahora en un gradiente continuo de sacarosa (parte de arriba), estos agregados precipitan en la porción más densa del gradiente (ver Figura 28C). Cuando se eleva la concentración de NaCl hasta 450 mM (parte de abajo), las partículas ribonucleoproteicas, que llevan asociada a la proteína CERKL en las fracciones 2 y 3, se relajan, por lo que la RNasa A puede ahora acceder hasta el mRNA y digerirlo, solubilizando así a los componentes de esas partículas. Por eso, durante la siguiente centrifugación en el gradiente continuo de sacarosa, estos componentes (entre ellos CERKL) se solubilizan y migran hacia las fracciones más ligeras en la parte superior del gradiente (ver Figura 28D).

7. CERKL interacciona con componentes de la maquinaria de traducción

Hasta ahora hemos demostrado que CERKL se encuentra en distintos compartimentos ribonucleoproteicos, como los gránulos de estrés, los cuerpos P y los polisomas, así como en partículas ribonucleoproteicas compactas. Dado que todas estas estructuras

poseen una composición basada en RNAs y proteínas, estudiamos a continuación con cuál o con cuáles de esas macromoléculas interaccionaba CERKL.

7.1. Interacción de CERKL con proteínas de la maquinaria de traducción

En primer lugar, llevamos a cabo estudios proteómicos para identificar proteínas que interaccionasen con CERKL. Para ello, transfectamos células HEK-293T con los plásmidos CERKL WT-Flag y Flag-GFP como control y, tras 48 horas, las células se lisaron y se inmunoprecipitó Flag según se describe en el apartado correspondiente de la Metodología. Tras analizar el inmunoprecipitado por espectrometría de masas, pudimos determinar que la mayor parte de las proteínas que se unían a CERKL eran proteínas ribosomales (RP), tanto de la subunidad 40S (S11 y S13) como de la subunidad 60S (L6, L10, L17, L18, L23 y L35).

En una segunda aproximación para identificar las proteínas que interaccionan con CERKL, las proteínas del inmunoprecipitado se sometieron a electroforesis en geles de SDS-PAGE del 8% o del 16% de poliacrilamida, con la finalidad de separar mejor las proteínas de alto o de bajo peso molecular, respectivamente. A continuación las proteínas se tiñeron con plata (Figura 30A y B). Las bandas que solo aparecían en la inmunoprecipitación de CERKL (y que, por tanto, estaban ausentes en la realizada con GFP) se seccionaron, se tripsinizaron y se identificaron por espectrometría de masas. Las proteínas que se identificaron en esos estudios se muestran en la Tabla 5. De las 30 proteínas identificadas, 18 podían clasificarse como proteínas implicadas en la maquinaria de traducción, incluyendo proteínas ribosomales (RPS3, RPSA y RPS5), factores de iniciación (eIF3B, eIF3G, eIF3I y metionina tRNA ligasa) y de elongación (eEF1 α 2, eEF2, eEF1 γ , eEFTu, eEF1 α -like3, alanina tRNA ligasa e isoleucina tRNA ligasa), chaperonas (HSP70, HSP90, HSP β -1 y el miembro 2 de la subfamilia A de DNAJ), así como la proteína de unión a la cola poli A de los mRNAs (PABP). La Figura 31 muestra la verificación de estos resultados mediante Western blot para las proteínas de cada uno de los grupos anteriores en la que la espectrometría de masas detectó el mayor número de péptidos (concretamente, se verificaron las proteínas RPS3, eIF3B, HSP70 y PABP). Además de las proteínas de los grupos anteriores, cabía destacar entre las proteínas identificadas la presencia de α y β -tubulina, así como la de algunas que se encuentran en la membrana plasmática, como la desmogleína, la filagrina y la desmoplaquina (ver Tabla 5). La relevancia de estas proteínas para la función de CERKL se comentará más adelante.

Tabla 5. Proteínas de unión a CERKL

<p>Proteínas involucradas en traducción y plegamiento de proteínas</p>	<p>Factor de inicio de la traducción eucariota 3 subunidad B Factor de inicio de la traducción eucariota 3 subunidad G Factor de inicio de la traducción eucariota 3 subunidad I Factor de elongación de la traducción gamma-1 Factor de elongación de la traducción Tu, mitocondrial Factor de elongación de la traducción parecido a 1-alfa 3 Factor de elongación de la traducción 1-alfa 2 Factor de elongación de la traducción 2 Alanina tRNA ligasa Isoleucina tRNA ligasa Metionina tRNA ligasa Proteína S3 de la subunidad ribosomal 40S Proteína SA de la subunidad ribosomal 40S Proteína S5 de la subunidad ribosomal 40S Proteína de choque térmico de 90 kDa Proteína de choque térmico de 70 kDa Proteína de choque térmico beta-1 Miembro 2 de la subfamilia A de DNAJ Proteína de unión a poli A</p>
<p>Proteínas involucradas en el metabolismo de DNA/RNA</p>	<p>Nucleofosmina Metilosoma, proteína 50 Proteína parecida a RuvB 2 Ribonucleoproteína nuclear heterogénea F</p>
<p>Otras</p>	<p>Apolipoproteína D Importina 4 Alfa tubulina Beta tubulina Desmogleína Filagrina Desmoplaquina</p>

Se muestran las 30 proteínas identificadas en los estudios de espectrometría de masas que interaccionarían con CERKL, pero no con GFP. Estas proteínas se han clasificado en tres grupos. El primero es el más numeroso, e incluye proteínas implicadas en la maquinaria de traducción (proteínas ribosomales, factores de inicio y de elongación) y el plegamiento de proteínas, así como la proteína PABP de unión a la cola de poli A de los mRNAs y que hemos empleado antes como uno de los marcadores de los gránulos de estrés. En los otros dos grupos destaca, en el último de ellos, la presencia de las tubulinas α y β y de varias proteínas localizadas en la membrana plasmática (desmogleína, filagrina y desmoplaquina).

Junto a CERKL WT-Flag y Flag-GFP, analizamos en paralelo el mutante de CERKL C125W-Flag. Este interactúa con muchas de las proteínas con las que lo hace CERKL WT. Así, entre las cuatro proteínas que se verificaron en los Western blots, el mutante interactúa con tres, RPS3, HSP70 y PABP. En cambio, no lo hace con la proteína eIF3B (ver la flecha 1 en la Figura 30A y el Western blot correspondiente en la Figura 31). Puesto que eIF3B es un factor clave de inicio de la traducción (Masutani *et al.*, 2007), resulta interesante que un mutante patológico de CERKL tenga precisamente un defecto en la interacción con una proteína que actúa a este importante nivel.

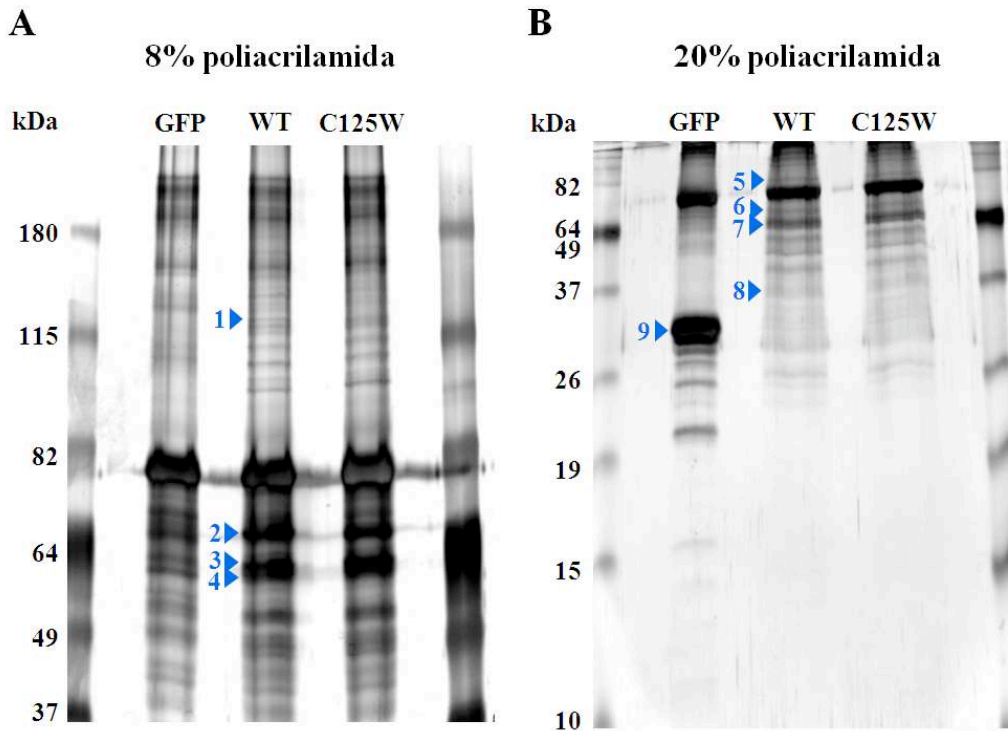


Figura 30. Proteínas que interactúan con CERKL. Se transfectaron transitoriamente células HEK-293T con los plásmidos CERKL WT-Flag, CERKL C125W-Flag y Flag-GFP, se lisaron y se realizaron inmunoprecipitaciones con anticuerpos anti-Flag como se describe en la Metodología. Las proteínas eluidas de las inmunoprecipitaciones se separaron mediante SDS-PAGE (del 8 y 20% de poliacrilamida en (A) y (B), respectivamente). Las proteínas se tiñeron con tinción de plata antes de ser analizadas por espectrometría de masas. La posición de diferentes proteínas se ha marcado con flechas y los números corresponden, de arriba abajo, a las proteínas siguientes: eIF3B (1), CERKL-Flag (2), β -tubulina (3) y α -tubulina (4) en (A) y PABP (5), HSP70 (6), CERKL-Flag (7) y RPS3 (8) en (B). Se indica también, en el gel del 20% de poliacrilamida (B), la posición de Flag-GFP (9), como control.

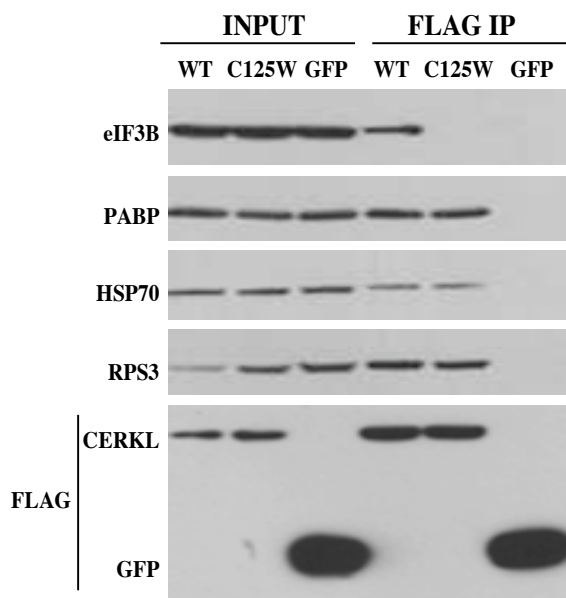


Figura 31. CERKL WT, pero no el mutante C125W, interactúa con la proteína de la maquinaria de traducción eIF3B. Se transfectaron transitoriamente células HEK-293T con los plásmidos CERKL WT-Flag, CERKL C125W-Flag y Flag-GFP. Tras 48 horas, las células se lisaron y se realizaron inmunoprecipitaciones como se ha descrito en la Metodología. Los lisados (INPUT) y sus inmunoprecipitados se analizaron por Western blot utilizando anticuerpos que reconocen Flag, eIF3B, PABP, HSP70 y RPS3. Las tres últimas proteínas interactúan tanto con CERKL WT como con el mutante de CERKL C125W, pero no con GFP. En cambio, eIF3B interactúa solamente con CERKL WT.

7.2. Interacción de CERKL con mRNAs

Otra molécula muy importante que comparten los gránulos de estrés, los cuerpos P, los polisomas y otras partículas ribonucleoproteicas es el mRNA. Anteriormente, hemos demostrado: i) que CERKL se localiza en los gránulos de estrés, los cuerpos P, los polisomas y otras partículas ribonucleoproteicas, ii) que CERKL interacciona además con diversas proteínas de la maquinaria de traducción que se unen al mRNA, y iii) que para que CERKL salga del núcleo y se localice en los gránulos de estrés es necesaria una transcripción activa. Teniendo en cuenta todos estos datos, estudiamos si CERKL podía unirse también a los mRNAs. Los experimentos iniciales fueron realizados por el grupo de la Dra. Roser González-Duarte del departamento de Genética de la Universidad de Barcelona, con el que hemos colaborado en el estudio de la retinosis pigmentaria dentro un proyecto del CIBER de enfermedades raras. En esos experimentos, en los que se utilizaron mRNAs purificados a partir de células COS-7 o de retina humana, este grupo demostró, mediante EMSA, que CERKL se une directamente al mRNA a través de su extremo amino-terminal (residuos 1-256) (Fathinajafabadi *et al.*, 2014).

Varias de las proteínas que interaccionan con CERKL identificadas en los estudios proteómicos (ver Tabla 5), como las subunidades B, G e I del factor eucariótico de inicio de la traducción 3 y las proteínas ribosomales de la subunidad 40S, como las proteínas RPS3, RPSA y RPS5, pertenecen al complejo de pre-inicio de la traducción (complejo 48S). Este complejo se ensambla en el extremo 5'CAP del mRNA (Aitken y Lorsch, 2012, y ver también la Figura 32A), lo que sugiere que CERKL podría estar interaccionando con este extremo del mRNA. Con el propósito de estudiar de manera más directa si esto era así, transfectamos las células HEK-293T con CERKL WT-Flag o con Flag-GFP como control y, a continuación, inmunoprecipitamos Flag. Tras el tratamiento con el péptido Flag, los eluidos obtenidos se incubaron durante 2 horas con el análogo del 5'CAP 7-metil guanosina unido a la resina Sefarosa o con la Sefarosa sin conjugar como control negativo. Tras varios lavados, la resina se hirvió en SDS y el material resultante se analizó mediante Western blot para verificar la posible presencia de CERKL-Flag (Figura 32B). Los resultados obtenidos en este estudio muestran que CERKL interacciona con la 7-metil guanosina de una manera específica y que, por tanto, el extremo 5'CAP desempeña un papel importante en la unión de los mRNAs a CERKL.

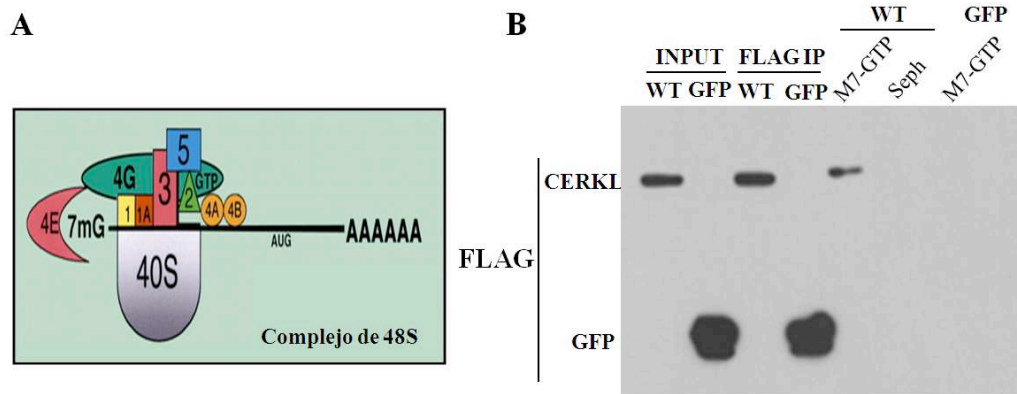


Figura 32. CERKL interacciona con el extremo 5'CAP de los mRNAs. (A) Como muestra la figura, adaptada de Anderson y Kedersha (2002), el complejo 48S de pre-inicio de la traducción de eucariotas se une a la región 5'CAP del mRNA y es responsable de buscar el codón de inicio (AUG). Este complejo está formado por la subunidad pequeña del ribosoma (40S) y por las proteínas que intervienen en el inicio de la traducción, como son las de la familia eIF3 y eIF4. (B) Se inmunoprecipitaron las proteínas CERKL WT y GFP unidas a Flag (FLAG IP) a partir de lisados (INPUT) de células HEK-293T que expresan de manera transitoria estas proteínas. Los eluidos de estas inmunoprecipitaciones se incubaron con la resina Sefarosa 4B conjugada a m7-GTP (M7-GTP). Las proteínas que se unieron fueron analizadas mediante Western blot, utilizando el anticuerpo anti-Flag. Como control se utilizó la Sefarosa 4B sin conjugar (Seph). CERKL WT, pero no GFP, interacciona con m7-GTP.

7.3. La interacción de CERKL con las proteínas de unión a mRNAs depende de la integridad de los mensajeros

Hasta ahora hemos mostrado que CERKL se une tanto a proteínas de la maquinaria de traducción como a mRNAs. Mediante EMSA, se había mostrado que la interacción con el mRNA podía ocurrir de una forma directa, ya que en los experimentos del grupo de Barcelona que hemos mencionado en el apartado 7.2 se utilizaron mRNAs y la proteína purificados. A continuación, analizamos si la interacción de CERKL con las proteínas identificadas era también directa o si, por el contrario, era dependiente de la integridad de los mRNAs, ya que todas estas proteínas se unen también al RNA. Para ello, transfectamos células HEK-293T con CERKL WT-Flag y tratamos los lisados celulares con RNasa A (100 μ g/ml durante 30 minutos) en presencia de diferentes concentraciones salinas (NaCl 150, 450 y 600 mM). Después, se inmunoprecipitó CERKL WT-Flag y, mediante Western blot, se analizaron las proteínas que interaccionaban con CERKL en las diferentes condiciones. Como se puede observar en la Figura 33, el tratamiento con RNasa A en presencia de una concentración salina baja (NaCl 150 mM) no afecta a la interacción de CERKL con eIF3B, PABP, HSP70 o RPS3. Hemos mostrado anteriormente, que las concentraciones elevadas de NaCl relajan los complejos ribonucleoproteicos compactos de los que forma parte CERKL y

los vuelve accesibles al tratamiento con RNasa A (ver Figura 28D). De esta manera, cuando se incrementó la concentración de NaCl desde 150 hasta 450 y 600 mM, la interacción de CERKL con las proteínas se fue perdiendo en todos los casos, excepto en el de la proteína eIF3B. En cambio, en ausencia de RNasa A, el incremento de la concentración salina no afectó a la interacción de CERKL con todas esas proteínas. Estos datos indican pues que la interacción de eIF3B con CERKL es independiente de la integridad del mRNA y que, probablemente, ocurre, o bien directamente entre las dos proteínas, es decir eIF3B y CERKL, o bien a través de otras proteínas.

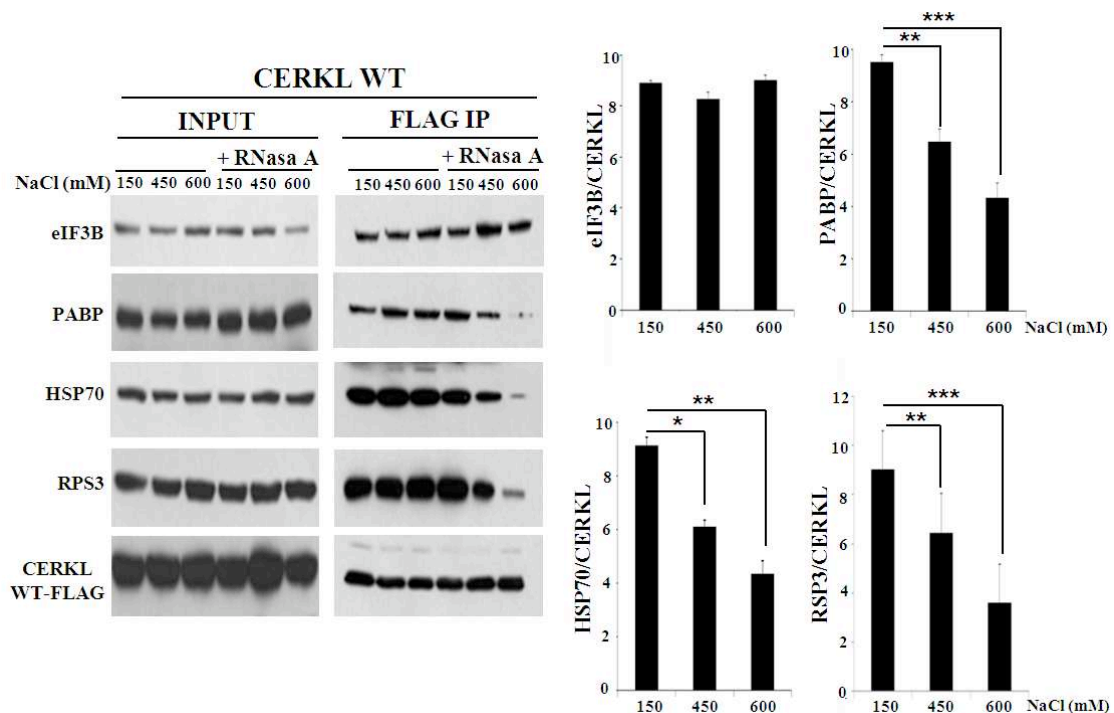


Figura 33. Análisis de la dependencia de la integridad del mRNA en la interacción de CERKL con componentes de la maquinaria de traducción en los complejos ribonucleoproteicos compactos. Se transfectaron transitoriamente células HEK-293T con el plásmido CERKL WT-Flag, las células se lisaron y se realizaron inmunoprecipitaciones como se ha descrito en la Metodología. Los lisados (INPUT) y los inmunoprecipitados (FLAG IP) se analizaron por Western blot. Antes de la inmunoprecipitación, los lisados se trataron o no con RNasa A (100 µg/mL) en presencia de tres concentraciones diferentes de NaCl (150, 450 y 600 mM), como se indica. La inmunoprecipitación se realizó con resina anti-Flag M2 y los lisados e inmunoprecipitados se analizaron por Western blot, utilizando anticuerpos que reconocen las siguientes proteínas: eIF3B, PABP, HSP70, RPS3 y Flag (para detectar CERKL WT). En los histogramas de la derecha se muestran las medias y desviación estándar de la cuantificación, en cuatro experimentos diferentes, de las proteínas de las bandas en las inmunoprecipitaciones realizadas con Flag de los lisados tratados con RNasa A y concentraciones salinas diferentes. En todos los casos, menos en el de eIF3B, la interacción de CERKL con componentes de la maquinaria de traducción en los complejos ribonucleoproteicos compactos depende de la integridad del mRNA. Se muestra también la significación estadística (*p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,005) respecto a los valores control (150 mM de NaCl).

Al analizar el mutante C125W de CERKL, que previamente habíamos demostrado que no se une a eIF3B, pudimos observar que la interacción con las proteínas PABP, HSP70 y RPS3 no se veía afectada por el tratamiento con RNasa A en ninguna de las concentraciones salinas utilizadas (Figura 34). Por tanto, puesto que las interacciones del mutante CERKL C125W con esas proteínas no parecen depender de la integridad de los mRNAs, como ocurría en el caso de CERKL WT, es probable que estas se produzcan en el citoplasma de una manera ectópica.

