



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Abordatge genòmic personalitzat
per a la identificació de la causa molecular
en pacients amb distròfies hereditàries de la retina**

Anna Esteve i Garcia



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

TESI DOCTORAL

DISTRÒFIES HEREDITÀRIES DE LA RETINA

ABORDATGE GENÒMIC PERSONALITZAT PER A LA
IDENTIFICACIÓ DE LA CAUSA MOLECULAR

Anna Esteve i Garcia



**Abordatge genòmic personalitzat per a la
identificació de la causa molecular en pacients
amb distròfies hereditàries de la retina**

Memòria de tesi doctoral presentada per

Anna Esteve i Garcia

per optar al grau de doctora per la Universitat de Barcelona

Dirigida per

Estefania Cobos Martín i Cinthia Aguilera Román

Hospital Universitari de Bellvitge

i tutoritzada per

Ferran Casals López

Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

Programa de doctorat en Genètica

Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona



Barcelona, setembre 2025

“No tots els ulls tancats dormen, ni tots els ulls oberts hi veuen.”

PROVERBI TRADICIONAL

Agraïments

Quan vaig iniciar-me en el camp de la genètica, mai no hauria imaginat que dedicaria el doctorat a l'estudi de les distròfies hereditàries de la retina. Hi vaig arribar gràcies a la Dra. Estefania Cobos i al Dr. Jaume Català, que amb passió i generositat em van obrir les portes d'aquest fascinant camp. Aquesta tesi és, en bona part, fruit de tot el que m'heu ensenyat i compartit des del primer dia.

A les meves directores. Estefania, gràcies per aquella trucada en plena auditoria. Va ser l'inici de tot. Cinthia, tu ets l'ànima d'aquesta tesi. Has estat guia, còmplice i amiga.

A la Dra. Núria Llecha, per la confiança. Al Dr. Lluís Arias, per la beca que ha sostingut una part substancial del treball. A l'Ariadna, per l'acompanyament i suport constant. A la Cristina, per fer-ho tot més fàcil i millor. És una sort treballar amb tu.

Al Comitè de Recerca de l'Hospital Universitari de Bellvitge, per la beca que m'ha permès arribar fins aquí. A en Pep Capdaigua i a l'Associació Retina Catalunya, per cedir amb tanta amabilitat *La mirada que resisteix*. És un honor que aquesta obra doti de sentit la portada.

A la meva família i amics, per creure-hi i aguantar estoicament hores d'explicacions incomprensibles. Als meus pares i germà, per ser-hi sempre. A tu, Josep, per celebrar cada fita i per cuidar-me tant i tan bé.

I, molt especialment, als pacients. Aquesta tesi vol ser un petit granet de sorra per acostar-vos algun dia a un tractament. La vostra mirada, que resisteix, és el veritable motor d'aquesta recerca.

Finançament

Aquesta tesi ha estat possible gràcies al suport econòmic de les següents fonts de finançament:

- **Ajut per a projectes de Recerca Clínica 2021**, de l'Hospital Universitari de Bellvitge, concedit el 29 de juny de 2022, amb un import de 20.000 euros (referència: PUB22015).
- ***The Macula Society Research Grant***, concedida per *The Macula Society* el 16 de febrer de 2023, amb un import de 35.000 dòlars (referència: DON23020).
- Tercer premi de les **ajudes a la recerca Retina Catalunya**, atorgat el 10 de maig de 2025, amb una aportació de 1.000 euros, finançat per l'empresa *Bidons Egara S.L.*

Resum

Antecedents: Les distròfies hereditàries de la retina (DHR) són malalties minoritàries amb una gran heterogeneïtat genètica. Malgrat l'ús extensiu de tècniques de seqüenciació massiva, fins a un 40% dels pacients romanen sense un diagnòstic molecular concloent, fet que limita el pronòstic, l'assessorament genètic i l'accés a teràpies dirigides. Aquesta tesi avalua l'impacte d'un abordatge genòmic seqüencial i personalitzat per augmentar el rendiment diagnòstic en pacients adults amb DHR que no han obtingut una resolució inicial.

Objectius: Millorar el diagnòstic molecular en DHR mitjançant la combinació de reanàlisi d'exoma, nous estudis complementaris de seqüenciació i validacions funcionals; establir noves correlacions genotip-fenotip; i definir un protocol d'anàlisi molecular transferible a la pràctica clínica.