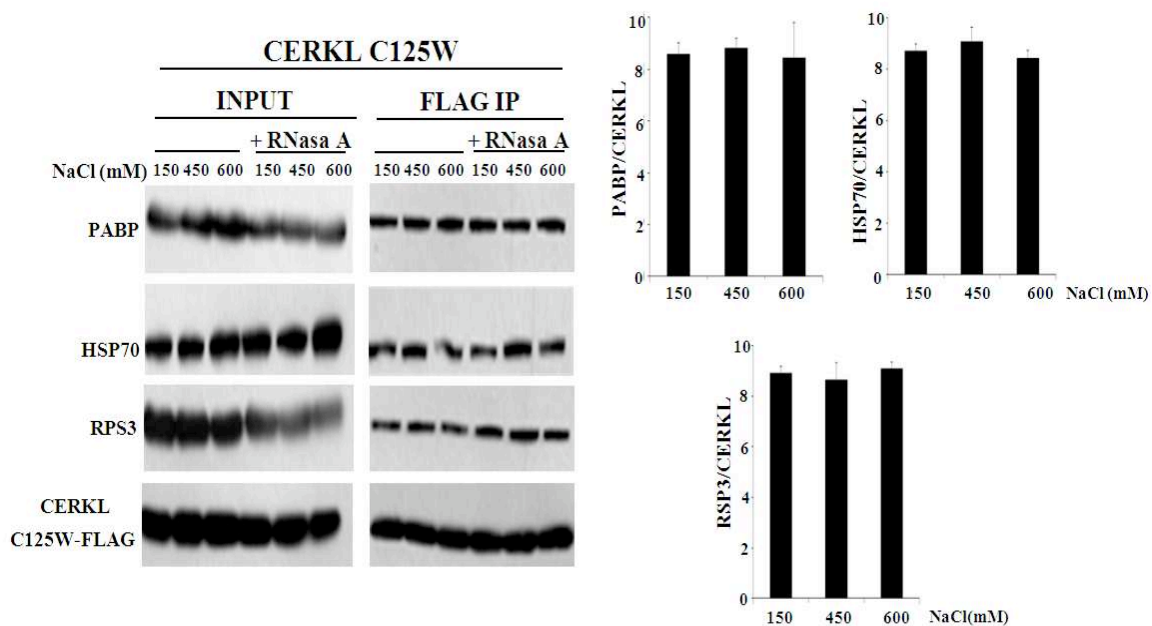


Figura 34. El mutante C125W de CERKL interacciona con componentes de la maquinaria de traducción con independencia de la integridad del mRNA. Se transfectaron transitoriamente células HEK-293T con el plásmido CERKL C125W-Flag, las células se lisaron y se realizaron inmunoprecipitaciones como se ha descrito en Metodología, analizando el inmunoprecipitado por Western blot. Antes, los lisados se trataron o no con RNasa A (100 μ g/mL) en presencia de tres concentraciones diferentes de NaCl (150, 450 y 600 mM), como se indica. Los lisados se inmunoprecipitaron con resina anti-Flag M2 y lisados (INPUT) e inmunoprecipitados (FLAG IP) se analizaron por Western blot, utilizando anticuerpos que reconocen las siguientes proteínas: PABP, HSP70, RPS3 y Flag (para detectar CERKL C125W). En los histogramas de la derecha se muestran las medias y desviación estándar de la cuantificación, en cuatro experimentos diferentes, de las proteínas de las bandas detectadas en las inmunoprecipitaciones realizadas con Flag de los lisados tratados con RNasa A en presencia de diferentes concentraciones salinas.

En resumen, una posible interpretación de todos los resultados descritos hasta el momento sería que la proteína CERKL entra en el núcleo, donde se une a mRNAs, y que, tras transportarlos al citoplasma, ayuda a que se formen los polisomas para la

traducción de los mismos. Esta hipótesis explicaría también el hecho de que tanto la entrada y salida del núcleo como la transcripción activa sean necesarias para localizar CERKL en los gránulos de estrés ya que, en situaciones de estrés, CERKL y sus RNAs mensajeros asociados se dirigirían a los gránulos de estrés y/o a los cuerpos P. Además, CERKL se encontraría también formando parte de partículas ribonucleoproteicas compactas y, por tanto, traduccionalmente inactivas, cuya posible función sería proteger a los RNAs mensajeros hasta que ocurra su traducción en el lugar y en el momento apropiados. El hecho de que el mutante C125W de CERKL sea incapaz de entrar al núcleo, explicaría que tampoco sea capaz de formar parte, por ejemplo, de los gránulos de estrés, al no poder unirse a los RNAs mensajeros en el núcleo. Esto probablemente explicaría también los resultados de la Figura 34 en relación con las interacciones del mutante de CERKL con las proteínas de la maquinaria de traducción.

8. CERKL se asocia a los microtúbulos

Durante el análisis de la localización de CERKL en los gránulos de estrés, llevamos a cabo inmunofluorescencias en las que, en vez de fijar las células durante 20 minutos con 4% de paraformaldehído, las fijábamos con concentraciones más bajas (1-2%) y durante menos tiempo.

Este tipo de fijación permite una mejor observación de los gránulos de estrés, ya que se pierde parte de la fracción soluble de las células (Kimball *et al.*, 2003). En estas condiciones, además de la distribución en forma de agregados, observábamos que CERKL presentaba una disposición filamentosa que tenía semejanza con la que muestra el citoesqueleto de las células (Figura 35A).

Asimismo, hay que recordar que entre las proteínas identificadas en el estudio proteómico que interaccionaban con CERKL se encontraban la α - y la β -tubulina (ver Tabla 6 y flechas 3 y 4, respectivamente, en la Figura 30A). Por tanto, comparamos la localización de CERKL con la de la β -tubulina mediante inmunofluorescencia y observamos que el marcaje filamentoso que obteníamos para CERKL en las condiciones mencionadas arriba coincidía bastante bien con el marcaje de los microtúbulos (Figura 35B). Al tratar las células con colchicina, un inhibidor de la polimerización de los microtúbulos, se observa que el marcaje debido a la β -tubulina adquiere un patrón difuso y que, a su vez, se pierde la disposición filamentosa de CERKL y se hace también más difusa (Figura 35B).

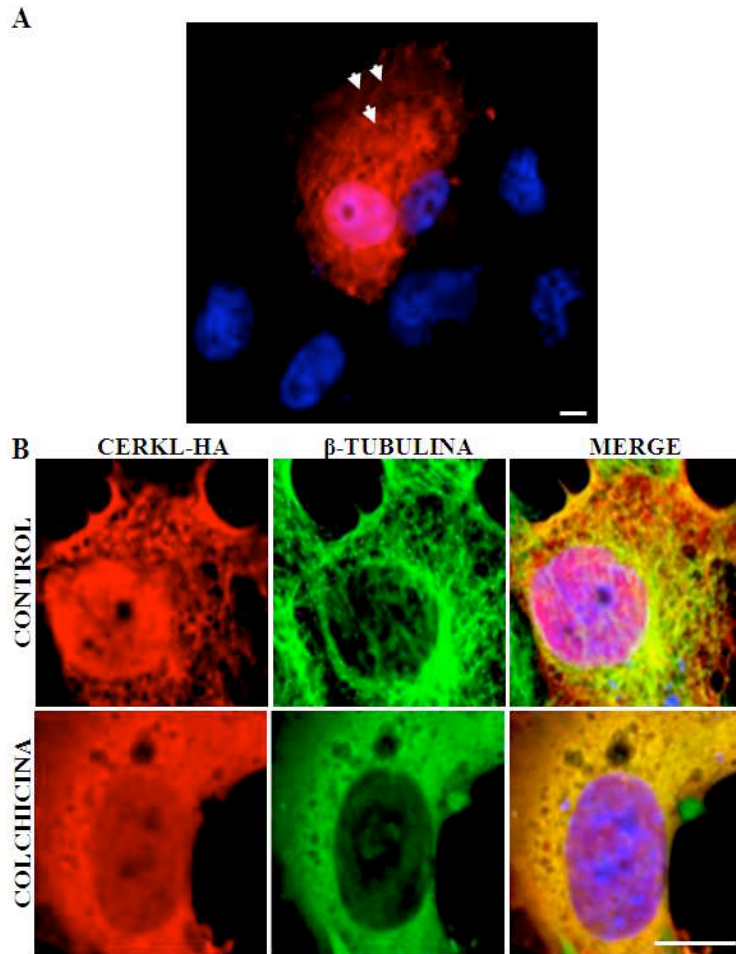


Figura 35. CERKL se asocia también a los microtúbulos. Se transfectaron transitoriamente células COS-7 con el plásmido CERKL WT-HA y, tras 48 horas, se fijaron y se incubaron con los anticuerpos anti-HA (A y B) y anti- β tubulina (B), seguido por los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 594 (rojo) o 488 (verde). Las flechas en (A) muestran las estructuras filamentosas que forma CERKL y que recuerdan el aspecto del citoesqueleto de las células. Los núcleos (azules) están teñidos con DAPI. En (B), las células se trataron también (fila inferior) o no (fila superior) con el inhibidor de la polimerización de microtúbulos colchicina ($1 \mu\text{g/ml}$, 2 horas), que elimina las estructuras filamentosas de CERKL. Todas las barras: $10 \mu\text{m}$.

Además, CERKL se encuentra localizada igualmente en otras estructuras formadas por microtúbulos, como los centriolos, que marcábamos con anticuerpos anti-pericentrina (Figura 36A), o el huso acromático, que identificábamos en células en división con los anticuerpos anti-acetil- α -tubulina (Figura 36B, donde se observa la colocalización de CERKL con el huso acromático en diferentes fases del ciclo celular, aquí concretamente en la profase tardía y en la meta-anafase). Por tanto, todos estos resultados nos indican que la proteína CERKL está asociada a los microtúbulos.

Para estudiar con mayor detalle la relación de la proteína CERKL con la α - y la β -tubulina, comprobamos su interacción mediante inmunoprecipitación. Para ello, transfectamos células HEK-293T con los plásmidos CERKL WT-Flag y Flag-GFP como control. Transcurridas 48 horas, parte de las células se sometió a un tratamiento con $1 \mu\text{g/ml}$ de colchicina durante 2 horas. Tras ese tiempo, se inmunoprecipitó Flag en las diferentes muestras y se analizaron los inmunoprecipitados mediante Western blot.

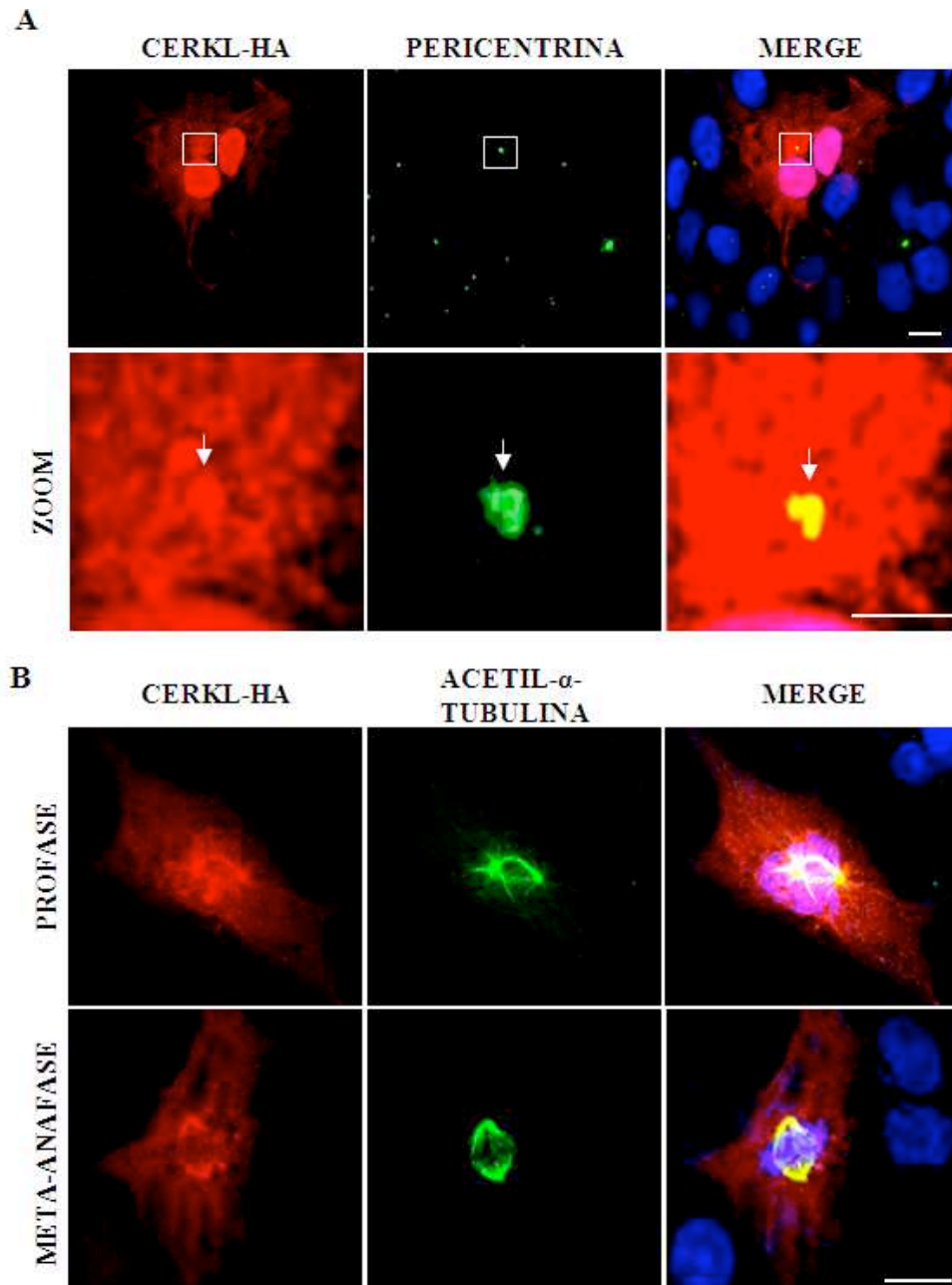


Figura 36. CERKL se asocia a varias estructuras formadas por microtúbulos. Se transfectaron transitoriamente células COS-7 con el plásmido CERKL WT-HA y, tras 48 horas, se fijaron y se incubaron con los anticuerpos anti-HA (**A** y **B**) y anti-pericentrina como marcador de centriolos (**A**) o anti-acetil α -tubulina como marcador del huso acromático (**B**), seguido por los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 594 (rojo) o 488 (verde). Las flechas en (**A**) indican la posición de los centriolos y los rectángulos corresponden a la ampliación mostrada en ZOOM. Se observa que CERKL se encuentra en cantidad elevada en los centriolos. Los núcleos (azules) están teñidos con DAPI. En (**B**) se observa la colocalización de CERKL con el huso acromático durante una profase (arriba) y una meta-anafase (abajo). Todas las barras: 10 μ m.

De acuerdo con los resultados obtenidos, CERKL interacciona con las proteínas α - y β -tubulina celulares y esta interacción se pierde tras el tratamiento con colchicina (ver Figura 37A). Esto nos indica que CERKL se une a las tubulinas de los microtúbulos.

Por el contrario, la interacción de CERKL con las proteínas eIF3B, PABP, HSP70 y RPS3 no se ve afectada por el tratamiento con colchicina (ver Figura 37A), lo que indica que es independiente de la integridad de estos. Por lo tanto, los datos obtenidos sugieren que CERKL interacciona previamente con los restantes componentes proteicos de un complejo ribonucleoproteico que, posteriormente, se unirá a los microtúbulos.

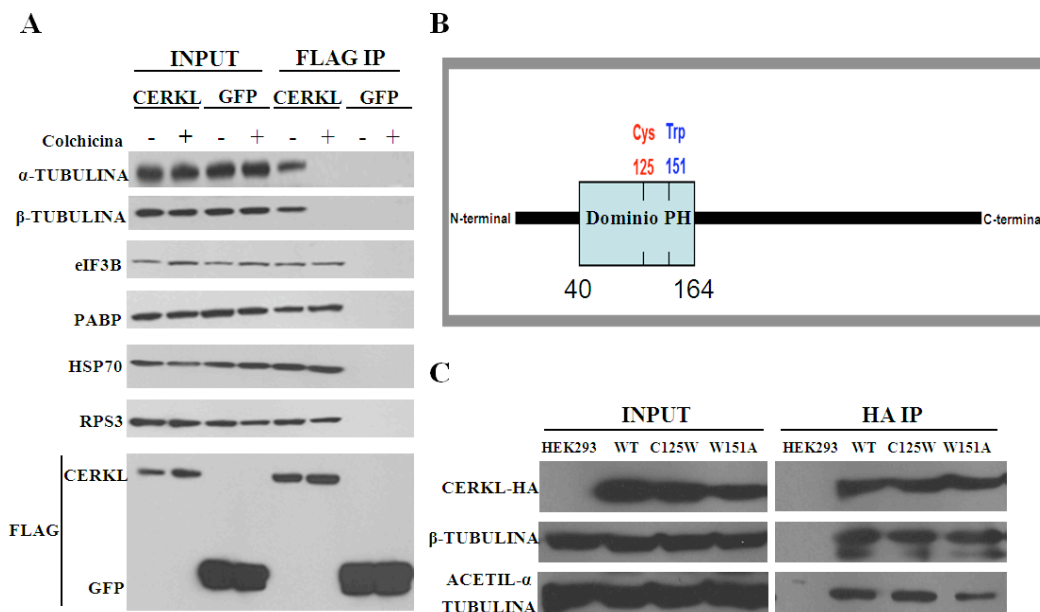


Figura 37. La interacción de CERKL con las proteínas de la maquinaria de traducción es independiente de la integridad de los microtúbulos y su unión a estos no depende del dominio de “pleckstrin homology” (PH). En (A y C) se transfectaron transitoriamente células HEK-293T, tratadas o no con colchicina (1 μ g/ml) durante 2 horas en (A), con los plásmidos CERKL WT-Flag y Flag-GFP como control (A) o CERKL WT-HA, CERKL C125W-HA y CERKL W151A-HA y células sin transfectar (HEK-293) como control (C). A partir de lisados (INPUT) se realizaron inmunoprecipitaciones (IP) con anticuerpos anti-Flag (A) o anti-HA (C). Los lisados y los inmunoprecipitados se analizaron por Western blot utilizando anticuerpos que reconocen Flag, eIF3B, PABP, HSP70 y RPS3 (A) o β -tubulina y acetil α -tubulina como marcadores de los microtúbulos (C). En (B) se muestra esquemáticamente el dominio de “pleckstrin homology” (PH) de la proteína CERKL (aminoácidos 40 a 164) y las mutaciones de dos aminoácidos de este dominio, una patológica (Cys 125), que corresponde a la conversión del residuo cisteína 125 en un triptófano y la otra (Trp 151), generada en nuestro laboratorio y que corresponde a la conversión del residuo triptófano 151 en una alanina.

Como se ha descrito en la Introducción, CERKL posee un dominio PH (“Pleckstrin Homology”) entre los aminoácidos 40 y 164 de su extremo N-terminal (Figura 37B). Se han descrito dos funciones principales para este tipo de dominios, la unión a lípidos y la unión al citoesqueleto (Rebecchi y Scarlata, 1998). Por tanto, utilizamos dos mutantes puntuales de ese dominio de CERKL para comprobar si era responsable de la unión de CERKL al citoesqueleto. Por un lado, utilizamos el mutante patológico C125W y por otro generamos un nuevo mutante, W151A, ya que el residuo de triptófano 151 es un

residuo del dominio PH clave y conservado. Immunoprecipitamos la proteína CERKL a partir de células HEK-293T sin transfectar (como control) y también de las mismas células que superexpresaban CERKL WT-HA, CERKL C125W-HA y CERKL W151A-HA. Después, mediante Western blot, observamos la interacción de CERKL WT y de los mutantes con los microtúbulos, utilizando anticuerpos contra acetil- α -tubulina y β -tubulina. La Figura 37C muestra que tanto la proteína WT como las dos mutantes se unen a los microtúbulos y, por tanto, que no tienen ninguna alteración que impida esa unión. Este resultado, además de mostrar que, en el caso del mutante C125W, la unión a microtúbulos no es la causante de su patogenicidad, indica también, teniendo en cuenta sobre todo el resultado obtenido con el mutante W151A, que el dominio PH de CERKL no desempeña un papel importante en la unión de la proteína a los microtúbulos.

8.1. Las partículas ribonucleoproteicas compactas que contienen CERKL se unen a los microtúbulos

Como hemos mencionado, cuando se fijan las células con un porcentaje bajo de paraformaldehído se detecta una porción de CERKL que está asociada al citoesqueleto de microtúbulos. Observando esta asociación con mayor detalle, se pone de manifiesto que esa porción de CERKL forma agregados, con un tamaño de 100-200 nm de diámetro, que parecen estar unidos al citoesqueleto de microtúbulos como las cuentas de un collar (Figura 38).

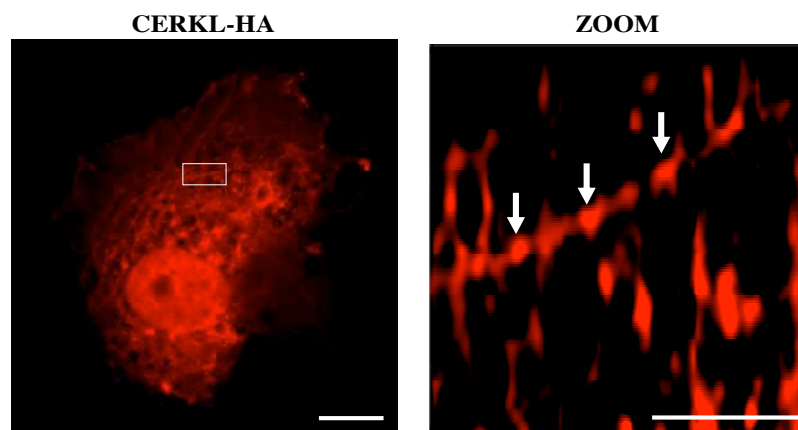


Figura 38. CERKL forma estructuras granulares asociadas a los microtúbulos. Se transfectaron transitoriamente células COS-7 con el plásmido CERKL WT-HA y, tras 48 horas, se fijaron y se incubaron con el anticuerpo anti-HA seguido por el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594 (rojo). El rectángulo corresponde a la ampliación mostrada en ZOOM y las flechas señalan las estructuras granulares formadas por CERKL. Barras: 10 y 2 μ m en la imagen original y en la de ZOOM, respectivamente.

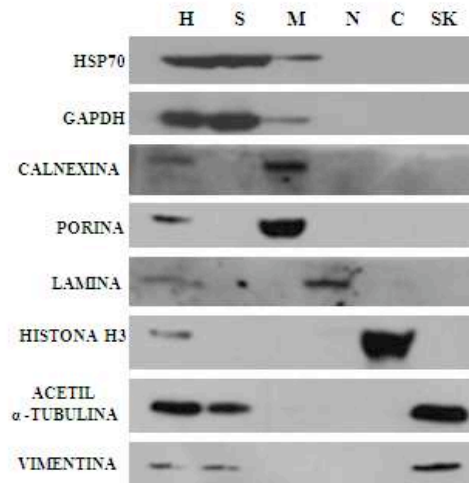
Puesto que CERKL forma partículas ribonucleoproteicas compactas y, además, se une a los microtúbulos, comprobamos si los agregados unidos a los microtúbulos correspondían a esas partículas. Para ello, aislamos la fracción del citoesqueleto de células transfectadas con CERKL-FLAG y, tras verificar su pureza (Figura 39A), inmunoprecipitamos CERKL-FLAG y analizamos su interacción con las demás proteínas de las partículas ribonucleoproteicas compactas. Como muestra la Figura 39B, la interacción de CERKL con las proteínas eIF3B, PABP, HSP70 y RPS3 también ocurre en la fracción de citoesqueleto purificado. Además, al igual que habíamos observado previamente, estas interacciones, excepto con la proteína eIF3B, son sensibles al tratamiento con RNasa A cuando este se lleva a cabo en presencia de una concentración salina elevada (Figura 39B).

Con todos estos datos, y teniendo en cuenta además los estudios con colchicina mencionados en el apartado anterior, podemos concluir que las partículas ribonucleoproteicas compactas que contienen CERKL se asocian a los microtúbulos una vez ya formadas y, por tanto, no se forman sobre ellos a partir de sus componentes.

8.2. La asociación de CERKL y de sus proteínas acompañantes con microtúbulos ocurre también en células neuronales diferenciadas

Todo el trabajo descrito hasta el momento se ha llevado a cabo en las líneas celulares utilizadas habitualmente en el laboratorio, empleando para cada tipo de experimento la más adecuada. Por ejemplo, se emplearon células COS-7 para las inmunofluorescencias iniciales, HEK-293T para obtener una mayor superexpresión de las distintas proteínas, etc. Aunque cualitativamente en todas ellas observamos resultados similares, conviene precisar que la ausencia de CERKL en los enfermos de retinosis pigmentaria causa específicamente la muerte de los fotorreceptores. Cabe destacar aquí que también habíamos encontrado que la proteína CERKL se encontraba localizada en los gránulos de estrés en la línea precursora de fotorreceptores 661W (ver Figura 20). Asimismo, y como ya hemos comentado antes (pp. 64-65), se ha mostrado *in vivo* que, tras un estrés lumínico, la cantidad de CERKL en los segmentos externos de los fotorreceptores aumenta y además forma agregados (Mandal *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta nuestros resultados, podríamos deducir que estas estructuras particuladas formadas tras el estrés lumínico corresponden a los gránulos de estrés o a los gránulos ribonucleoproteicos densos a los que, como hemos demostrado nosotros en las líneas celulares en cultivo, se asocia la proteína CERKL.

A



B

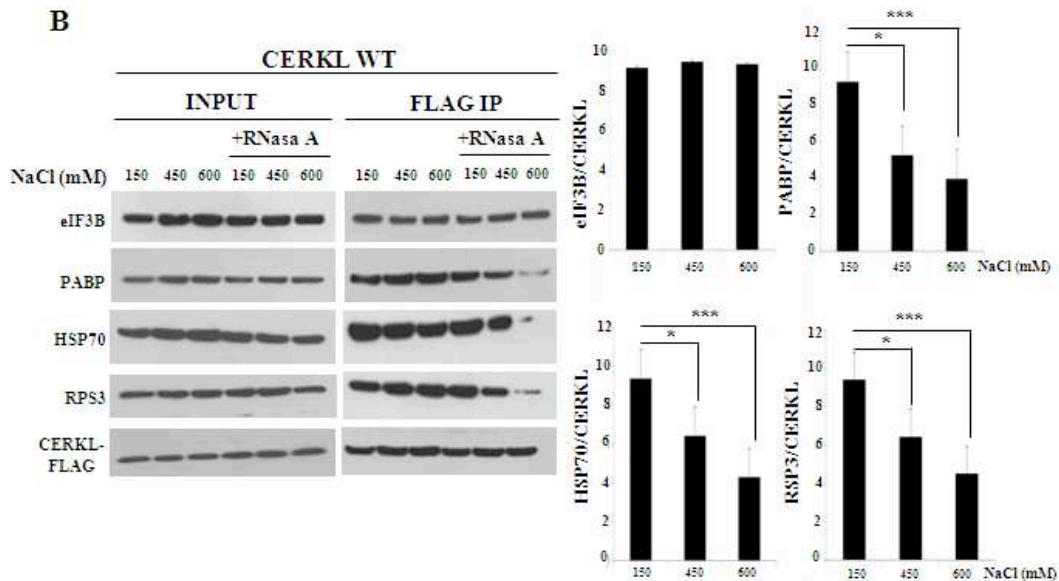
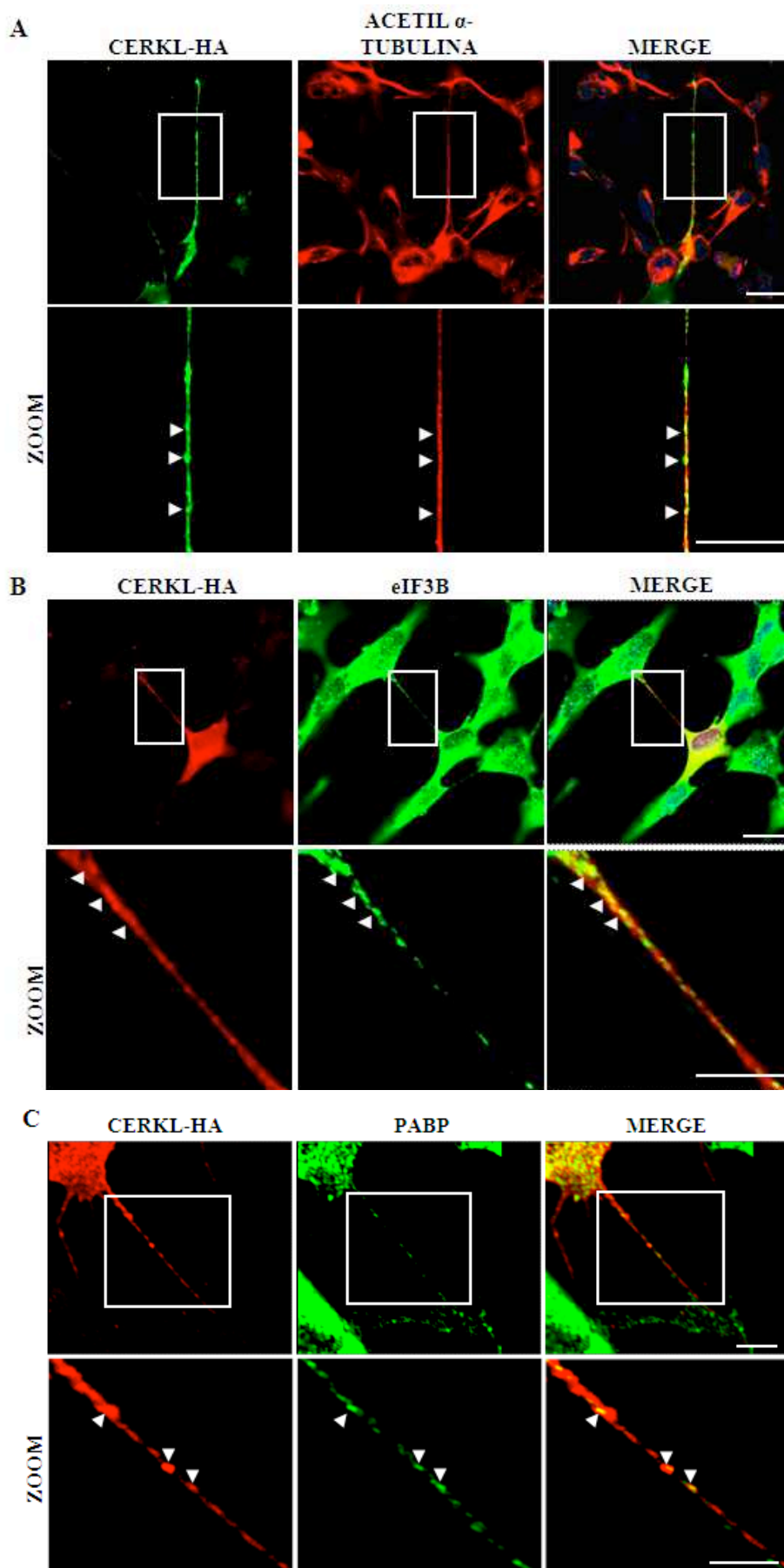


Figura 39. CERKL se asocia a los microtúbulos formando partículas ribonucleoproteicas compactas y su interacción con proteínas de la maquinaria de traducción depende de la integridad del mRNA. (A) Se transfectaron transitoriamente células HEK-293T con el plásmido CERKL WT-Flag y, tras 48 horas, se lisaron y se obtuvieron cinco fracciones diferentes mediante un kit de subfraccionamiento celular (ver Metodología) que, a partir del lisado total (H), separa las fracciones siguientes: S (soluble), M (membranal), N (nuclear), C (cromatina) y SK (citoesqueleto). Se comprobó la pureza de cada fracción mediante Western blot con los siguientes marcadores de cada fracción: HSP70 y GAPDH (fracción soluble), calnexina y porina (fracción membranal), lamina (fracción nuclear), histona H3 (cromatina) y acetil- α -tubulina y vimentina (citoesqueleto). (B) A partir de la fracción SK de citoesqueleto, tratada o no con RNasa A (100 μ g/mL) en presencia de las concentraciones indicadas de NaCl (150, 450 y 600 mM), se realizó una inmunoprecipitación con anti-Flag y el lisado de la fracción (INPUT) y los eluidos (FLAG IP) se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos contra FLAG, eIF3B, PABP, HSP70 y RPS3. En los histogramas de abajo, se muestran las medias y desviación estándar de tres experimentos diferentes en los que se cuantificaron las correspondientes bandas obtenidas en las inmunoprecipitaciones, realizadas con Flag, de los lisados tratados o no con RNasa A y diferentes concentraciones salinas. Se muestra también la significación estadística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$) respecto a los valores control (150 mM de NaCl).

Dado que los fotorreceptores son un tipo de neuronas altamente diferenciadas, parece apropiado comprobar si CERKL se comporta también de igual forma en estas células. Para ello utilizamos las células SH-SY5Y, que se consideran un modelo adecuado de funcionamiento y diferenciación neuronal (Pahlman *et al.*, 1990; Xie *et al.*, 2010). Estas células, derivadas de neuroblastoma, se diferencian cuando se reduce la concentración de suero en el medio de cultivo (de un 10% por ejemplo hasta el 1%) y se añade ácido retinoico a una concentración de 10 μ M durante un periodo de 24 a 96 horas. Durante el proceso de diferenciación, las células comienzan a expresar marcadores de células neuronales y forman también, a nivel morfológico, unas prolongaciones de la membrana plasmática del tipo de las neuritas, que son extensiones de la célula altamente polarizadas y diferenciadas y que están presentes en las neuronas (Agholme *et al.*, 2010).

Por tanto, realizamos experimentos en los que transfectamos las células SH-SY5Y con CERKL WT-HA durante 24 horas y las diferenciamos hacia un fenotipo neuronal mediante un tratamiento, durante otras 36 horas, con ácido retinoico a la concentración mencionada arriba y en presencia de una concentración de suero del 1%. En esas condiciones, pudimos observar que CERKL colocalizaba también con eIF3B, PABP y RPS3 en las células así diferenciadas (Figura 40B-D). Del mismo modo, CERKL colocalizaba, como habíamos observado en las otras células, tanto con microtúbulos polimerizados (identificados con el marcador acetil- α -tubulina) (Figura 40A) como con RNA (imágenes y diagrama de abajo en la Figura 41). Dichas colocalizaciones eran también evidentes en las prolongaciones axoniformes de las células, donde CERKL presentaba sobre todo una distribución particulada. El mismo experimento lo realizamos utilizando el mutante CERKL C125W, comprobando su escasa presencia en las neuritas y que no colocalizaba con RNA (imágenes y diagrama de la derecha en la Figura 41), lo que implica que la asociación de CERKL con los microtúbulos tiene importancia fisiológica en neuronas.

CERKL se encuentra por tanto en partículas ribonucleoproteicas compactas que se unen al citoesqueleto y que están también presentes en los segmentos polarizados de células neuronales diferenciadas. Las neuritas presentan una alta analogía con los segmentos externos de fotorreceptores, que son regiones con un alto contenido en microtúbulos en las que existe un transporte activo de material a través del citoesqueleto. Por tanto, cabría la posibilidad de que las partículas ribonucleoproteicas compactas pudieran realizar algún tipo de transporte.



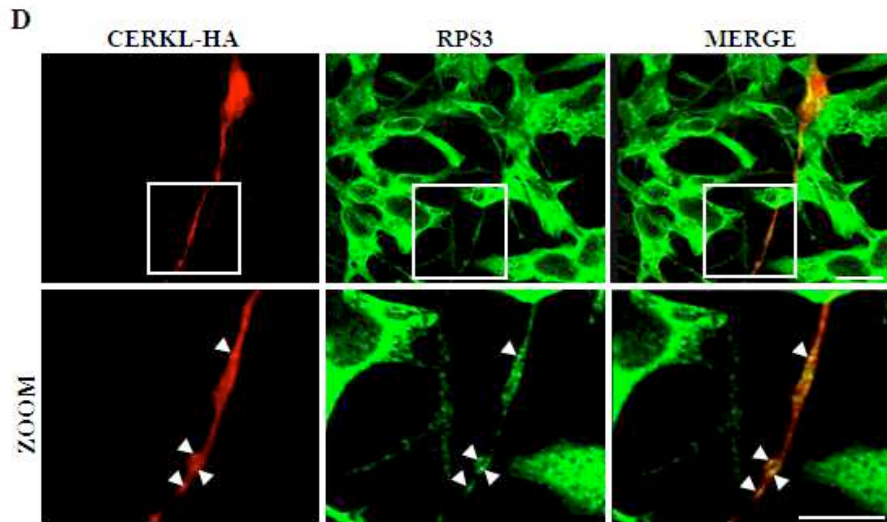


Figura 40. CERKL se asocia a microtúbulos y a gránulos de estrés en células SH-SY5Y diferenciadas. Se transfetaron transitoriamente células SH-SY5Y con el plásmido CERKL WT-HA y, tras 48 horas, se diferenciaron con ácido retinoico $10 \mu\text{M}$ durante 36 horas más. Después, las células se fijaron y se incubaron con un anticuerpo anti-HA y con los que reconocen acetil- α -tubulina (A), para visualizar neuritas o PABP (B), eIF3B (C) o anti-RPS3 (D), como marcadores de gránulos ribonucleoproteicos, y después con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 594 (rojo) o 488 (verde). CERKL colocaliza con todas esas proteínas. Los rectángulos corresponden a la ampliación mostrada en ZOOM y las puntas de flecha en las imágenes ZOOM muestran las estructuras granulares formadas por CERKL. Todas las barras: $10 \mu\text{m}$.

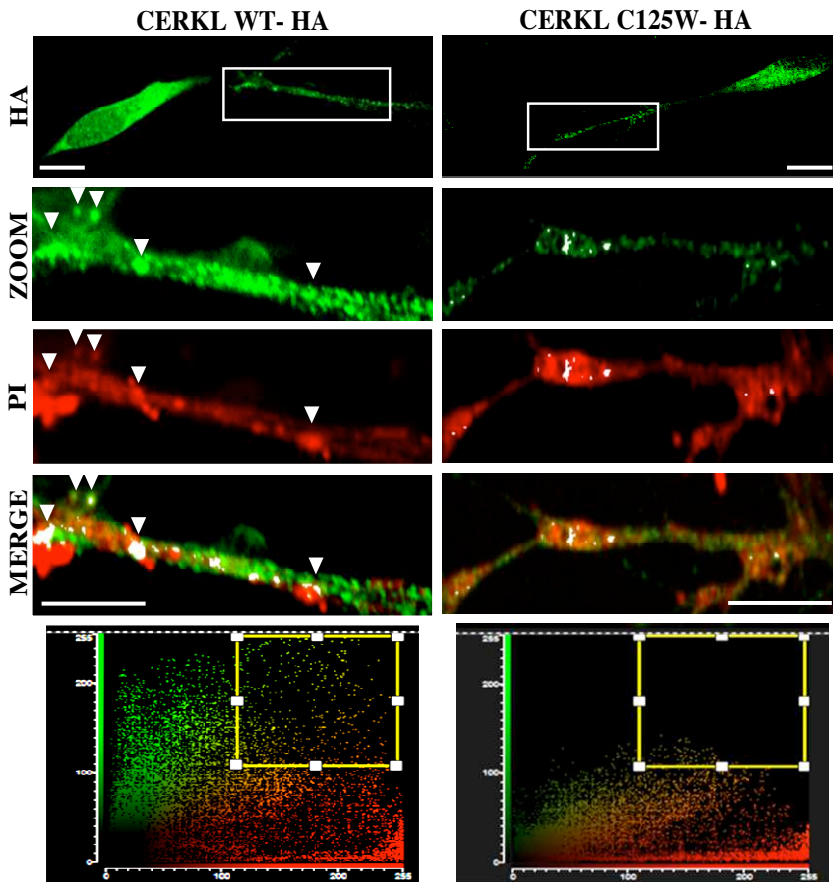


Figura 41. A diferencia de CERKL WT, el mutante C125W de CERKL no colocaliza con RNAs en las partículas ribonucleoproteicas. Se transfetaron transitoriamente células SH-SY5Y con CERKL WT-HA o CERKL C125W HA y se diferenciaron como se describe en la leyenda de la Figura 40. Tras la fijación, las células se incubaron con anti-HA y el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (verde) y se tiñeron con yoduro de propidio (PI, rojo) como marcador de RNA. Los rectángulos corresponden a la ampliación mostrada en ZOOM y las puntas de flecha en CERKL WT-HA muestran las estructuras granulares formadas por CERKL. Los diagramas de

abajo muestran la diferencia entre CERKL y su mutante en la colocalización (rectángulos amarillos) con el RNA. Barras: 10 y $5 \mu\text{m}$ en la imagen original y en el ZOOM, respectivamente.

Las partículas ribonucleoproteicas compactas que hemos descrito tienen un contenido formado por RNAs mensajeros y proteínas y presentan una estructura muy compacta que las hace inaccesibles a las ribonucleasas para aumentar así la estabilidad y la vida media de los mensajeros que contienen. Se han descrito en varias células gránulos compactos similares que se transportan de manera polarizada a través del citoesqueleto a diferentes regiones, donde las proteínas codificadas por los mRNAs que contienen desempeñarán su papel. Para que los mRNAs lleguen intactos a su destino, es esencial la compactación. Cuando el destino de esos gránulos es la membrana plasmática, los gránulos se anclan al citoesqueleto cortical o a la propia membrana (ver Figura 42) y tiene lugar el proceso de traducción localizada de los mRNAs (Jansen, 2001). Esta regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional es un proceso muy conservado en eucariotas, desde levaduras hasta mamíferos (Xing y Bassell, 2013) y supone, al parecer, una ventaja, al ser más rentable desde el punto de vista de la energía que se consume el llevar el RNA mensajero hasta el sitio donde se precisa su producto en un momento determinado para sintetizarlo allí que transportar hasta ese sitio las proteínas sintetizadas en otro lugar. En la lente del ojo, se ha descrito un ejemplo de este tipo de transporte en el que los gránulos contienen mRNAs que codifican proteínas específicas de la lente. Entre las proteínas que se transportan en la lente mediante este mecanismo se encuentra la proteína TDRD7, cuya disfunción causa glaucoma y cataratas (Lachke *et al.*, 2011). Este trabajo en particular, no solo nos sirve de ejemplo de esos mecanismos sino que, a la vez, pone de manifiesto la importancia de estos gránulos y del proceso de su transporte para el desarrollo y el correcto funcionamiento del ojo.

En neuronas, los gránulos que llevan a cabo este tipo de transporte se denominan gránulos neuronales y en ellos se empaquetan mensajeros específicos que son transportados a compartimentos altamente especializados que están alejados del soma neuronal, como son las dendritas y los conos axónicos (Figura 43) (Jung *et al.*, 2012). Cuando se produce algún fallo en este transporte polarizado de los mRNAs en las neuronas se ocasionan diferentes enfermedades. Una de ellas es el Síndrome del X-frágil, que está producido por mutaciones en la proteína FMRP. Esta proteína es transportada al núcleo, donde se une a mensajeros específicos a los que acompaña por el citoplasma a lo largo del citoesqueleto hasta las dendritas, que es el lugar donde tiene lugar su traducción de forma regulada (Figura 44) (Bagni y Greenough, 2005).

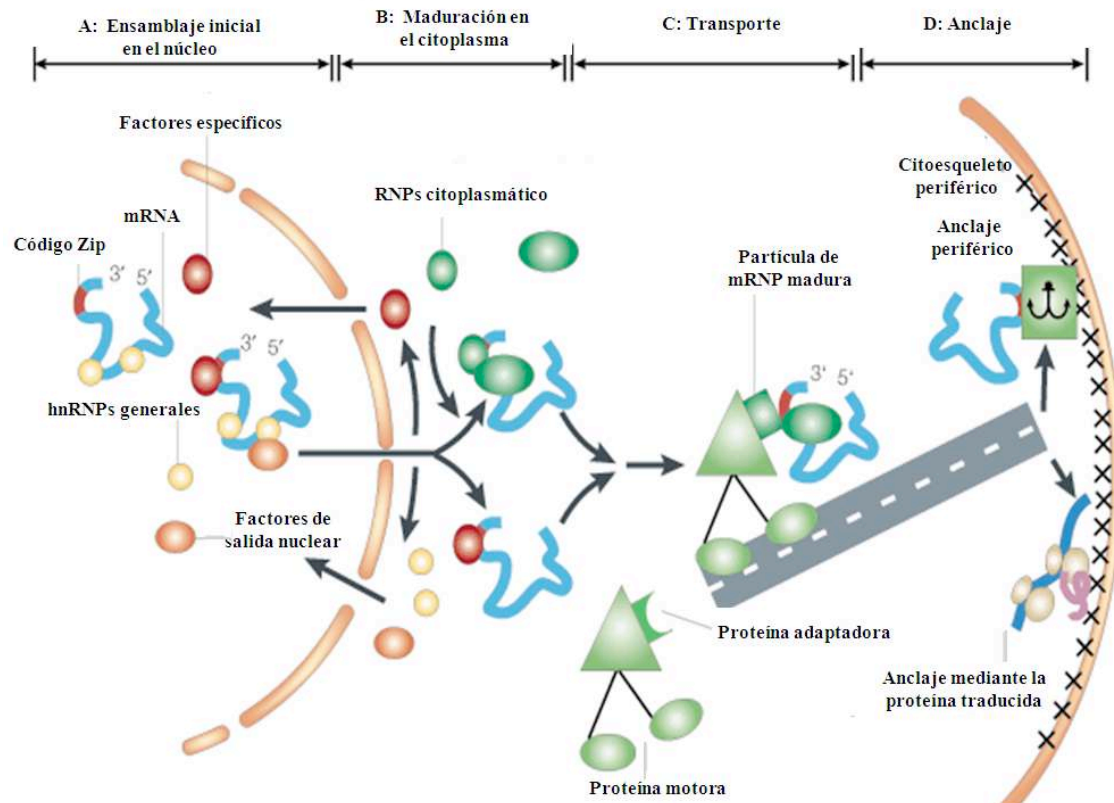


Figura 42 (adaptada de Jansen, 2001). Transporte de partículas ribonucleoproteicas (mRNP) a la membrana plasmática. (A) Ensamblaje inicial de las partículas ribonucleoproteicas en el núcleo. Las proteínas de unión a RNAs mensajeros (un ejemplo de ellas son las que forman parte de las hnRNPs, círculos rojos y amarillos) se sintetizan en el citoplasma y se transportan a través de los poros nucleares al núcleo, donde se unen a RNAs mensajeros concretos. Algunas de estas proteínas reconocen allí secuencias y/o estructuras específicas en la región 3'-UTR (el llamado código Zip de los RNAs mensajeros, que indica una determinada localización en la célula a la que deben transportarse), pero otras se unen a todo el RNA. Después, junto con otras proteínas que intervienen en la salida de los RNA mensajeros del núcleo, acompañan a estos mensajeros, de nuevo a través de los poros nucleares, hasta el citoplasma. (B) Maduración de las partículas ribonucleoproteicas en el citoplasma. En el citosol, algunas de las proteínas de unión a los RNAs mensajeros, junto con las proteínas que han intervenido en su salida del núcleo, se separan de los RNAs mensajeros y solo se mantienen asociados a ellos los factores que establecen una unión específica con esos RNAs mensajeros, aunque también, en algunos casos, esos factores proteicos específicos se reemplazan por otros. (C) Transporte de las partículas ribonucleoproteicas a través del citosol. Las partículas ribonucleoproteicas maduras se transportan a sus destinos mediante su unión al citoesqueleto y en esa interacción juegan un papel importante las proteínas motoras y adaptadoras. Ese transporte sigue una vía que transcurre desde la zona perinuclear hasta la periferia de la célula. (D) Anclaje de las partículas ribonucleoproteicas a la membrana plasmática. Por último, cuando las partículas ribonucleoproteicas alcanzan su destino final, en este caso la membrana plasmática, las ribonucleoproteínas conteniendo los RNA mensajeros se unen, o bien al citoesqueleto cortical que forma una red subyacente a la membrana plasmática, o bien se unen a lípidos y/o a proteínas de la membrana plasmática de destino. Allí, empiezan a traducirse hasta dar el producto proteico codificado por los RNAs mensajeros que han sido transportados.