Mètodes: Es va analitzar una cohort de 597 individus amb DHR. L'estudi genètic inicial va resoldre 313 casos índex (59,6%) i 63 casos familiars. Dels 221 casos no resolts, se'n van prioritzar 101 per a una reavaluació seqüencial en quatre etapes: (1) revisió i reclassificació de variants de significat clínic incert (VUS) amb criteris actualitzats i nova evidència; (2) reanàlisi de dades d'exoma amb panells virtuals ampliat i *pipelines* revisats; (3) seqüenciació complementària (genoma complet i panells de regions complexes); i (4) estudis funcionals, incloent-hi anàlisi d'ARNm i assajos de minigen/midigen per caracteritzar alteracions de l'*splicing*.

Resultats: La reavaluació dels 101 casos prioritzats va permetre establir 49 nous diagnòstics, aconseguint un rendiment del 48,5% en aquesta subcohort. La reclassificació de VUS va resoldre 18 casos, destacant la variant *REEP6* c.349-4G>T, reclassificada com a patogènica gràcies a estudis de segregació i d'ARNm. La reanàlisi d'exoma va contribuir a 16 diagnòstics addicionals, mentre que les seqüenciacions complementàries van proporcionar-ne 15 més, incloent-hi la detecció de variants estructurals i delecions parcials en *ABCA4*, *ARSG*, *NPHP1* i *PDE6B*. Es van identificar set variants intròniques profundes d'*ABCA4*, una de les quals no havia estat reportada prèviament i va ser validada funcionalment. L'ús d'estudis funcionals i de noves evidències va permetre establir diagnòstics relacionats amb *ATF6*, *RPGRIP1*, *USH2A* i *NPHP4*. Així mateix, es va confirmar la patogenicitat de variants codificants prèviament descartades en *ABCA4*, *CERKL*, *HK1* i *TULP1*, i es van definir noves correlacions genotip-fenotip en famílies amb variants en *TULP1* i *CEP290*.

Conclusions: Un model seqüencial i adaptatiu que integra la reanàlisi crítica de dades, tècniques de seqüenciació d'alta resolució i estudis funcionals millora significativament el rendiment diagnòstic de les DHR i permet resoldre casos complexos. La interpretació de variants requereix expertesa i una actualització contínua dels criteris, així com una col·laboració multidisciplinària. El protocol proposat és escalable, transferible i sostenible, i reforça la implementació de la medicina de precisió en malalties genètiques minoritàries.

Paraules clau: *distròfies hereditàries de la retina; diagnòstic molecular; reanàlisi d'exoma; seqüenciació del genoma; estudis funcionals; medicina de precisió.*

Índex

1. Resum.....	10
2. Abreviatures i acrònims.....	15
3. Glossari.....	19
4. Enumeració dels articles.....	25
5. Introducció.....	29
5.1. Biologia de la retina i del procés visual	30
5.1.1. Estructura i funció de la retina	31
5.1.2. Tipus cel·lulars i organització sinàptica	33
5.1.3. Fototransducció i cicle visual	36
5.2. Les distròfies hereditàries de la retina (DHR)	39
5.2.1. Epidemiologia i impacte sociosanitari	39
5.2.2. Diversitat fenotípica i classificació clínica	41
5.2.3. Diagnòstic clínic i funcional	49
5.3. Bases genètiques de les DHR.....	55
5.3.1. Gens implicats i funcions moleculars.....	56
5.3.2. Tipus de variants i mecanismes de patogenicitat.....	58
5.3.3. Patrons d'herència i correlació genotip-fenotip.....	66
5.3.4. Medicina de precisió i perspectives terapèutiques...	71
5.4. Diagnòstic molecular de les DHR.....	75
5.4.1. Tècniques de seqüenciació.....	76
5.4.2. Interpretació i classificació de variants	80
5.4.3. Rendiment i limitacions del diagnòstic molecular	86
6. Hipòtesi	89
7. Objectius	93
8. Informe de les directores de la tesi	97
9. Publicacions.....	103
Article 1	105
Article 2	121
Article 3	141
10. Discussió.....	171
10.1. Context i importància del diagnòstic genètic en les DHR.....	172
10.2. Implementació d'un nou algoritme i resultats globals	173
10.3. Reptes del diagnòstic molecular	176
10.3.1. Gestió de variants de significat clínic incert.....	176
10.3.2. Limitacions tècniques i bioinformàtiques.....	179
10.4. Coneixement generat més enllà del diagnòstic	182
10.4.1. Correlació genotip-fenotip	182
10.4.2. Evidència emergent de gens candidats	184
10.5. Implicacions clíniques, limitacions i perspectives futures ..	186
11. Conclusions.....	191
12. Bibliografia	195