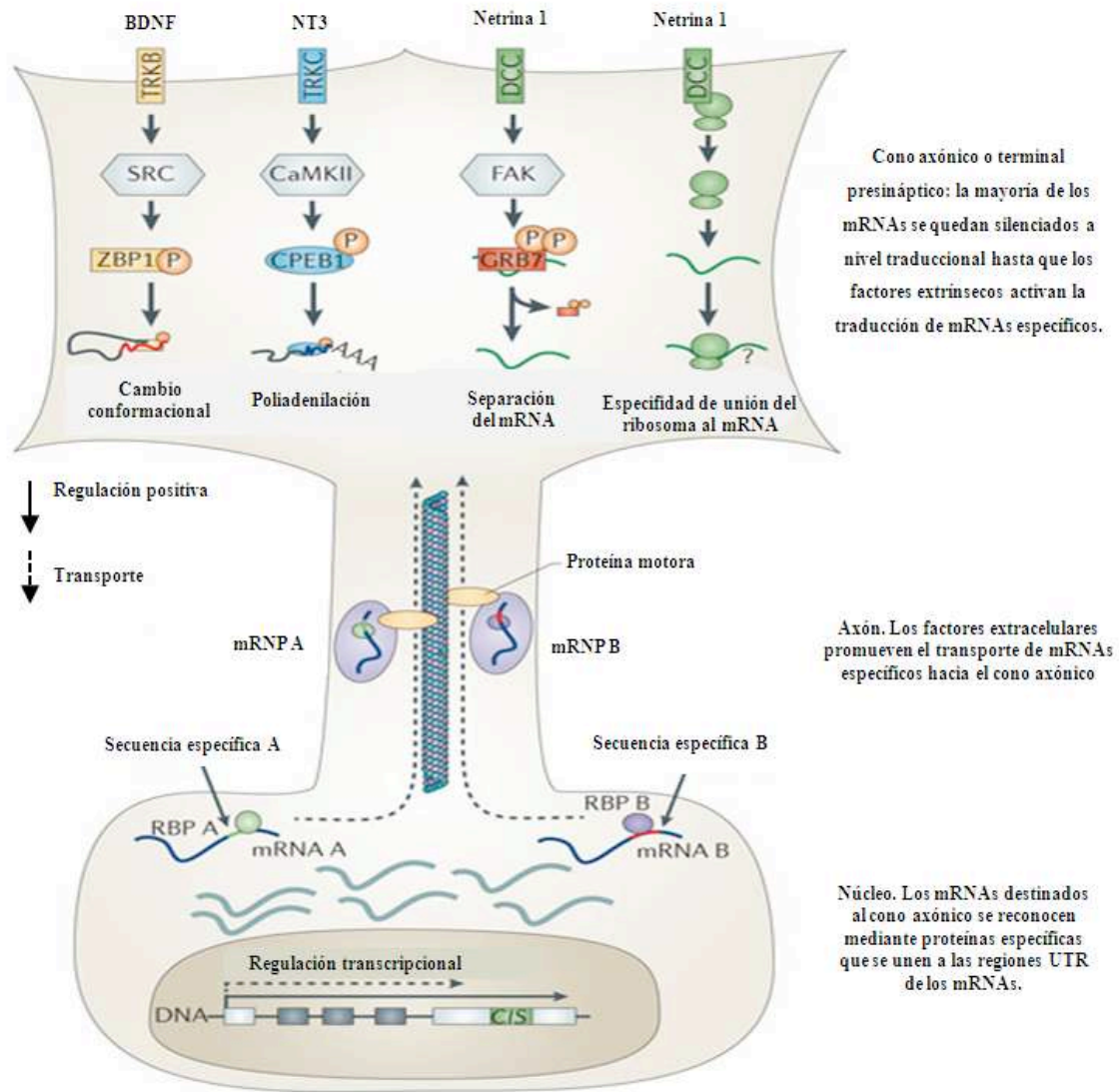


Figura 43 (adaptada de Jung *et al.*, 2012). Transporte específico de los mRNAs al cono axónico. De abajo a arriba: Los factores reguladores del transporte de determinados RNAs mensajeros (mRNAs) son los llamados elementos de actuación en *cis*, que son secuencias específicas de nucleótidos localizadas en la región 3'UTR de los mensajeros. La presencia de estas secuencias viene determinada por el sitio de terminación de la transcripción y son responsables de la unión de unas proteínas específicas (llamadas RBPs) al mRNA. Una vez formados, factores extrínsecos promueven el transporte de estos gránulos ribonucleoproteicos conteniendo RNAs mensajeros mediante microtúbulos. Su traducción se mantiene silenciada hasta su llegada al cono axónico, donde diferentes señales extracelulares causan su activación mediante diversos cambios post-traduccionales, como por ejemplo fosforilaciones, en las RBPs. En el caso de las fosforilaciones de las RBPs, estas ocurren por diferentes proteínas quinasas que pueden causar varios efectos, como cambios conformacionales en los mRNAs a los que se unen (en el caso de ZBP1), la poliadenilación de los mRNAs (en el caso de CPEB1) o su propia separación de los mRNA (en el caso de GRB7), cambios que determinan una traducción más activa de las proteínas codificadas. Otro de los mecanismos de regulación de la traducción es mediante el secuestro de ribosomas y/o la modificación post-traducciona de las proteínas ribosomales, como ocurre con el receptor trans-membranal DCC, que en su estado inactivo secuestra a los ribosomas e impide la traducción, mientras que la unión de la proteína Netrina 1 al DCC revierte ese efecto. Abreviaturas: BDNF, factor neurotrófico derivado de cerebro; KOR1, receptor opioide tipo κ ; NT3, neurotrofina 3; TRK, receptor tirosina quinasa.

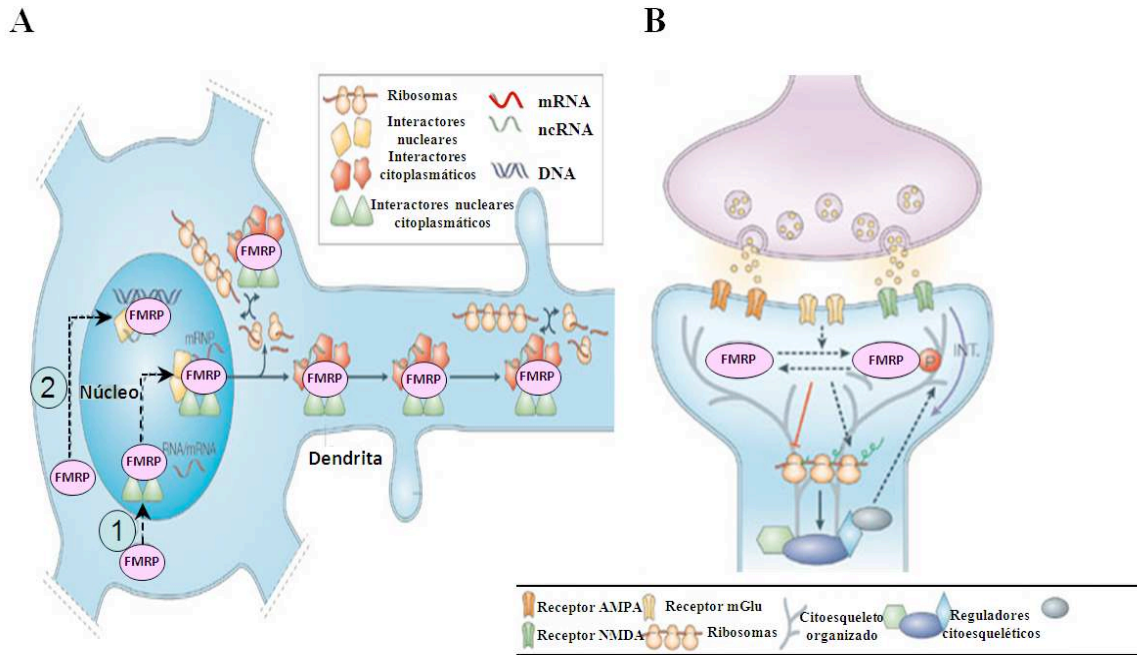


Figura 44 (adaptada de Bagni y Greenough, 2005). Transporte de gránulos ribonucleoproteicos conteniendo la proteína de Retraso Mental X Frágil a dendritas y papel de esa proteína en la traducción de los RNAs mensajeros. (A) La proteína de Retraso Mental X Frágil (FMRP) actúa de dos formas tras su entrada al núcleo. Por un lado (**flecha 1**), mediante su unión a otras proteínas, incluyendo ella misma formando dímeros, y a RNAs mensajeros específicos mientras estos se están transcribiendo. Una vez en el citoplasma, el complejo ribonucleoproteico se transporta a las dendritas donde regula la expresión de los mRNAs. Por otro lado (**flecha 2**), mediante su involucración en la ruta de RNAs de interferencia, como microRNAs (miRNA), RNAs no codificantes (ncRNA) y “short hairpin” RNAs (shRNA), que se unen a los mensajeros diana para reprimir su traducción hasta llegar a las dendritas. Allí, mediante señales específicas, se elimina la represión y se permite la síntesis de las proteínas codificadas. **(B)** En la sinapsis, mediante la activación de los mGluR (receptores metabotrópicos de glutamato), se induce la fosforilación de la proteína FMRP. Esta fosforilación elimina la inhibición de la síntesis proteica y así se expresan los mensajeros que codifican proteínas que intervienen en la internalización de receptores de neurotransmisores, como AMPA, o proteínas que regulan la integridad y polimerización del citoesqueleto. Este proceso regula la plasticidad y maduración de una sinapsis, independientemente de las otras.

Los resultados obtenidos para CERKL sugieren un comportamiento similar al de la proteína FMRP. Además, el hecho de que los diferentes mutantes tengan afectada de diferentes maneras su localización nuclear apoya aún más el papel de CERKL en esa función de acompañamiento de mensajeros específicos a lo largo de los microtúbulos, ya que su ausencia del núcleo les impide unirse a los mRNAs para facilitar su transporte al citoplasma y, posteriormente, a las diferentes estructuras donde se localiza CERKL.

9. La proteína CERKL se une a los RNAs mensajeros de los péptidos similares a la humanina (“humanin like peptides”) y al RNA no codificante de reconocimiento de la señal RN7SL2 (“signal recognition particle RNA”)

Por todo lo anteriormente expuesto, las partículas ribonucleoproteicas de las que forma parte CERKL podrían corresponder a gránulos de transporte que se desplazan por microtúbulos. Tratamos por tanto de identificar los RNAs asociados a estas partículas, para lo que empleamos la técnica de RIP-Seq. Para ello, transfectamos células HEK-293T con los plásmidos CERKL WT-Flag y Flag-GFP como control y, tras 48 horas, las células se lisaron y se inmunoprecipitó Flag. El RNA presente en los eluidos se purificó (ver Metodología) y, a partir del mismo, se construyó una librería que se utilizó para secuenciarlo. La construcción de la librería, la secuenciación del RNA y el análisis de los datos se realizó en la Unidad de Genómica de la Fundación Parque Científico de Madrid, como se detalla en la sección de Metodología. En la Tabla 6 se muestran los RNAs que presentaron un enriquecimiento de al menos 5 veces en la muestra de CERKL con respecto a la de GFP. Dentro de este grupo cabe destacar la presencia de los RNAs mensajeros que codifican los péptidos similares a la humanina de clase 8, 2, 6 y 10, que se encuentran enriquecidos en algo más de 11, 10, 8 y 7 veces, respectivamente, en su unión a CERKL respecto a su unión a GFP.

La humanina es un péptido de 24 aminoácidos codificado por el gen *MT-RNR2*, que inicialmente se identificó como una pauta de lectura abierta en el genoma mitocondrial dentro del gen que codifica el RNA ribosómico mitocondrial 16S (Hashimoto *et al.*, 2001a). Sin embargo, es muy probable que este péptido no se transcriba de forma natural desde el DNA mitocondrial, sino que lo haga a partir del núcleo, ya que la secuencia correspondiente a una parte del RNA ribosómico mitocondrial 16S incluye una cola de poliA (Hashimoto *et al.*, 2001b), que está ausente en el sistema genético mitocondrial. En cualquier caso, se ha visto que la humanina tiene una potente capacidad protectora, previniendo en modelos de la enfermedad de Alzheimer la acumulación del péptido beta-amiloide y la pérdida de memoria asociada (Tajima *et al.*, 2005; Niikura *et al.*, 2011) y en modelos de enfermedades cardiovasculares diversas alteraciones (Muzumdar *et al.*, 2010).

Se han descrito varios mecanismos de acción, intracelulares y extracelulares, mediante los que la humanina ejerce su función antiapoptótica y citoprotectora (Lee *et al.*, 2013), que se han esquematizado en la Figura 45. Uno de los mecanismos intracelulares ocurre a través de la interacción con las proteínas proapoptóticas Bax y tBID, de forma que la

humanina impide que estas proteínas se dirijan a la mitocondria y se inicie el proceso de apoptosis (Guo *et al.*, 2003; Zhai *et al.*, 2005). Otra manera que tiene la humanina de prevenir la apoptosis por un mecanismo más complejo e indirecto es mediante su interacción con la proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina IGFBP-3 (Ikonen *et al.*, 2003).

Tabla 6. Identificación mediante RIP-Seq de los RNAs unidos a CERKL

SECUENCIA ¹	CERKL RPKM ²	GFP RPKM ³	CERKL/GFP ⁴	GEN
6:52860418-52860748	4152,6	197,1	21,0	RN7SK⁵
11:10529434-10530723	513,1	43,8	11,5	MTRNR2L8⁶
5:79945819-79946855	772,9	71,5	10,7	MTRNR2L2⁶
7:142374104-142375550	31,4	2,7	8,7	MTRNR2L6⁶
X:55207824-55208944	16,7	1,3	7,7	MTRNR2L10⁶
1:27651710-27651816	75,5	12,9	5,5	RNU6-48
5:138611869-138612009	6,0	0,23	5,3	SNORA74
14:50329271-50329567	640,7	122,6	5,2	RN7SL2⁷
1:11968209-11968328	26,4	4,4	5,0	RNU5E-1

Se indican varias características de los RNAs y sus posibles funciones.

¹ Cromosoma: inicio-fin

² Lecturas por millón de kilobases leídas en la muestra de CERKL WT

³ Lecturas por millón de kilobases leídas en la muestra de GFP

⁴ Enriquecimiento en la muestra de CERKL con respecto a la de GFP

⁵ RNA no codificante implicado en especificidad de transcripción

⁶ Genes que codifican los péptidos similares a la humanina

⁷ RNA no codificante implicado en la secreción co-traducciona de proteínas

Además de estos mecanismos que ocurren a nivel intracelular, la humanina puede actuar también a nivel extracelular al secretarse fuera de la célula, donde se une a diferentes receptores de la membrana plasmática (Yamagishi *et al.*, 2003), para ejercer un efecto autocrino o paracrino. Uno de estos receptores es el receptor similar al receptor del péptido formil 1 (FPRL1) que, tras su activación, induce, a través de una proteína G heterotrimérica, la fosforilación de ERK1/2 para ejercer una función citoprotectora (Ying *et al.*, 2004). Otro de estos receptores es el formado por tres proteínas transmembranales, CNTFR, gp130 y WSX-1 (Hashimoto *et al.*, 2009). A través de este receptor heterotrimérico se fosforila STAT3, promoviendo su transporte al núcleo y la transcripción de genes que intervienen en la supervivencia celular (ver la Figura 45).

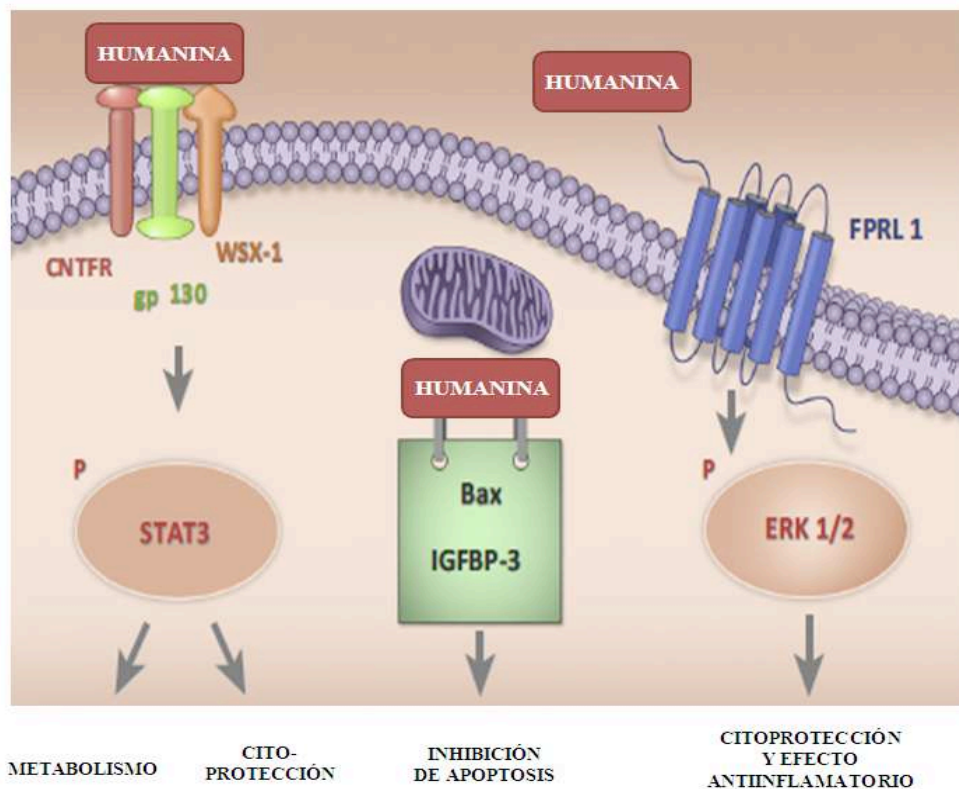


Figura 45 (adaptado de Lee *et al.*, 2013). Mecanismos intracelulares y extracelulares de acción de la humanina. La humanina tiene una función antiapoptótica y aumenta la supervivencia celular, actuando tanto desde dentro como desde fuera de la célula. Dentro de la célula, se une a las proteínas Bax e IGFBP-3, contribuyendo a que las mitocondrias preserven su integridad y, de esta manera, al aumento de la supervivencia celular. Fuera de la célula, se une a receptores transmembrana, como son FPRL1 y el receptor trimérico formado por CNTFR, gp130 y WSX-1, activando varias rutas de señalización que promueven también la supervivencia celular actuando a diversos niveles (ver abajo en la figura).

Se cree que los péptidos similares a la humanina han evolucionado a partir de la inserción del gen de la humanina, originariamente mitocondrial, en el genoma nuclear. Las primeras indicaciones de la existencia de estos péptidos se obtuvieron en 2009, cuando se describieron 13 secuencias nucleares con alta homología entre sí y con la secuencia considerada inicialmente mitocondrial (Figura 46; Bodzioch *et al.*, 2009). Por ejemplo, el gen que codifica para el péptido similar a la humanina número 8 es casi idéntico a la humanina, con una única modificación a nivel de la secuencia del codón que codifica para el aminoácido Leu en la posición 12 de la humanina, que se cambia por una Ser en el péptido similar a la humanina (Yen *et al.*, 2013). La transcripción de todos estos genes que codifican péptidos similares a la humanina está regulada por factores que promueven la apoptosis (como la estaurosporina) o la supervivencia celular (como los beta-carotenos) (Bodzioch *et al.*, 2009). Sin embargo, no se conoce mucho todavía sobre la identidad y los mecanismos de acción de estos péptidos.

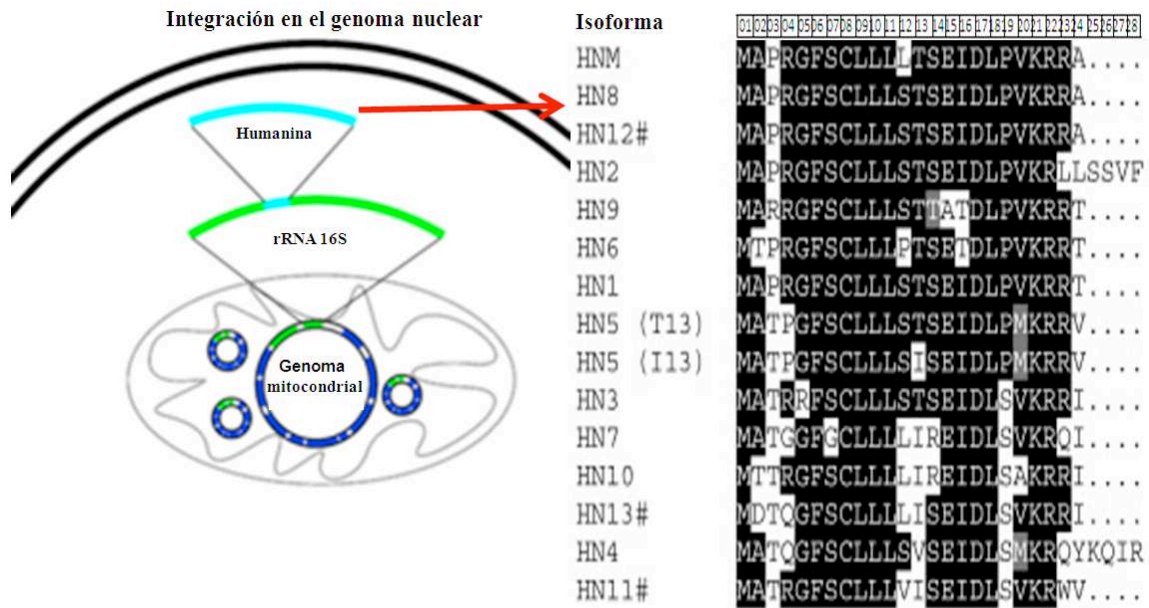


Figura 46. Humanina y péptidos similares (“humanin-like”) a ella. A la izquierda se muestra el posible mecanismo que ha dado lugar a los genes nucleares “humanin-like” y a la derecha el alineamiento de secuencias del péptido humanina mitocondrial (HNM) con los diferentes péptidos similares a la humanina y codificados por el genoma nuclear (tomado de Bodzioch *et al.*, 2009 y Yen *et al.*, 2013).

Por nuestra parte, los datos obtenidos en el RNA-seq fueron verificados mediante PCR cuantitativa. Para ello, transfectamos células HEK-293T con los plásmidos CERKL WT-Flag, CERKL C125W-Flag y Flag-GFP (como control). Después, inmunoprecipitamos Flag y purificamos el RNA de los eluidos. Tomando como RNA molde 5 ng del RNA purificado y utilizando cebadores específicos para los RNAs mensajeros de MTRNR2L2, L6 y L8 y, como controles negativos, de GAPDH y ADP/ATP translocasa 2, llevamos a cabo la transcripción reversa y una PCR cuantitativa como se describe en el apartado de Metodología. Como se observa en la Figura 47A, en las muestras inmunoprecipitadas con CERKL WT se obtuvo un enriquecimiento de 16, 12 y 8 veces, respectivamente, en la unión a MTRNRL2, MTRNRL6 y MTRNRL8 con respecto al control (GFP). La unión de CERKL a estos mensajeros es específica, ya que no se obtenía amplificación en los inmunoprecipitados de los RNA mensajeros de la GAPDH o de la ADP/ATP translocasa 2, que se utilizaron como controles. Por otro lado, analizando las interacciones que se obtenían con el mutante C125W observamos que era incapaz de unirse a los mensajeros de los péptidos similares a la humanina (Figura 47A), lo que pone de manifiesto la relevancia fisiológica de esta unión.

Una posible explicación funcional de la unión de CERKL a los mensajeros de esos péptidos podría ser que CERKL modificara la síntesis y/o estabilidad de los mismos, ya que recordemos que CERKL está presente de forma abundante en el núcleo y su salida del mismo depende de que ocurra una transcripción activa. Para verificar si, efectivamente, CERKL jugaba algún papel en la estabilidad de los mensajeros, transfectamos células HEK-293T y evaluamos mediante PCR cuantitativa la cantidad existente de los mensajeros de péptidos similares a la humana en el lisado total. Nuestros datos muestran que la superexpresión de CERKL no produce ningún efecto sobre la cantidad total de estos mensajeros (Figura 47B).

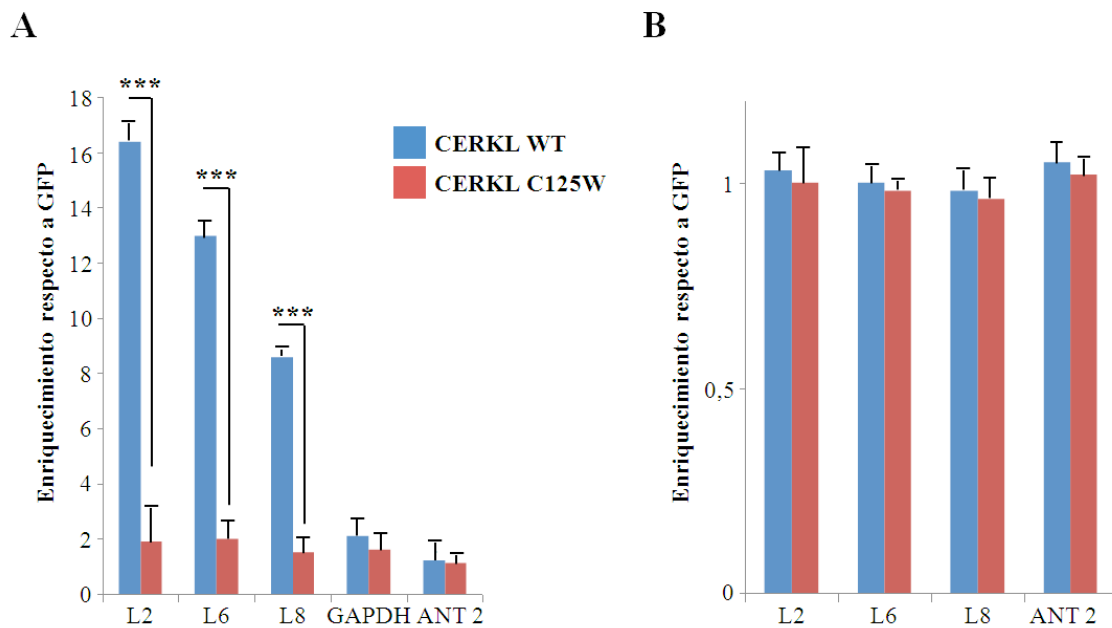


Figura 47. CERKL WT se une específicamente a los transcritos de los péptidos similares a la humana, pero no parece desempeñar un papel en la síntesis y/o estabilidad de estos transcritos. (A) Se transfectaron transitoriamente células HEK-293T con los plásmidos CERKL WT-Flag (WT), CERKL C125W-Flag (CW) y, como control, Flag-GFP (GFP), se lisaron y se inmunoprecipitó Flag. A partir del inmunoprecipitado se purificó el RNA y se determinó su concentración en un Nanodrop. Se evaluaron los niveles de los diferentes transcritos por PCR-cuantitativa (ver Metodología) partiendo de 5 ng de RNA y utilizando cebadores específicos para MTRNR2L2, L6 y L8 (L2, L6, L8) y, como controles, para GAPDH y ADP/ATP translocasa 2 (ANT 2). El eje vertical muestra el enriquecimiento de cada transcrito respecto a GFP (***) $p < 0,005$). (B) Se transfectaron células HEK-293T como en (A), se purificó el RNA de los lisados totales y se evaluaron los niveles de los transcritos por PCR-cuantitativa como en (A). Se muestra el enriquecimiento de los niveles de cada transcrito (normalizados para los del gen de actina) respecto a los de GFP (normalizados de igual forma).

El efecto de CERKL sobre la estabilidad de los RNAs mensajeros se determinó también en condiciones de estrés (ArNa 50 y 100 μ M durante 30 y 60 minutos en células HEK-293T y ArNa 250 y 500 μ M durante los mismos tiempos en células HeLa) sin observar

cambios en esa estabilidad (datos no mostrados). Con toda esta información podemos pues concluir que la superexpresión de CERKL no produce ningún cambio en la cantidad total de mensajeros de péptidos similares a la humanina, por lo que no debe intervenir en la transcripción y/o en la estabilidad de los mismos.

Dado que las partículas ribonucleoproteicas densas que contienen CERKL se unen a los microtúbulos, comprobamos si estas partículas contenían también en esta localización a los mRNAs de los péptidos similares a la humanina. Para ello, inmunoprecipitamos CERKL-Flag a partir de la fracción purificada de citoesqueleto y verificamos mediante PCR cuantitativa el enriquecimiento de los mRNAs en comparación con los de los correspondientes inmunoprecipitados de Flag-GFP. Observamos que efectivamente esas partículas unidas al citoesqueleto contenían a los mensajeros de los péptidos similares a la humanina (Figura 48A). Por el contrario, cuando analizamos el mutante C125W observamos, como era de esperar por los resultados que hemos mostrado anteriormente, que no era capaz de unirse a estos mensajeros (Figura 48A).

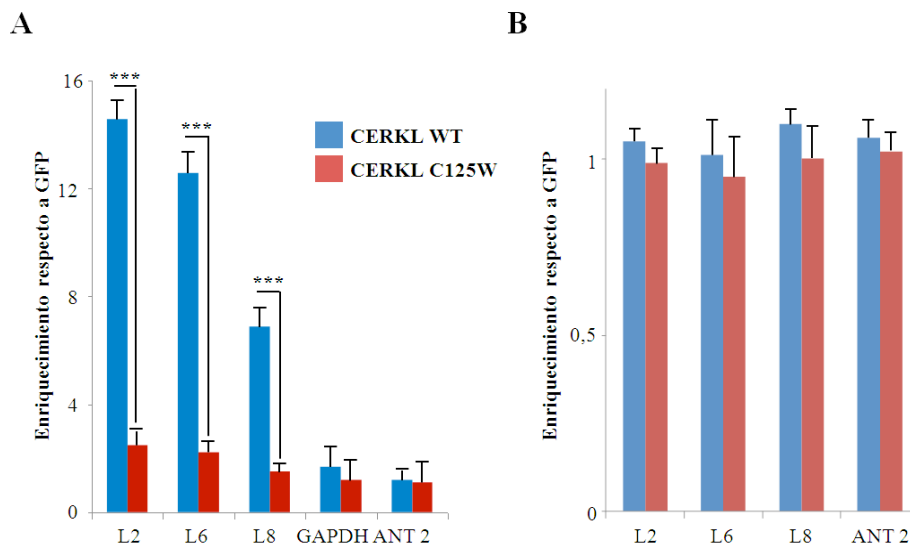


Figura 48. Las partículas ribonucleoproteicas asociadas con CERKL y unidas al citoesqueleto contienen transcritos de péptidos similares a la humanina, pero la proteína CERKL no es un factor clave para la unión de dichos transcritos al citoesqueleto. (A) Se transfectaron transitoriamente células HEK-293T con los plásmidos CERKL WT-Flag (WT), CERKL C125W-Flag (CW) y, como control, Flag-GFP (GFP). Las células se lisaron y se aisló la fracción citoesquelética (ver Metodología). A partir de esta fracción, se inmunoprecipitó Flag y se purificó el RNA, cuya concentración se determinó en un Nanodrop. Utilizando en cada caso 5 ng de RNA como molde, se evaluaron los niveles de los diferentes transcritos por PCR-cuantitativa, empleando cebadores específicos para MTRNR2L2, L6 y L8 (L2, L6, L8) y, como controles, ADP/ATP translocasa 2 (ANT 2) y GAPDH. El eje vertical muestra el enriquecimiento de los niveles de cada transcrito respecto a los de GFP (**p<0,005). **(B)** Se transfectaron células HEK-293T como en (A) y se obtuvo la fracción citoesquelética. A partir de ella se purificó el RNA para realizar la PCR-cuantitativa como anteriormente. El eje vertical muestra el enriquecimiento de los niveles de cada transcrito (normalizados con los de actina) respecto a las células transfectadas con Flag-GFP.

Como se mencionó en los apartados anteriores, CERKL se asocia en gran parte a microtúbulos y, por este motivo, comprobamos si la superexpresión de CERKL afecta a la cantidad total de los mensajeros de los péptidos similares a la humanina que están unidos al citoesqueleto. Para ello, transfectamos células HEK-293T con los plásmidos CERKL WT-Flag, CERKL C125W-Flag y Flag-GFP (como control), purificamos la fracción citoesquelética y determinamos la cantidad total de los mensajeros similares a la humanina en la fracción. Los resultados que se obtuvieron se resumen así: la cantidad de estos mensajeros unidos al citoesqueleto no cambia cuando se transfectan las células con CERKL WT (Figura 48B). En definitiva, todo esto parece indicar que CERKL forma parte de partículas ribonucleoproteicas compactas que contienen los mensajeros de los péptidos similares a la humanina y que estas partículas se unen a los microtúbulos, sin que CERKL juegue un papel en la transcripción y/o estabilidad de dichos mensajeros ni en la unión de las partículas al citoesqueleto.

Otro RNA identificado en el análisis por RNA-seq fue el RN7SL2 (ver Tabla 6). Se trata de un RNA no codificante que interviene en la secreción de proteínas en eucariotas al inicio de su entrada al retículo endoplasmático y cuyo homólogo en bacterias es responsable de la secreción a través de la membrana plasmática. Este RNA está también presente en los núcleos, donde interviene en la regulación de la transcripción, al interactuar con el factor de elongación de transcripción P-TEFb (Peterlin *et al.*, 2012). Comprobamos la unión de este RNA a CERKL mediante transcripción reversa y PCR cuantitativa, para lo que transfectamos las células HEK-293T con los plásmidos CERKL WT-Flag, CERKL C125W-Flag y Flag-GFP (como control) y, tras inmunoprecipitar Flag, purificamos el RNA, que se usó como molde. Nuestros datos muestran que CERKL se une al RNA no codificante RN7SL2, mientras que, como ocurría con los RNAs mensajeros de los péptidos similares a la humanina, el mutante C125W es incapaz de unirse a él (Figura 49). Dado que, como hemos mencionado, RN7SL2 interviene en el inicio de la secreción de proteínas cuando estas entran en el retículo endoplasmático, sería posible que las partículas compactas que contienen CERKL intervinieran en el proceso de síntesis y/o secreción de los péptidos similares a la humanina, debido a la alta homología de estos con la humanina que se secreta siguiendo esta ruta. Sin embargo, como ya se comentó y discutió en el apartado 1, no observamos colocalización de CERKL con el retículo endoplasmático mediante inmunofluorescencia.

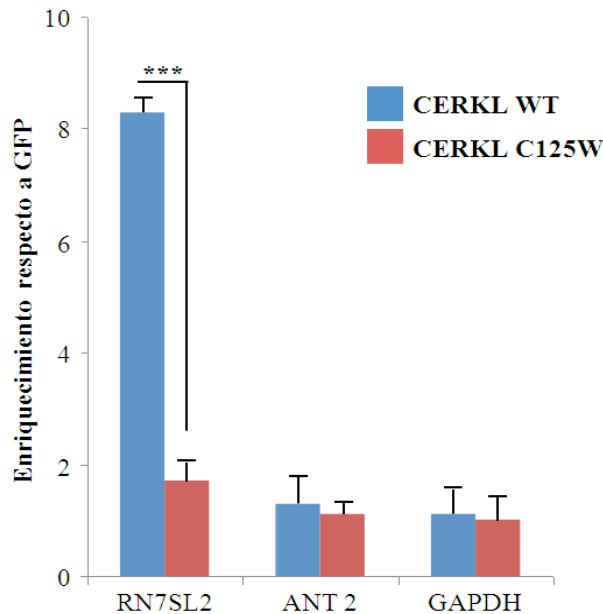


Figura 49. Las partículas ribonucleoproteicas asociadas con CERKL contienen el RNA no codificante RN7SL2. Se transfirieron transitoriamente células HEK-293T con los plásmidos CERKL WT-Flag (WT), CERKL C125W-Flag (CW) y, como control, Flag-GFP (GFP). Después, las células se lisaron y se inmunoprecipitó Flag. A partir del inmunoprecipitado, se purificó el RNA y se determinó su concentración en un Nanodrop. Partiendo de 5 ng de RNA como molde, se evaluaron los niveles de los transcritos de RN7SL2 y, como controles, los de la ADP/ATP translocasa 2 (ANT 2) y la GAPDH por PCR-cuantitativa y empleando cebadores específicos. El eje vertical muestra el enriquecimiento de los niveles de cada transcrito respecto a los de GFP (***) $p < 0,005$).

Para confirmar este resultado, analizamos también mediante fraccionamiento subcelular la posible localización de CERKL en el retículo endoplasmático, para lo que utilizamos el mismo protocolo que emplea un gradiente discontinuo de sacarosa y que ya habíamos utilizado para aislar polisomas. Sin embargo, esta vez introdujimos en el procedimiento anterior una centrifugación adicional, a 20.000 g durante 30 minutos, del sobrenadante de la centrifugación a 10.000 g, para así poder eliminar los restos de citoesqueleto, los lisosomas y los peroxisomas que se quedaban ahora en el sedimento (Figura 50A). Utilizando células HEK-293T transfiradas con CERKL WT-Flag, tampoco observamos la presencia de CERKL en la fracción enriquecida en el retículo endoplasmático (identificada con su marcador calnexina) (Figura 50B, fracción 5). Con estos resultados descartamos que CERKL intervenga en la secreción de los péptidos similares a la humanina a través del retículo endoplasmático como ocurre en la mayoría de las proteínas de secreción. Estos mismos experimentos, en cambio, indicaron la presencia de una parte de CERKL en la membrana plasmática (Figura 50B fracción 2 y Figura 50C) de la que hablaremos después.

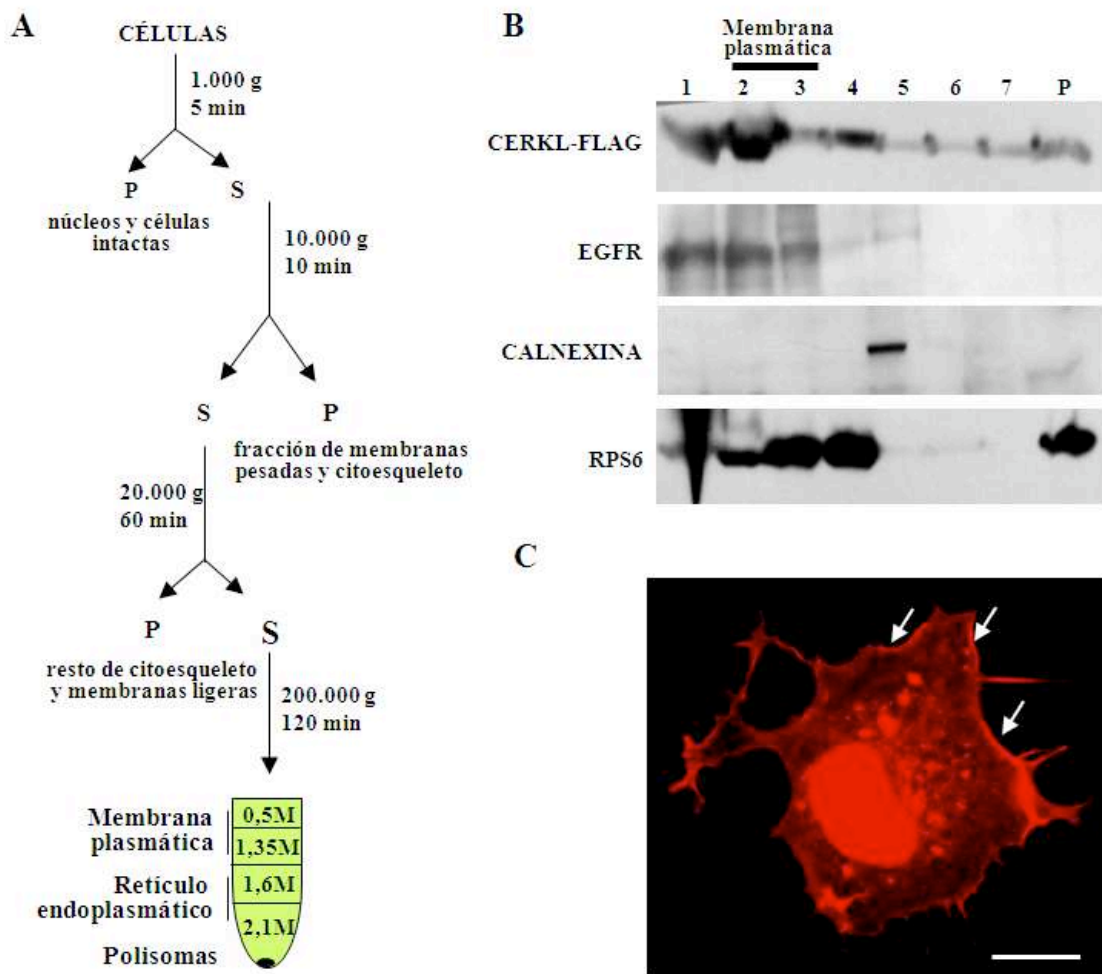


Figura 50. Localización de CERKL en la membrana plasmática. (A) Esquema del procedimiento empleado para el aislamiento de fracciones enriquecidas en membrana plasmática mediante un gradiente discontinuo de sacarosa. En cada paso del procedimiento, P indica el sedimento y S el sobrenadante. Se indican también las concentraciones de sacarosa empleadas en el gradiente (0,5/1,35/1,6 y 2,1 M). (B) Se transfectaron transitoriamente células HEK-293T con el plásmido CERKL WT-Flag y, tras 48 horas, las células se lisaron del mismo modo que el empleado en el aislamiento de polisomas (ver Metodología). Tras aplicar al lisado el procedimiento mostrado en la parte (A), se recogieron siete fracciones (1-7) y un sedimento, que se analizaron por Western blot utilizando anticuerpos específicos contra Flag, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, como marcador de membrana plasmática), calnexina (como marcador de retículo endoplasmático) y RPS6 (como marcador de mono- y polisomas). La fracción 2 corresponde a la más enriquecida en EGFR. (C) Se transfectaron transitoriamente las células COS-7 con el plásmido CERKL WT-HA y, tras 48 horas, se fijaron y se observaron mediante microscopía de fluorescencia utilizando el anticuerpo primario anti-HA y el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594 (rojo). Las flechas muestran la porción de CERKL localizada en la membrana plasmática. Barra: 10 μ m.

La secreción de proteínas a través de una membrana puede ocurrir tanto de forma post-traducciona como cotraducciona (Mitra *et al.*, 2006). En la secreción post-traducciona, las proteínas, una vez sintetizadas, se empaquetan en vesículas mediante transportadores localizados en las membranas lipídicas y se secretan. En la secreción

cotraduccional, el complejo ribonucleoproteico (mRNA unido a ribosomas) se ancla a la bicapa lipídica y la proteína atraviesa un canal específico de la membrana mientras se sintetiza (Figura 51), mediante un proceso muy conservado evolutivamente.

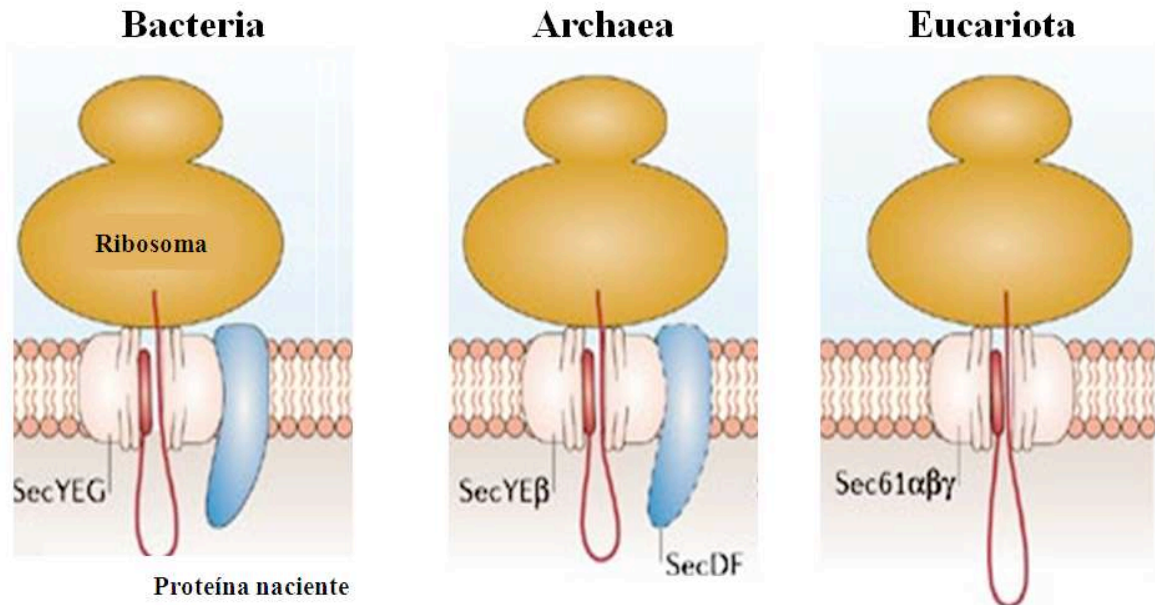


Figura 51 (adaptada de Albers *et al.*, 2006). **Mecanismo general de la secreción cotraduccional de proteínas.** Se muestra la traslocación cotraduccional a través de la correspondiente membrana de una proteína, tras la unión del aparato de traducción a canales proteicos de tipo Sec, ampliamente conservados evolutivamente y localizados en la correspondiente membrana de bacterias y Archaea y retículo endoplasmático en eucariotas.

En procariotas, dicho proceso comienza con la unión al péptido señal de la partícula de reconocimiento de señal (SRP, “signal recognition particle”), formada por un RNA no codificante y por varias proteínas unidas a él. De esta forma, se detiene la traducción de la proteína. Este complejo ribonucleoproteico se une entonces a un receptor situado en la membrana plasmática y se dirige hacia un canal transmembranal, llamado translocasa, al que se une. En ese momento, la partícula SRP se separa, reanudándose la traducción. El péptido señal interacciona con algunos residuos del poro de la translocasa, de forma que actúa como punto de anclaje, permitiendo de esta manera el paso de la proteína a través del poro de la translocasa mientras se traduce (Figura 52) (Albers *et al.*, 2006).

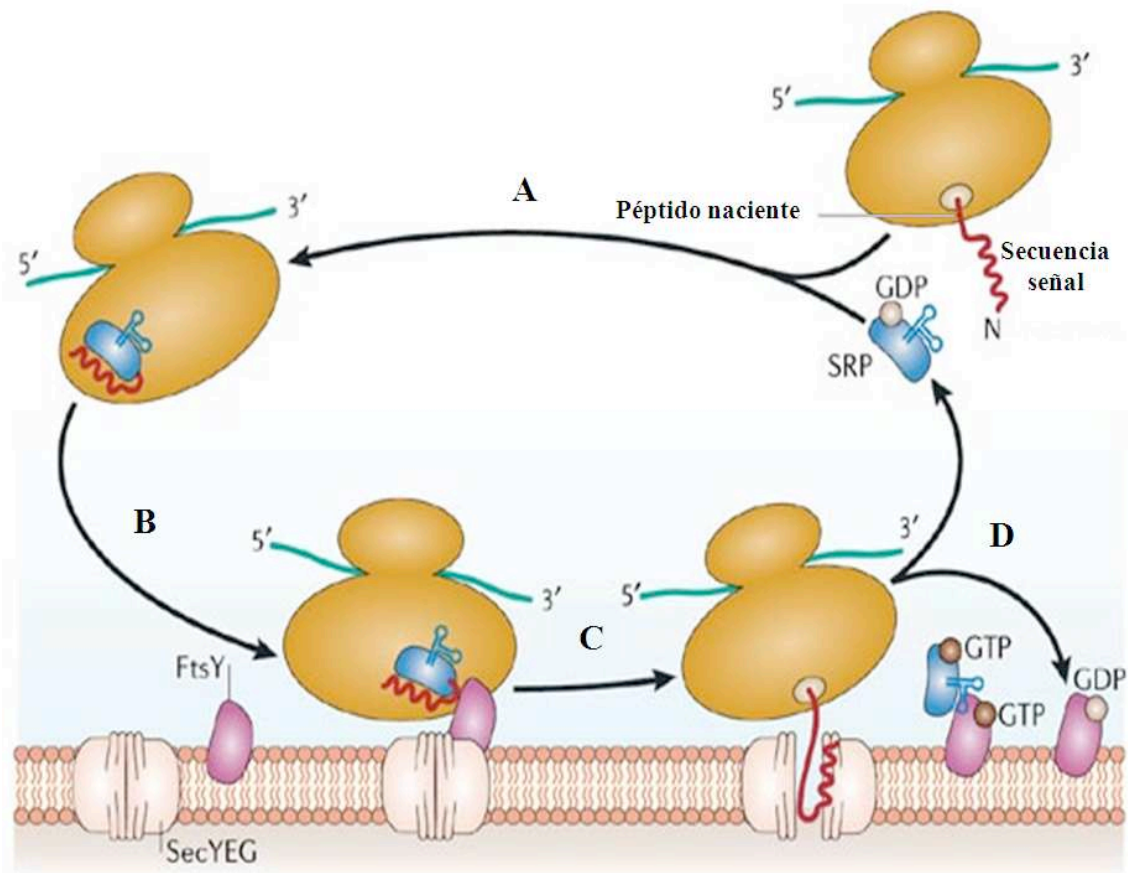


Figura 52. Secreción cotraduccional de proteínas en bacterias (adaptado de Albers *et al.*, 2006). La partícula de reconocimiento de señal (SRP) se une al péptido señal cuando está recién sintetizado y detiene la traducción (A). La partícula ribonucleoproteica conteniendo ese péptido se asocia a la membrana plasmática a través de la SRP, que a su vez se une al receptor FtsY situado en la membrana (B). El péptido, cuya traducción se ha detenido en la fase de elongación, se dirige entonces al canal de la translocasa intramembranal SecYEG (C). La SRP se separa mediante la hidrólisis de GTP, lo que permite continuar la traducción de la proteína y que la SRP inicie un nuevo ciclo de secreción cotraduccional (D).

En eucariotas, por su parte, este proceso ocurre de manera muy parecida a como hemos visto para bacterias, aunque con algunas diferencias. En particular, las partículas ribonucleoproteicas no se asocian aquí a la membrana plasmática sino a una membrana intracelular, la del retículo endoplasmático. Esto causa la presencia de ribosomas revistiendo el retículo endoplasmático, que se llama por eso rugoso, y el péptido que se está traduciendo penetra entonces a través de esa membrana al interior del retículo (Figura 53) (Cross *et al.*, 2009). Esta vía es la que siguen todas las proteínas luminarias o de membrana que en las células eucariotas se dirigen, no solamente al retículo endoplasmático, sino también, y mediante un transporte vesicular específico y bidireccional, al complejo de Golgi, a los lisosomas, a la membrana plasmática y a secreción, tanto de tipo constitutivo como regulado.

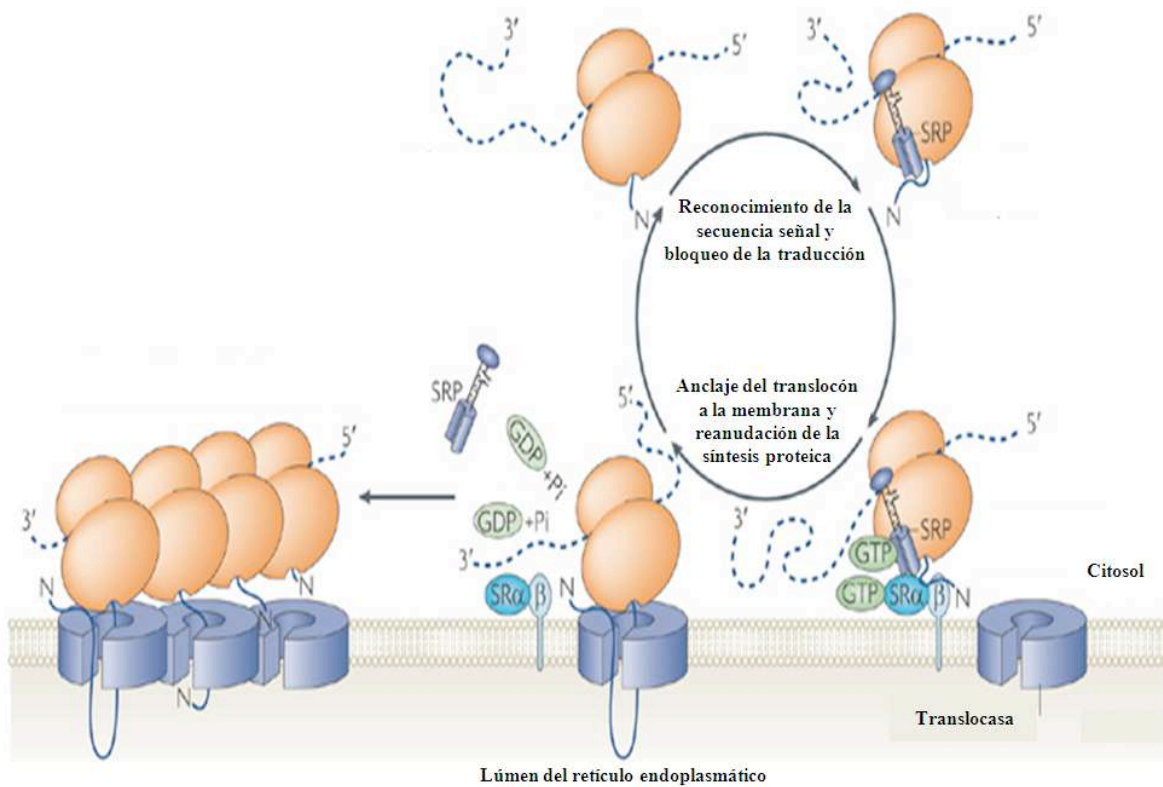


Figura 53 (adaptada de Cross *et al.*, 2009). Secreción cotraduccional de proteínas en eucariotas. El proceso es muy parecido al mostrado para bacterias. La partícula de reconocimiento de señal (SRP) se une al péptido señal que se encuentra en la porción N-terminal de la proteína y detiene la traducción. La partícula ribonucleoproteica se une a la membrana del retículo endoplasmático a través de la proteína SRP54, un componente de la SRP que se une de manera GTP-dependiente al receptor Sraβ (equivalente al FtsY en bacterias) situado en esa membrana de retículo. La hidrólisis del GTP causa un cambio conformacional que introduce el péptido señal en el canal de una translocasa situada en la membrana del retículo. Durante este proceso, el complejo SRP unido a su receptor se separa del ribosoma, lo que permite reanudar la traducción de la proteína. El proceso de traslocación puede ocurrir simultáneamente para cada ribosoma de un polisoma.

A diferencia de lo que ocurre en la secreción vía retículo endoplasmático-complejo de Golgi-membrana plasmática, la secreción a través de la membrana plasmática que vimos en bacterias no está bien documentada en eucariotas. Sin embargo, sí que existen estudios en los que se demuestra la asociación de la maquinaria de traducción a la membrana plasmática (Tcherkezian *et al.*, 2010) (Figura 54). Por ejemplo, la proteína integral de membrana DCC colocaliza con diferentes proteínas de la maquinaria de traducción, como eIF4E y RPS6, inhibiendo la síntesis proteica (Tcherkezian *et al.*, 2010) (ver también Figura 54A). Bajo señales específicas, DCC se une a su ligando, Netrina 1, lo que produce la liberación de los componentes de traducción, de forma que

puede llevarse a cabo la traducción de mRNAs específicos (Figura 54A) (Tcherkezian *et al.*, 2010). En otro estudio realizado en levadura, se ha demostrado también la asociación con la membrana plasmática de componentes de la maquinaria de traducción unidos a mRNAs. Esta asociación ocurre a través de proteínas adaptadoras como RACK1 y mediante la interacción con algunas proteínas integrales de la membrana plasmática, como las integrinas, para dirigir así la traducción de los mensajeros en esa localización (Figura 54B) (Nilsson *et al.*, 2004).

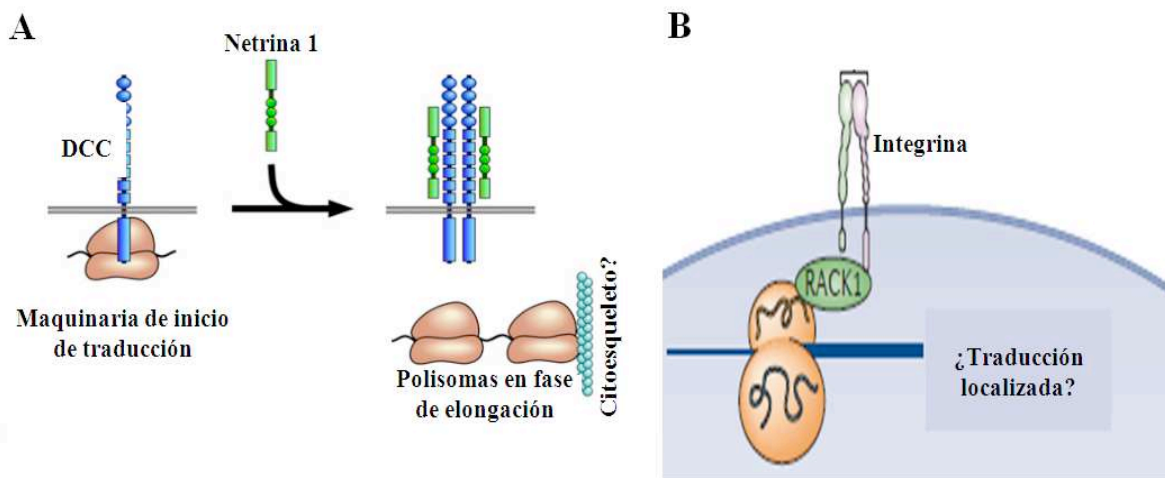


Figura 54 (adaptada de Tcherkezian *et al.*, 2010 (A) y Xue y Barna, 2012 (B)). **El proceso de la traducción en la membrana plasmática de células eucariotas.** (A) Interacción del receptor DCC con la maquinaria de traducción. La proteína transmembranal DCC se asocia con la maquinaria de inicio de la traducción, incluyendo las subunidades ribosomales 40S y 60S del ribosoma 80S y los factores eIFs, inhibiendo así la traducción del RNA mensajero. Tras la unión de la Netrina 1 al receptor DCC y a consecuencia del cambio conformacional producido en el mismo, la maquinaria de traducción se separa del receptor y comienza la fase de elongación de la traducción del mensajero. (B) Como se observa en la imagen, la maquinaria de traducción unida al mensajero se ancla a la membrana plasmática a través de proteínas adaptadoras, como RACK1, interaccionando también con proteínas de esa membrana como las integrinas para iniciar, probablemente, una traducción localizada.

Basándonos en los estudios anteriores, hemos considerado la posibilidad de que CERKL pudiera intervenir en la traducción localizada y en la secreción de los péptidos similares a la humanina a nivel de la membrana plasmática mediante un proceso similar al documentado en procariontes y que se ha propuesto también para eucariotas.

En el mismo fraccionamiento anterior se observa como CERKL se acumula en fracciones más ligeras (fracción 2), donde también se acumula el receptor EGFR,

marcador de la membrana plasmática (ver Figura 50B). Más aún, en el análisis proteómico en el que analizamos las proteínas que interactúan con CERKL, habíamos identificado varias proteínas de la membrana plasmática, como la desmogleína, la filagrina y la desmoplaquina (ver Tabla 5). Por tanto, para comprobar que realmente CERKL se encontraba también localizado en la membrana plasmática, llevamos a cabo una inmunofluorescencia en células COS-7 transfectadas con el plásmido CERKL WT-HA. Como se observa en la Figura 50C, efectivamente la proteína CERKL se encuentra en parte también localizada en la membrana plasmática.

Previamente habíamos mostrado que la proteína CERKL se encontraba localizada en partículas compactas, que se encontraban sobre todo en la fracción 2 (y también en la fracción 3, ver Figura 27A) de los gradientes de sacarosa, y que únicamente se solubilizaban al tratarlas con RNasa A a concentraciones salinas elevadas (ver Figuras 28 y 29). Pues bien, hemos comprobado ahora que estas fracciones corresponden también a zonas enriquecidas en membrana plasmática (ver Figura 50B). Para comprobar si CERKL se asociaba también con las proteínas implicadas en la traducción en esta localización y si estas partículas contenían los RNAs mensajeros de los péptidos similares a la humanina y el RNA no codificante RN7SL2, transfectamos células HEK-293T con CERKL-Flag y recogimos las fracciones que habíamos comprobado que estaban enriquecidas en membrana plasmática (fracción 2 y también la fracción 3). A partir de ellas inmunoprecipitamos Flag, tratándolas o no previamente con RNasa A en presencia de diferentes concentraciones salinas, tal y como se hizo en el apartado 7.3. Los resultados obtenidos muestran que CERKL también interactúa en estas fracciones con proteínas de la maquinaria de traducción en forma de partículas ribonucleoproteicas compactas, que sólo son sensibles al tratamiento con RNasa A cuando se realiza en presencia de concentraciones salinas elevadas (Figura 55A). Analizando los RNAs presentes en estas partículas, observamos un enriquecimiento tanto de los mensajeros de péptidos similares a la humanina L2, L6 y L8 (Figura 55B) como del RNA no codificante RN7SL2 (Figura 55C).

Resumiendo, sabemos que las partículas ribonucleoproteicas compactas de las que forman parte CERKL y los RNAs mensajeros que codifican los péptidos similares a la humanina se encuentran localizadas, en parte, a nivel de la membrana plasmática sin que previamente haya intervenido ninguna asociación con el retículo endoplasmático, por lo que la secreción de esos péptidos podría ser de tipo cotraduccional a nivel de la membrana plasmática.

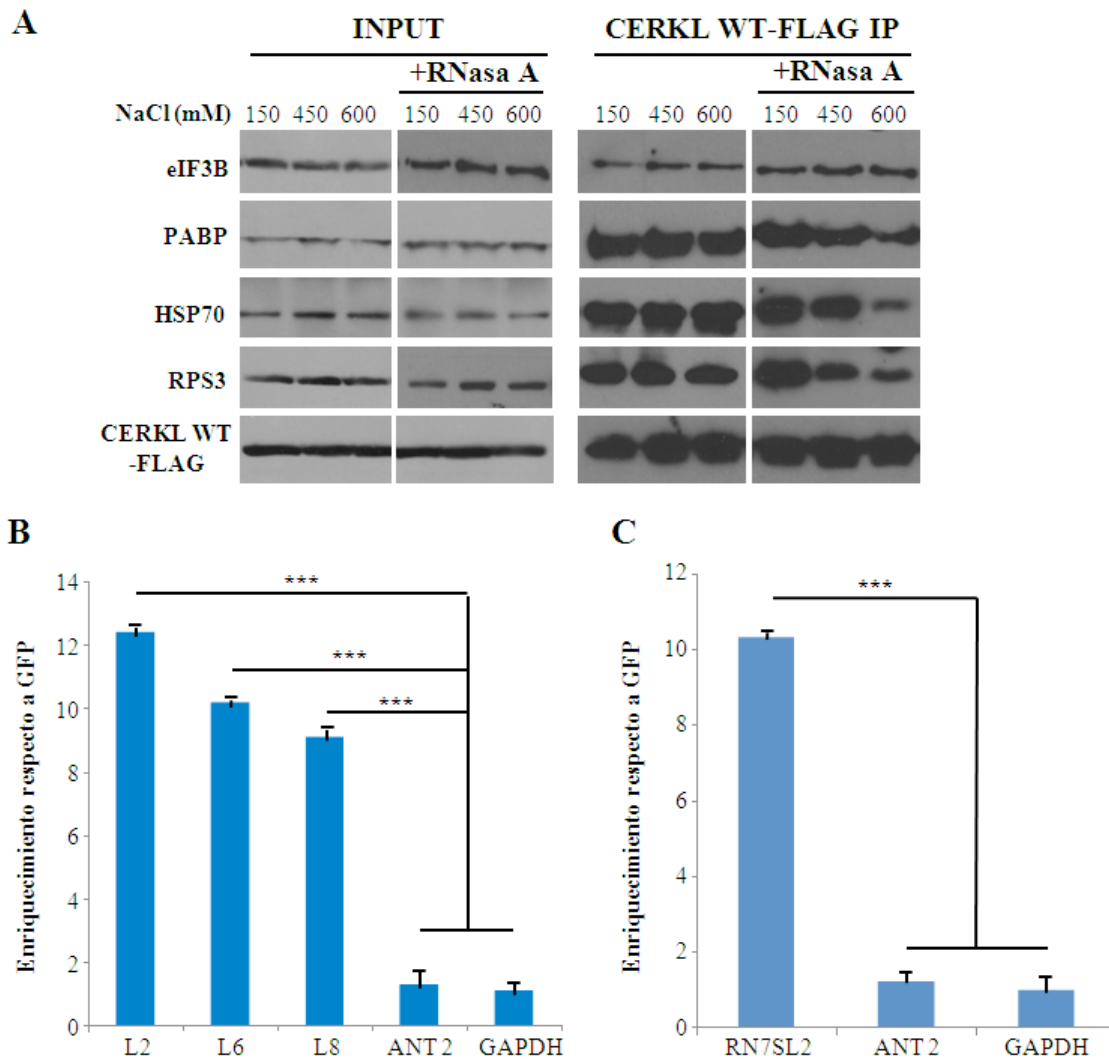


Figura 55. Los gránulos ribonucleoproteicos que están asociados con CERKL y que se encuentran unidos a la membrana plasmática contienen los transcritos de péptidos similares a la humanina y el RNA no codificante RN7SL2. (A) Se transfectaron transitoriamente células HEK-293T con los plásmidos CERKL WT-Flag (CERKL WT) y, como control, Flag-GFP (GFP). Se aislaron fracciones enriquecidas en membrana plasmática mediante un gradiente discontinuo de sacarosa (ver Metodología y Figura 50A). Estas fracciones se trataron o no con RNasa A (100 μ g/mL) en presencia de tres concentraciones diferentes de NaCl (150, 450 y 600 mM, como se indica en la figura). Los lisados se inmunoprecipitaron con resina anti-Flag M2 y lisados (INPUT) e inmunoprecipitados (CERKL WT-FLAG IP) se analizaron por Western blot, utilizando anticuerpos que reconocen las siguientes proteínas: eIF3B, PABP, HSP70, RPS3 y Flag (para detectar CERKL-WT). (B y C) A partir de los inmunoprecipitados de las fracciones 2 y 3 se purificó el RNA, cuya concentración se determinó en un Nanodrop. Utilizando en cada caso 5 ng de RNA como molde, se evaluaron los niveles de los diferentes transcritos por PCR-cuantitativa, empleando cebadores específicos para MTRNR2L2, L6 y L8 (L2, L6, L8) (B), para RN7SL2 (C) y, como controles, para la GAPDH y la ADP/ATP translocasa 2 (ANT 2). El eje vertical presenta el enriquecimiento de los niveles de cada transcrito respecto a los de GFP. Se muestra también la significación estadística (***) $p < 0,005$ respecto a los valores control (ANT2 y GAPDH).

Anteriormente demostramos que estas partículas se asocian también a los microtúbulos (Figuras 38 y 39) y pueden encontrarse en regiones distales en células polarizadas

(Figuras 40 y 41). Por tanto, para determinar ahora si el transporte de las mismas hasta la membrana depende de los microtúbulos, tratamos las células COS-7 que expresan CERKL WT con colchicina y estudiamos la localización de esta proteína mediante inmunofluorescencia. Como se observa en la Figura 56, la proteína CERKL pierde claramente su localización en la membrana plasmática tras el tratamiento con colchicina y se queda acumulada en una región perinuclear. Esto parece indicar que la proteína CERKL una vez fuera del núcleo se uniría a los microtúbulos para viajar a través de ellos, junto con los RNAs y proteínas que la acompañan, hasta la membrana plasmática. En cambio, cuando estas estructuras se encuentran desorganizadas, la proteína se queda acumulada en el punto de partida.

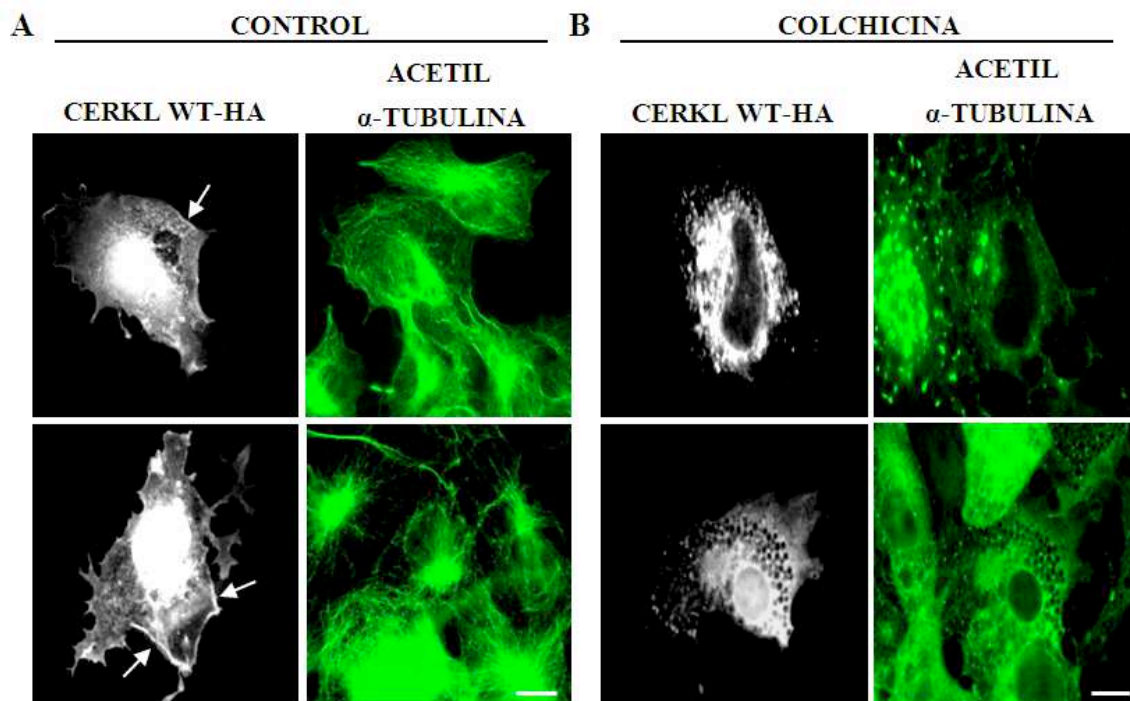


Figura 56. La localización de CERKL en la membrana plasmática depende de la integridad de los microtúbulos. Se transfectaron transitoriamente células COS-7 con el plásmido CERKL WT-HA y, tras 48 horas, las células se trataron (**B**) o no (**A**) con colchicina (1 μ g/ml) durante 2 horas. Después, las células se fijaron y se incubaron con los anticuerpos anti-HA y anti-acetil- α -tubulina, seguidos de los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 594 (blanco) o 488 (verde). Las flechas muestran la localización de CERKL en la membrana plasmática. Todas las barras: 10 μ m.

Como se explicó anteriormente, CERKL contiene un dominio PH, que no parece ser responsable de su unión al citoesqueleto ya que los dos mutantes puntuales de este dominio que estudiamos mantenían su unión al mismo de igual forma a como lo hace la proteína WT (Figura 37C). Puesto que otra de las funciones descritas para este dominio

es la unión a lípidos, comprobamos a continuación si los mutantes del dominio PH presentaban alguna alteración en su unión a lípidos, ya que esta posible alteración podría afectar a su localización en la membrana plasmática. Para ello, transfectamos células COS-7 con los plásmidos CERKL WT-HA, CERKL C125W-HA y CERKL W151A-HA y analizamos la localización de CERKL mediante inmunofluorescencia. Como puede verse en la Figura 57A, los mutantes de CERKL C125W y W151A han perdido la localización de CERKL en la membrana plasmática. Por lo tanto, la proteína CERKL se une a la membrana plasmática, probablemente a lípidos de la misma a través de su dominio PH. Esto se pone de manifiesto también en el análisis por Western blot de la fracción enriquecida en membrana plasmática (Figura 57B), en el que se detecta una notable reducción en las bandas de los mutantes de CERKL anteriores (sobre todo en el caso del W151A).

Teniendo en cuenta todos estos resultados, postulamos que las partículas compactas que contienen CERKL y los mensajeros que codifican péptidos similares a la humanina viajan por los microtúbulos hasta la membrana plasmática donde intervendrían en la traducción de los mRNAs y en la secreción de los péptidos. Esta hipótesis la validamos cuantificando la cantidad de estos mensajeros en la membrana plasmática en células transfectadas con la proteína CERKL WT o con los mutantes del dominio PH. Para ello, transfectamos células HEK-293T con los plásmidos CERKL WT-HA, CERKL C125W-HA y CERKL W151A-HA, dejando como control las células sin transfectar. Después, separamos los lisados en un gradiente discontinuo de sacarosa, recogimos una fracción enriquecida en membrana plasmática (concretamente, la fracción 2 que ya hemos mencionado con anterioridad), purificamos el RNA total de esta fracción y, mediante transcriptasa reversa y PCR cuantitativa, comprobamos la cantidad de RNAs mensajeros de los péptidos similares a la humanina L2, L6, L8 en esa fracción. En las células transfectadas con CERKL WT observamos una cantidad mucho más elevada de los RNAs mensajeros que codifican los péptidos similares a la humanina L2, L6 y L8 en comparación con los dos mutantes puntuales y el control, donde estas cantidades son muy reducidas e incluso inexistentes. Estas diferencias no ocurren con el RNA mensajero de GAPDH que se utilizó como control (Figura 57C). En conjunto, estos resultados confirman la unión a la membrana plasmática de las partículas ribonucleoproteicas, que contienen a CERKL WT, los RNAs mensajeros de los péptidos similares a la humanina, el RNA no codificante RN7SL2 y proteínas de la maquinaria de traducción, y la relevancia de alteraciones en esa unión para la retinosis pigmentaria.

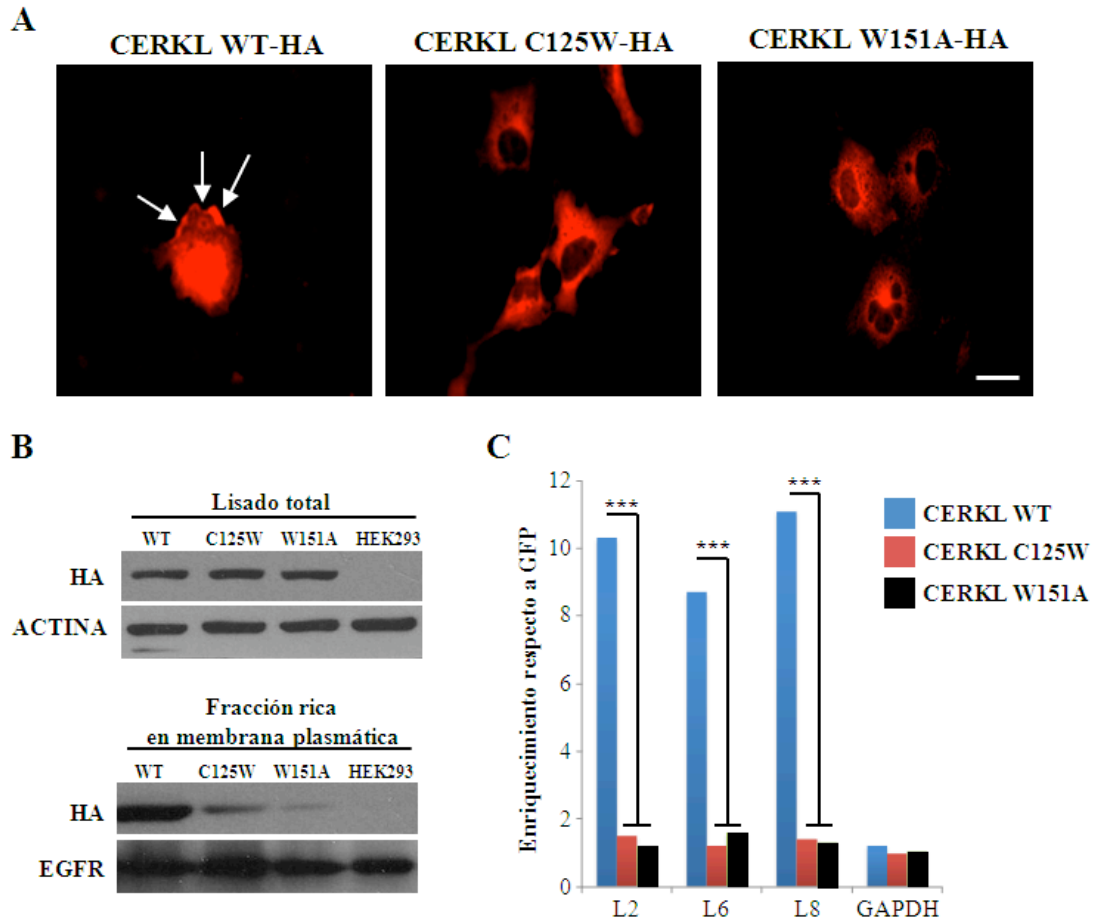


Figura 57. Los mutantes en el dominio homólogo a plekstrina (PH) de CERKL no se unen a la membrana plasmática y, por tanto, son incapaces de unir a ella a los mensajeros de los péptidos similares a la humanina. (A) Se transfectoron transitoriamente células COS-7 con los plásmidos CERKL WT-HA, CERKL C125W-HA y CERKL W151A-HA y, tras 48 horas, se fijaron y se incubaron con el anticuerpo anti-HA seguido del correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594 (rojo). Las flechas muestran la localización de CERKL WT en la membrana plasmática. Barra: 10 μ m. **(B)** Se transfectoron transitoriamente células HEK-293T con los plásmidos de arriba y se emplearon células sin transfectar como control. Cuarenta y ocho horas después de las transfecciones, las células se lisaron y se obtuvieron, mediante un gradiente discontinuo de sacarosa (ver Metodología), fracciones enriquecidas en membrana plasmática que, junto con el lisado total, se analizaron por Western blot utilizando anticuerpos que reconocen HA, EGFR o actina. **(C)** A partir de las fracciones obtenidas en el apartado **(B)** se purificó el RNA. Empleando 5 ng de RNA y utilizando sondas específicas, se comprobó, mediante PCR cuantitativa, la presencia de mensajeros que codifican a los péptidos similares a la humanina L2, L6 y L8. Se muestra también la significación estadística (***) de los valores de CERKL WT respecto a los de los dos mutantes.

10. Resumen final de los resultados obtenidos en esta tesis

A continuación, resumiremos los principales resultados que se han descrito hasta aquí:

La proteína CERKL se encuentra localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma. En el citoplasma, CERKL se distribuye de manera difusa y también formando unos agregados que en su mayor parte se distribuyen en la periferia nuclear. Esos agregados

colocalizan con marcadores de gránulos de estrés y su cantidad aumenta sometiendo las células a estrés (arsenito de sodio o choque térmico) y disminuye tras un tratamiento con cicloheximida (un inhibidor de la síntesis de proteínas que desensambla los gránulos de estrés).

La entrada y salida de CERKL del núcleo es necesaria para su localización en los gránulos de estrés y, por eso, el mutante patológico C125W que está ausente de los núcleos no colocaliza con los marcadores de gránulos de estrés. CERKL se acumula en el núcleo y su presencia en los gránulos de estrés disminuye considerablemente cuando se tratan las células con leptomicina B (un inhibidor de la salida de proteínas del núcleo) o con actinomicina D y α -amanitina (inhibidores de la transcripción).

CERKL colocaliza también con otros componentes celulares conteniendo ribonucleoproteínas, como son los cuerpos P, los polisomas y unas partículas ribonucleoproteicas compactas. La asociación de CERKL en los polisomas se pierde cuando se tratan con EDTA y RNasa A que los desensamblan, mientras que en las partículas ribonucleoproteicas compactas eso solo ocurre cuando los tratamientos anteriores se realizan a concentraciones salinas elevadas que reducen su compactación.

CERKL interacciona con: i) proteínas de la maquinaria de traducción de los RNAs mensajeros, como son eIF3B, PABP o RPS3, ii) chaperonas que intervienen en el plegamiento de las proteínas recién sintetizadas, como son HSP70 o HSP90, iii) las tubulinas α y β de los microtúbulos, y iv) proteínas de la membrana plasmática, como son la filagrina, la desmoplaquina y la desmogleína. Además, CERKL interacciona con proteínas que intervienen en el metabolismo del DNA o del RNA, como la nucleofosmina, en el transporte al núcleo, como la importina 4, y en la unión a lípidos, como la apolipoproteína D.

La interacción de CERKL con PABP, RPS3 y HSP70, pero no con eIF3B, se pierde tras un tratamiento con RNasa A en presencia de concentraciones salinas elevadas. Estos resultados son consistentes con que la mayoría de esas interacciones ocurren en partículas ribonucleoproteicas compactas y que la interacción de CERKL con PABP, RPS3 y HSP70 depende de la integridad de los RNAs mensajeros, mientras que la interacción con eIF3B podría ocurrir directamente.

El mutante patológico C125W de CERKL es incapaz de interactuar con la proteína eIF3B y sus interacciones con PABP, HSP70 y RPS3 no se pierden tras un tratamiento con RNasa A. Esto sugiere que este mutante presenta anomalías en la formación de las partículas ribonucleoproteicas compactas, probablemente debido a su incapacidad de unirse eficazmente a los RNAs mensajeros.

CERKL interactúa con componentes del complejo 48S de preinicio de la traducción, tales como las proteínas eIF3B, eIF3G y eIF3I, con proteínas ribosomales de la subunidad 40S, como las RPS3, RPS5 y RPSA y con factores no proteicos, como el residuo 7-metil-guanosina del extremo 5' del RNA mensajero.

CERKL se asocia también a los microtúbulos, incluyendo estructuras de las que estos forman parte, como los centrosomas y el huso mitótico. La unión de CERKL a los microtúbulos no depende del dominio PH (“pleckstrin homology”) de CERKL, ya que los mutantes puntuales de ese dominio se unen a los microtúbulos con igual eficacia que la proteína WT.

En los microtúbulos, CERKL tiene una apariencia particulada e interactúa con proteínas de la maquinaria de traducción, como eIF3B, PABP y RPS3, y con chaperonas, como la HSP70, formando partículas ribonucleoproteicas compactas. Excepto en el caso de eIF3B, esta interacción depende de la integridad de los RNAs mensajeros. Estos y otros datos avalan que CERKL se une a los RNAs mensajeros en el núcleo y los acompaña al citoplasma, donde interactúa con proteínas de la maquinaria de traducción y con chaperonas para formar las partículas ribonucleoproteicas compactas que, después, se unirán a los microtúbulos.

En células neuronales diferenciadas, CERKL, pero no el mutante patológico C125W de CERKL, se localiza en las prolongaciones axoniformes, donde hay un transporte activo a través de microtúbulos, formando estructuras particuladas en las que interactúa con RNAs y con proteínas de la maquinaria de traducción de proteínas.

Las partículas ribonucleoproteicas compactas asociadas con CERKL contienen RNAs, especialmente los mensajeros que codifican para los péptidos similares a la humanina de clase 2, 6 y 8 y también RNAs no codificantes, como sobre todo el RN7SK que

interviene en el “splicing” y el RN7SL2 que interviene en la secreción cotraduccional de proteínas. El mutante patológico C125W de CERKL es incapaz de unirse a los RNAs mensajeros que codifican para los péptidos similares a la humanina de clase 2, 6 y 8.

Las partículas ribonucleoproteicas compactas unidas a los microtúbulos contienen, junto a CERKL, a los RNAs mensajeros de los péptidos parecidos a la humanina de clase 2, 6 y 8.

Además de las localizaciones mencionadas anteriormente, CERKL se asocia también con la membrana plasmática. Puesto que CERKL no se encuentra localizado ni en el retículo endoplasmático y ni en el complejo de Golgi, esa asociación no ocurre a través de la ruta secretora convencional. En cambio, la integridad de los microtúbulos es crucial para esta asociación, ya que su desensamblaje causa la acumulación de CERKL en la periferia nuclear (el punto de partida, tras la salida del núcleo, de la ruta de transporte) y no se detecta asociación con la membrana plasmática (el destino final).

En la membrana plasmática, CERKL interacciona con proteínas de la maquinaria de traducción, como eIF3B, PABP y RPS3, con chaperonas, como la HSP70, con los RNAs mensajeros de los péptidos parecidos a humanina de clase 2, 6 y 8 y con el RNA no codificante RN7SL2. La interacción con las proteínas (excepto en el caso de eIF3B) depende de la integridad de los RNAs.

Los mutantes del dominio PH de CERKL (C125W y W151A) no se encuentran localizados en la membrana plasmática y, cuando se expresan en células, disminuye la cantidad de los RNAs mensajeros de los péptidos parecidos a humanina de clase 2, 6 y 8 unidos a la membrana plasmática. Por lo tanto, se puede concluir que CERKL es importante para la localización de dichos mensajeros en la membrana plasmática.

11. Funciones de la proteína CERKL

En base a todos los datos presentados, podemos postular que CERKL, una vez en el núcleo, se une a los RNAs mensajeros de los péptidos parecidos a humanina de clase 2, 6 y 8 y, junto con ellos, sale de él. Una vez en el citoplasma, se le unen otras proteínas y RNAs como son proteínas de la maquinaria de traducción y chaperonas y el RNA no codificante RN7SL2. Esos componentes pueden localizarse en polisomas y, en

condiciones de estrés, en gránulos de estrés y cuerpos P, pero sobre todo se encuentran formando partículas ribonucleoproteicas compactas. Estas, una vez formadas, viajan a través de microtúbulos hasta la membrana plasmática, donde se anclan, debido a la capacidad de unión a los lípidos de CERKL, para permitir probablemente la síntesis y secreción cotraduccional de los péptidos parecidos a la humanina 2, 6 y 8. En la retina, este proceso podría promover la supervivencia de las células fotorreceptoras, al mantener en la matriz extracelular una cantidad adecuada de esos péptidos para unirse a sus receptores en la membrana plasmática e inhibir la apoptosis. La interpretación de todos estos resultados se representa en el esquema resumido de la Figura 58.

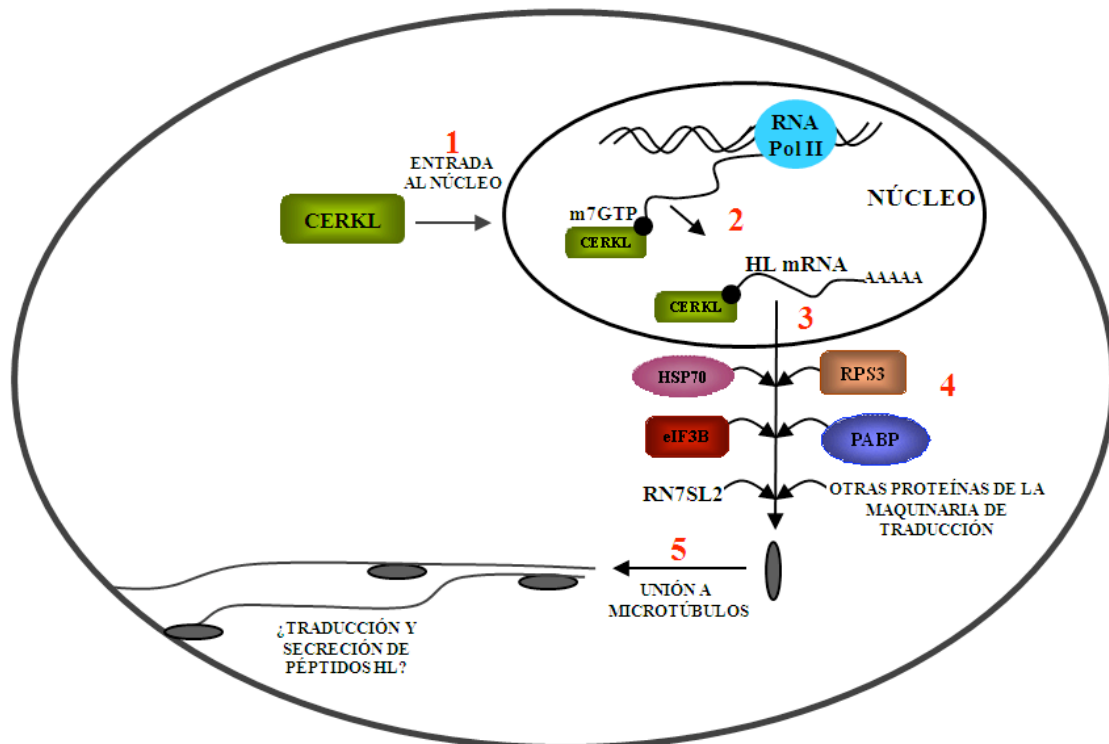


Figura 58. Hipótesis sobre la función de la proteína CERKL. Una vez sintetizada en el citoplasma, CERKL entra en el núcleo (paso 1), donde se une (paso 2) al extremo 5' de los mRNAs que codifican péptidos similares a la humanina (L2, L6 y L8) y los acompaña al citoplasma (paso 3). En el citoplasma, la proteína CERKL, unida a esos mRNAs y a otras proteínas, forma partículas ribonucleoproteicas compactas (paso 4), al unirse por ejemplo al RNA no codificante RN7SL2 y a proteínas involucradas en la traducción y en el plegamiento de proteínas (por ejemplo eIF3B, PABP, HSP70 y RPS3). Las partículas ribonucleoproteicas compactas se unen a los microtúbulos (paso 5) y viajan hasta la membrana plasmática, donde probablemente intervienen en la traducción de los mensajeros de los péptidos similares a la humanina y/o en la secreción de dichos péptidos a la matriz extracelular.

Ahora, y en base a esa interpretación cabe preguntar: ¿cuál es el significado biológico de estos resultados y cuál es su relevancia para la patología? Trataremos de responder muy brevemente a esta cuestión. En la retina, CERKL se encuentra mayoritariamente en conos, en células ganglionares y en células bipolares. Las mutaciones en CERKL que causan retinosis pigmentaria producen, en primer lugar, la muerte de los bastones, donde no se observa la expresión de CERKL. Basándonos en los resultados obtenidos proponemos que CERKL participa sobre todo en la síntesis localizada y en la secreción a través de la membrana de péptidos similares a la humanina en las células retinales donde se expresa. Dichos péptidos actuarían como factores de supervivencia para el resto de células retinales, como por ejemplo los bastones. Por lo tanto, la administración de dichos péptidos podría tal vez utilizarse como una terapia para el tratamiento de la retinosis pigmentaria.

CONCLUSIONES FINALES

CONCLUSIONES FINALES

Las principales conclusiones de esta tesis son:

- 1- CERKL es una proteína de unión a RNAs mensajeros, que se encuentra localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma. En el citoplasma, la proteína CERKL se encuentra asociada a varios compartimentos que contienen RNAs mensajeros y proteínas de unión a ellos, tales como los gránulos de estrés, los cuerpos P, los polisomas y unas partículas ribonucleoproteicas compactas.
- 2- En las partículas ribonucleoproteicas compactas, la proteína CERKL está mayoritariamente unida a los RNAs mensajeros que codifican para los péptidos similares a la humanina de clase 2, 6 y 8 y al RNA no codificante RN7SL2. En esas partículas, también interacciona con proteínas que intervienen en la traducción y plegamiento de proteínas, como son eIF3B, PABP, RPS3 y HSP70.
- 3- Las partículas ribonucleoproteicas compactas que contienen CERKL se asocian a los microtúbulos y se encuentran también localizadas en la membrana plasmática, hacia donde viajan a través de los microtúbulos. En la membrana plasmática CERKL intervendrá probablemente en la traducción y/o secreción al espacio extracelular de los péptidos similares a la humanina.
- 4- El mutante patológico CERKL C125W no se encuentra localizado en el núcleo, gránulos de estrés o membrana plasmática, no interacciona con la proteína eIF3B y no se une a los mRNAs de los péptidos similares a la humanina o al RNA no codificante RN7SL2, por lo que no forma partículas ribonucleoproteicas compactas. Esto apoya la importancia de esas localizaciones y asociaciones para el correcto funcionamiento de la proteína y la relevancia de sus alteraciones para desarrollar la retinosis pigmentaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Adijanto, J., Banzon, T., Jalickee, S., Wang, N.S. y Miller, S.S. (2009) CO₂-induced ion and fluid transport in human retinal pigment epithelium. *J Gen Physiol* *133*, 603-622.
- Agholme, L., Lindstrom, T., Kagedal, K., Marcusson, J. y Hallbeck, M. (2010) An *in vitro* model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J Alzheimers Dis* *20*, 1069-1082.
- Aitken, C.E. y Lorsch, J.R. (2012) A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol* *19*, 568-576.
- Albers, S.V., Szabo, Z. y Driessen, A.J. (2006) Protein secretion in the Archaea: multiple paths towards a unique cell surface. *Nat Rev Microbiol* *4*, 537-547.
- Alemán, T.S., Soumitra, N., Cideciyan, A.V., Sumaroka, A.M., Ramprasad, V.L., Herrera, W., Windsor, E.A., Schwartz, S.B., Russell, R.C., Román, A.J., *et al.* (2009) CERKL mutations cause an autosomal recessive cone-rod dystrophy with inner retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *50*, 5944-5954.
- Ali, M., Ramprasad, V.L., Soumitra, N., Mohamed, M.D., Jafri, H., Rashid, Y., Danciger, M., McKibbin, M., Kumaramanickavel, G. y Inglehearn, C.F. (2008) A missense mutation in the nuclear localization signal sequence of CERKL (p.R106S) causes autosomal recessive retinal degeneration. *Mol Vis* *14*, 1960-1964.
- Anderson, P. y Kedersha, N. (2002) Stressful initiations. *J Cell Sci* *115*, 3227-3234.
- Arhzaouy, K. y Ramezani-Rad, M. (2012) Nuclear import of UBL-domain protein Mdy2 is required for heat-induced stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* *7*, e52956.
- Auslender, N., Sharon, D., Abbasi, A.H., Garzozzi, H.J., Banin, E. y Ben-Yosef, T. (2007) A common founder mutation of CERKL underlies autosomal recessive retinal degeneration with early macular involvement among Yemenite Jews. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *48*, 5431-5438.
- Bagni, C. y Greenough, W.T. (2005) From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci* *6*, 376-387.
- Bazan, N.G. (2009) Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* *81*, 205-211.
- Beckham, C.J. y Parker, R. (2008) P bodies, stress granules, and viral life cycles. *Cell Host Microbe* *3*, 206-212.
- Birch, D.G., Weleber, R.G., Duncan, J.L., Jaffe, G.J. y Tao, W. (2013) Randomized trial of ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* *156*, 283-292.e1.

Bodzioch, M., Lapicka-Bodzioch, K., Zapala, B., Kamysz, W., Kiec-Wilk, B. y Dembinska-Kiec, A. (2009) Evidence for potential functionality of nuclearly-encoded humanin isoforms. *Genomics* 94, 247-256.

Bor, Y.C., Swartz, J., Li, Y., Coyle, J., Rekosh, D. y Hammarskjold, M.L. (2006) Northern Blot analysis of mRNA from mammalian polyribosomes. Protocol Exchange. www.nature.com/protocolexchange/protocols/67.

Bornancin, F., Mechtcheriakova, D., Stora, S., Graf, C., Wlachos, A., Devay, P., Urtz, N., Baumruker, T. y Billich, A. (2005) Characterization of a ceramide kinase-like protein. *Biochim Biophys Acta* 1687, 31-43.

Brasaemle, D.L., Barber, T., Wolins, N.E., Serrero, G., Blanchette-Mackie, E.J. y Londos, C. (1997) Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res* 38, 2249-2263.

Buchan, J.R. y Parker, R. (2009) Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell* 36, 932-941.

Casiday, R. y Frey, R. (2000) "I have seen the Light!" Vision and light-induced molecular changes. www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials/Vision/Vision.html.

Cross, B.C., Sinning, I., Luirink, J. y High, S. (2009) Delivering proteins for export from the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 255-264.

Curcio, C.A. y Hendrickson, A.E. (1991) Organization and development of the primate photoreceptor mosaic. *Progress in Retinal Research* 10, 89-120.

Daiger, S.P., Bowne, S.J. y Sullivan, L.S. (2007) Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 125, 151-158.

de Vries, S.E., Baccus, S.A. y Meister, M. (2011) The projective field of a retinal amacrine cell. *J Neurosci* 31, 8595-8604.

Donaldson, J.G. y Jackson, C.L. (2011) ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 362-375.

Dulbecco, R. y Freeman, G. (1959) Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8, 396-397.

Esposito, A.M., Mateyak, M., He, D., Lewis, M., Sasikumar, A.N., Hutton, J., Copeland, P.R. y Kinzy, T.G. (2010) Eukaryotic polyribosome profile analysis. *J Vis Exp* 40, 1948.

Fariss, R. y Milam, A. (2009) Damaged Rods and Cones (National Eye Institute, ed.).

Fathinajafabadi, A., Pérez-Jiménez, E., Riera, M., Knecht, E. y González-Duarte, R. (2014) *CERKL*, a retinal disease gene, encodes an mRNA-binding protein that localizes in compact and untranslated mRNPs associated with microtubules. *PLoS One* 9,

e87898.

Fitzgerald, J.B., Malykhina, A.P., Al-Ubaidi, M.R. y Ding, X.Q. (2008) Functional expression of cone cyclic nucleotide-gated channel in cone photoreceptor-derived 661W cells. *Adv Exp Med Biol* 613, 327-334.

Francis, P.J. (2006) Genetics of inherited retinal disease. *J R Soc Med* 99, 189-191.

Garanto, A., Vicente-Tejedor, J., Riera, M., de la Villa, P., González-Duarte, R., Blanco, R. y Marfany, G. (2012) Targeted knockdown of *Cerkl*, a retinal dystrophy gene, causes mild affectation of the retinal ganglion cell layer. *Biochim Biophys Acta* 1822, 1258-1269.

Garin, M. (2014) Retinitis pigmentosa. www.eyehalthweb.com/retinitis-pigmentosa.

Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L.M. y Anderson, P. (2004) Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell* 15, 5383-5398.

Graf, C., Niwa, S., Muller, M., Kinzel, B. y Bornancin, F. (2008) Wild-type levels of ceramide and ceramide-1-phosphate in the retina of ceramide kinase-like-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 373, 159-163.

Grousl, T., Ivanov, P., Frydlova, I., Vasicova, P., Janda, F., Vojtova, J., Malinska, K., Malcova, I., Novakova, L., Janoskova, D., *et al.* (2009) Robust heat shock induces eIF2 α -phosphorylation-independent assembly of stress granules containing eIF3 and 40S ribosomal subunits in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 122, 2078-2088.

Guo, B., Zhai, D., Cabezas, E., Welsh, K., Nouraini, S., Satterthwait, A.C. y Reed, J.C. (2003) Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature* 423, 456-461.

Hamel, C.P. (2007) Cone rod dystrophies. *Orphanet J Rare Dis* 2, 7.

Han, Z., Conley, S.M. y Naash, M.I. (2014) Gene therapy for Stargardt disease associated with *ABCA4* gene. *Adv Exp Med Biol* 801, 719-724.

Hartmann, P. y Schmid, M.G. (2007) Layers and cell types of the mammalian retina. Wikimedia Commons. www.commons.wikimedia.org/wiki/File:Retina_layers.svg.

Hartong, D.T., Berson, E.L. y Dryja, T.P. (2006) Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368, 1795-1809.

Hashimoto, Y., Niikura, T., Tajima, H., Yasukawa, T., Sudo, H., Ito, Y., Kita, Y., Kawasumi, M., Kouyama, K., Doyu, M., *et al.* (2001a) A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and A β . *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6336-6341.

Hashimoto, Y., Niikura, T., Tajima, H., Yasukawa, T., Sudo, H., Ito, Y., Kita, Y., Kawasumi, M., Kouyama, K., Doyu, M., *et al.* (2001b) Correction to: A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 12854.

Hashimoto, Y., Kurita, M., Aiso, S., Nishimoto, I. y Matsuoka, M. (2009) Humanin inhibits neuronal cell death by interacting with a cytokine receptor complex or complexes involving CNTF receptor alpha/WSX-1/gp130. *Mol Biol Cell* *20*, 2864-2873.

Ikonen, M., Liu, B., Hashimoto, Y., Ma, L., Lee, K.W., Niikura, T., Nishimoto, I. y Cohen, P. (2003) Interaction between the Alzheimer's survival peptide humanin and insulin-like growth factor-binding protein 3 regulates cell survival and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 13042-13047.

Inagaki, Y., Mitsutake, S. y Igarashi, Y. (2006) Identification of a nuclear localization signal in the retinitis pigmentosa-mutated RP26 protein, ceramide kinase-like protein. *Biochem Biophys Res Commun* *343*, 982-987.

Jaissle, G.B., May, C.A., van de Pavert, S.A., Wenzel, A., Claes-May, E., Giessl, A., Szurman, P., Wolfrum, U., Wijnholds, J., Fischer, M.D., *et al.* (2010) Bone spicule pigment formation in retinitis pigmentosa: insights from a mouse model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* *248*, 1063-1070.

Jansen, R.P. (2001) mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 247-256.

Jordan, M., Schallhorn, A. y Wurm, F.M. (1996) Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res* *24*, 596-601.

Jung, H., Yoon, B.C. y Holt, C.E. (2012) Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat Rev Neurosci* *13*, 308-324.

Kedersha, N. y Anderson, P. (2007) Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol* *431*, 61-81.

Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E. y Anderson, P. (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* *169*, 871-884.

Kedersha, N. y Anderson, P. (2009) Regulation of translation by stress granules and processing bodies. *Prog Mol Biol Transl Sci* *90*, 155-185.

Khan, A.O. y Abu-Safieh, L. (2014) Rod-cone dystrophy with initially preserved visual acuity despite early macular involvement suggests recessive *CERKL* mutations. *Ophthalmic Genet*, Feb 19 Epub ahead of print.

- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R. y Salzberg, S.L. (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* 14, R36.
- Kimball, S.R., Horetsky, R.L., Ron, D., Jefferson, L.S. y Harding, H.P. (2003) Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C273-284.
- Knecht, E., Aguado, C., Cárcel, J., Esteban, I., Esteve, J.M., Ghislat, G., Moruno, J.F., Vidal, J.M. y Sáez, R. (2009) Intracellular protein degradation in mammalian cells: recent developments. *Cell Mol Life Sci* 66, 2427-2443.
- Koenekoop, R.K. (2004) An overview of Leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development. *Surv Ophthalmol* 49, 379-398.
- Kolb H., Fernández E. y Nelson R., eds. (1995) *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* (Salt Lake City, University of Utah Health Sciences Center).
- Komeima, K., Rogers, B.S., Lu, L. y Campochiaro, P.A. (2006) Antioxidants reduce cone cell death in a model of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11300-11305.
- Komeima, K., Rogers, B.S. y Campochiaro, P.A. (2007) Antioxidants slow photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *J Cell Physiol* 213, 809-815.
- Lachke, S.A., Alkuraya, F.S., Kneeland, S.C., Ohn, T., Aboukhalil, A., Howell, G.R., Saadi, I., Cavallero, R., Yue, Y., Tsai, A.C., *et al.* (2011) Mutations in the RNA granule component TDRD7 cause cataract and glaucoma. *Science* 331, 1571-1576.
- Lamb, T.D. y Pugh, E.N., Jr. (2006) Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 5137-5152.
- Lamb, T.D., Arendt, D. y Collin, S.P. (2009) The evolution of phototransduction and eyes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 2791-2793.
- Lamour, N.F., Stahelin, R.V., Wijesinghe, D.S., Maceyka, M., Wang, E., Allegood, J.C., Merrill, A.H., Jr., Cho, W. y Chalfant, C.E. (2007) Ceramide kinase uses ceramide provided by ceramide transport protein: localization to organelles of eicosanoid synthesis. *J Lipid Res* 48, 1293-1304.
- Larhammar, D., Nordstrom, K. y Larsson, T.A. (2009) Evolution of vertebrate rod and cone phototransduction genes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 2867-2880.
- Lee, C., Yen, K. y Cohen, P. (2013) Humanin: a harbinger of mitochondrial-derived peptides? *Trends Endocrinol Metab* 24, 222-228.
- Li, C., Wang, L., Zhang, J., Huang, M., Wong, F., Liu, X., Liu, F., Cui, X., Yang, G., Chen, J., *et al.* (2014) CERKL interacts with mitochondrial TRX2 and protects retinal cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1842, 1121-1129.

Li, Y., Zhao, D.Y., Greenblatt, J.F. y Zhang, Z. (2013) RIPSeeker: a statistical package for identifying protein-associated transcripts from RIP-seq experiments. *Nucleic Acids Res* 41, e94.

Li, Y.R., King, O.D., Shorter, J. y Gitler, A.D. (2013) Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *J Cell Biol* 201, 361-372.

Libonati, M. y Gotte, G. (2004) Oligomerization of bovine ribonuclease A: structural and functional features of its multimers. *Biochem J* 380, 311-327.

Littink, K.W., Koenekoop, R.K., van den Born, L.I., Collin, R.W., Moruz, L., Veltman, J.A., Roosing, S., Zonneveld, M.N., Omar, A., Darvish, M., *et al.* (2010) Homozygosity mapping in patients with cone-rod dystrophy: novel mutations and clinical characterizations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 5943-5951.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

Mandal, N.A., Tran, J.T., Saadi, A., Rahman, A.K., Huynh, T.P., Klein, W.H. y Cho, J.H. (2013) Expression and localization of CERKL in the mammalian retina, its response to light-stress, and relationship with *NeuroD1* gene. *Exp Eye Res* 106, 24-33.

Masutani, M., Sonenberg, N., Yokoyama, S. y Imataka, H. (2007) Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. *EMBO J* 26, 3373-3383.

Michaelides, M., Hunt, D.M. y Moore, A.T. (2003) The genetics of inherited macular dystrophies. *J Med Genet* 40, 641-650.

Michaelides, M., Hardcastle, A.J., Hunt, D.M. y Moore, A.T. (2006) Progressive cone and cone-rod dystrophies: phenotypes and underlying molecular genetic basis. *Surv Ophthalmol* 51, 232-258.

Mitra, K., Frank, J. y Driessen, A. (2006) Co- and post-translational translocation through the protein-conducting channel: analogous mechanisms at work? *Nat Struct Mol Biol* 13, 957-964.

Muzumdar, R.H., Huffman, D.M., Calvert, J.W., Jha, S., Weinberg, Y., Cui, L., Nemkal, A., Atzmon, G., Klein, L., Gundewar, S., *et al.* (2010) Acute humanin therapy attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 1940-1948.

Nawy, S. y von Gersdorff, H. (2011) Bipolar cells in the vertebrate retina: from form to function. *Introduction. Vis Neurosci* 28, 1-2.

Nevet, M.J., Vekslin, S., Dizhoor, A.M., Olshevskaya, E.V., Tidhar, R., Futerman, A.H. y Ben-Yosef, T. (2012) Ceramide kinase-like (CERKL) interacts with neuronal calcium sensor proteins in the retina in a cation-dependent manner. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 4565-4574.

- Newman, E. y Reichenbach, A. (1996) The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 19, 307-312.
- Nguyen-Legros, J. y Hicks, D. (2000) Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *Int Rev Cytol* 196, 245-313.
- Niikura, T., Sidahmed, E., Hirata-Fukae, C., Aisen, P.S. y Matsuoka, Y. (2011) A humanin derivative reduces amyloid beta accumulation and ameliorates memory deficit in triple transgenic mice. *PLoS One* 6, e16259.
- Nijtmans, L.G., Henderson, N.S., Attardi, G. y Holt, I.J. (2001) Impaired ATP synthase assembly associated with a mutation in the human ATP synthase subunit 6 gene. *J Biol Chem* 276, 6755-6762.
- Nilsson, J., Sengupta, J., Frank, J. y Nissen, P. (2004) Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep* 5, 1137-1141.
- O'Donnell, M.A., Pérez-Jiménez, E., Oberst, A., Ng, A., Massoumi, R., Xavier, R., Green, D.R. y Ting, A.T. (2011) Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nat Cell Biol* 13, 1437-1442.
- Pahlman, S., Mamaeva, S., Meyerson, G., Mattsson, M.E., Bjelfman, C., Ortoft, E. y Hammerling, U. (1990) Human neuroblastoma cells in culture: a model for neuronal cell differentiation and function. *Acta Physiol Scand Suppl* 592, 25-37.
- Parmeggiani, F. (2011) Clinics, epidemiology and genetics of retinitis pigmentosa. *Curr Genomics* 12, 236-237.
- Pasantes-Morales, H., Quiroz, H. y Quesada, O. (2002) Treatment with taurine, diltiazem, and vitamin E retards the progressive visual field reduction in retinitis pigmentosa: a 3-year follow-up study. *Metab Brain Dis* 17, 183-197.
- Pearson, R.A., Barber, A.C., Rizzi, M., Hippert, C., Xue, T., West, E.L., Duran, Y., Smith, A.J., Chuang, J.Z., Azam, S.A., *et al.* (2012) Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. *Nature* 485, 99-103.
- Perusek, L. y Maeda, T. (2013) Vitamin A derivatives as treatment options for retinal degenerative diseases. *Nutrients* 5, 2646-2666.
- Peterlin, B.M., Brogie, J.E. y Price, D.H. (2012) 7SK snRNA: a noncoding RNA that plays a major role in regulating eukaryotic transcription. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 92-103.
- Petrs-Silva, H. y Linden, R. (2014) Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa. *Clin Ophthalmol* 8, 127-136.
- Pol, A., Gross, S.P. y Parton, R.G. (2014) Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites. *J Cell Biol* 204, 635-646.

Politi, L., Rotstein, N. y Carri, N. (2001) Effects of docosahexaenoic acid on retinal development: cellular and molecular aspects. *Lipids* 36, 927-935.

Rebecchi, M.J. y Scarlata, S. (1998) Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27, 503-528.

Riera, M., Burguera, D., García-Fernández, J. y González-Duarte, R. (2013) *CERKL* knockdown causes retinal degeneration in zebrafish. *PLoS One* 8, e64048.

Rivolta, C., Sharon, D., DeAngelis, M.M. y Dryja, T.P. (2002) Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Hum Mol Genet* 11, 1219-1227.

Rovina, P., Schanzer, A., Graf, C., Mechtcheriakova, D., Jaritz, M. y Bornancin, F. (2009) Subcellular localization of ceramide kinase and ceramide kinase-like protein requires interplay of their Pleckstrin Homology domain-containing N-terminal regions together with C-terminal domains. *Biochim Biophys Acta* 1791, 1023-1030.

Saari, J.C. (2012) Vitamin A metabolism in rod and cone visual cycles. *Annu Rev Nutr* 32, 125-145.

Sambrook, J., Fritsch, E.R. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual* (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Schmieder, R. y Edwards, R. (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863-864.

Sernagor, E., Eglén, S.J. y Wong, R.O. (2001) Development of retinal ganglion cell structure and function. *Prog Retin Eye Res* 20, 139-174.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. y Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.

Sivan, G., Kedersha, N. y Elroy-Stein, O. (2007) Ribosomal slowdown mediates translational arrest during cellular division. *Mol Cell Biol* 27, 6639-6646.

Summerton, J. y Weller, D. (1997) Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7, 187-195.

Tajima, H., Kawasumi, M., Chiba, T., Yamada, M., Yamashita, K., Nawa, M., Kita, Y., Kouyama, K., Aiso, S., Matsuoka, M., *et al.* (2005) A humanin derivative, S14G-HN, prevents amyloid-beta-induced memory impairment in mice. *J Neurosci Res* 79, 714-723.

Tcherkezian, J., Brittis, P.A., Thomas, F., Roux, P.P. y Flanagan, J.G. (2010) Transmembrane receptor DCC associates with protein synthesis machinery and regulates translation. *Cell* 141, 632-644.

Towns, K.V., Kipioti, A., Long, V., McKibbin, M., Maubaret, C., Vaclavik, V., Ehsani, P., Springell, K., Kamal, M., Ramesar, R.S., *et al.* (2010) Prognosis for splicing factor

PRPF8 retinitis pigmentosa, novel mutations and correlation between human and yeast phenotypes. *Hum Mutat* 31, E1361-1376.

Tucker, B.A., Mullins, R.F. y Stone, E.M. (2014) Stem cells for investigation and treatment of inherited retinal disease. *Hum Mol Genet* 23, R9-R16.

Tuson, M., Marfany, G. y González-Duarte, R. (2004) Mutation of *CERKL*, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26). *Am J Hum Genet* 74, 128-138.

Tuson, M., Garanto, A., González-Duarte, R. y Marfany, G. (2009) Overexpression of *CERKL*, a gene responsible for retinitis pigmentosa in humans, protects cells from apoptosis induced by oxidative stress. *Mol Vis* 15, 168-180.

Vekslin, S. y Ben-Yosef, T. (2010) Spatiotemporal expression pattern of ceramide kinase-like in the mouse retina. *Mol Vis* 16, 2539-2549.

Vincent, A., Robson, A.G. y Holder, G.E. (2013) Pathognomonic (diagnostic) ERGs. A review and update. *Retina* 33, 5-12.

Waheed, N.K., Qavi, A.H., Malik, S.N., Maria, M., Riaz, M., Cremers, F.P., Azam, M. y Qamar, R. (2012) A nonsense mutation in S-antigen (p.Glu306*) causes Oguchi disease. *Mol Vis* 18, 1253-1259.

Xie, H.R., Hu, L.S. y Li, G.Y. (2010) SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)* 123, 1086-1092.

Xing, L. y Bassell, G.J. (2013) mRNA localization: an orchestration of assembly, traffic and synthesis. *Traffic* 14, 2-14.

Xue, S. y Barna, M. (2012) Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 355-369.

Yamagishi, Y., Hashimoto, Y., Niikura, T. y Nishimoto, I. (2003) Identification of essential amino acids in humanin, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-relevant insults. *Peptides* 24, 585-595.

Yang, J., Liu, X., Zhao, Y., Adamian, M., Pawlyk, B., Sun, X., McMillan, D.R., Liberman, M.C. y Li, T. (2010) Ablation of whirlin long isoform disrupts the USH2 protein complex and causes vision and hearing loss. *PLoS Genet* 6, e1000955.

Yen, K., Lee, C., Mehta, H. y Cohen, P. (2013) The emerging role of the mitochondrial-derived peptide humanin in stress resistance. *J Mol Endocrinol* 50, R11-19.

Ying, G., Iribarren, P., Zhou, Y., Gong, W., Zhang, N., Yu, Z.X., Le, Y., Cui, Y. y Wang, J.M. (2004) Humanin, a newly identified neuroprotective factor, uses the G protein-coupled formylpeptide receptor-like-1 as a functional receptor. *J Immunol* 172, 7078-7085.

Yokota, S., Kamijo, K. y Oda, T. (2000) Aggregate formation and degradation of overexpressed wild-type and mutant urate oxidase proteins. Quality control of organelle-destined proteins by the endoplasmic reticulum. *Histochem Cell Biol* *114*, 433-446.

Yu, J.H., Yang, W.H., Gulick, T., Bloch, K.D. y Bloch, D.B. (2005) Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *RNA* *11*, 1795-1802.

Zhai, D., Luciano, F., Zhu, X., Guo, B., Satterthwait, A.C. y Reed, J.C. (2005) Humanin binds and nullifies Bid activity by blocking its activation of Bax and Bak. *J Biol Chem* *280*, 15815-15824.

Zipfel, P.F., Lauer, N. y Skerka, C. (2010) The role of complement in AMD. *Adv Exp Med Biol* *703*, 9-24.