ABREVIATURES LACRÓNIMS

2

ACL Amaurosi congènita de Leber

ACMG *American College of Medical Genetics and Genomics*

AD Herència autosòmica dominant

ADN Àcid desoxiribonucleic

AMP *Association for Molecular Pathology*

AR Herència autosòmica recessiva

ARN Àcid ribonucleic

ARNm Àcid ribonucleic missatger

ASO Oligonucleòtid antisentit

AV Agudesia visual

AVV Virus adenoassociat (*adeno-associated virus*)

B Variant benigna

CADD *Combined Annotation-Dependent Depletion*

CNEC Ceguesa nocturna estacionària congènita

CNV Variant de nombre de còpies (*copy number variant*)

CV Camp visual

DC Distròfia de cons

DCB Distròfia de cons-bastons

DGP Diagnòstic genètic preimplantacional

DHR Distròfies hereditàries de la retina

DMAE Degeneració macular associada a l'edat

EPR Epiteli pigmentari de la retina

FAF Autofluorescència del fons d'ull (*fundus autofluorescence*)

LB Variant probablement benigna (*likely benign*)

LOVD *Leiden Open Variation Database*

LP Variant probablement patogènica (*likely pathogenic*)

ffERG Electrorretinografia de camp complet (*full-field electroretinography*)

gnomAD *Genome Aggregation Database*

indel Inserció o deleció

mfERG Electrorretinografia multifocal (*multifocal electroretinography*)

NGS Seqüenciació massiva (*next generation sequencing*)

NMD *Nonsense-mediated decay*

OCT Tomografia de coherència òptica (*optical coherence tomography*)

P Variant patogènica

PIO Pressió intraocular

REVEL *Rare Exome Variant Ensemble Learner*

RP Retinosi pigmentària

SE Segment extern

SI Segment intern

SV Variant estructural (*structural variant*)

VUS Variant de significat clínic incert (*variant of uncertain significance*)

WES Seqüenciació de l'exoma complet (*whole exome sequencing*)

WGS Seqüenciació del genoma complet (*whole genome sequencing*)

XL Herència lligada al cromosoma X



GLOSSARI

3

ACMG/AMP Conjunt de criteris estandarditzats per classificar variants genètiques en cinc categories segons l'evidència de patogenicitat: patogènica, probablement patogènica, de significat incert, probablement benigna i benigna.

CADD Eina de puntuació que integra dades genòmiques i anotacions funcionals per estimar l'impacte potencial d'una variant; valors més alts indiquen un efecte biològic més probable.

Ciliopaties Grup de malalties genètiques causades per defectes en els cilis primaris, amb heterogeneïtat fenotípica i afectació potencial de diversos òrgans, inclosa la retina.

ClinVar Plataforma de lliure accés del *National Center for Biotechnology Information* que recull variants genètiques i les seves classificacions aportades per laboratoris, investigadors i clínics (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

Correlació genotip-fenotip Concordança entre el fenotip clínic observat i el tipus, la localització i l'efecte de la variant genètica identificada.

Expressivitat variable Variabilitat en la manifestació clínica entre individus portadors de la mateixa variant genètica.

Franklin Plataforma en línia de lliure accés desenvolupada per Genoox per classificar variants segons els criteris ACMG/AMP, amb integració de dades poblacionals, funcionals i clíniques (<https://franklin.genoox.com/>).

gnomAD Base de dades pública d'exomes i genomes de múltiples projectes, que recull la variabilitat genètica humana (<https://gnomad.broadinstitute.org/>).

Línia de l'el·lipsoide Estructura hiperreflectiva visible a l'OCT, corresponent a la zona rica en mitocondris dels SI dels fotoreceptors; marcador indirecte de la seva viabilitat.

Long-read sequencing Tecnologia de tercera generació que genera lectures d'ADN de diversos milers de parells de bases.

LOVD Banc de dades públic i obert que recull variants genètiques reportades per usuaris i grups de recerca, organitzat per gen i fenotip (<https://www.lovd.nl/>).

Minigen/midigen Construccions sintètiques d'ADN utilitzades en assajos funcionals per avaluar l'efecte de variants sobre l'*splicing*. Els *minigens* inclouen fragments reduïts d'un gen (exons i introns adjacents), mentre que els *midigens* cobreixen un gen complet o fragments extensos.

NMD Mecanisme de control de qualitat posttranscripcional que reconeix i degrada els transcrits d'ARNm amb codons de terminació prematurs, evitant així la síntesi de proteïnes truncades.

Panell virtual Selecció de gens basada en un fenotip o criteris clínics específics, aplicada mitjançant filtres bioinformàtics sobre dades de seqüenciació massiva que cobreixen molts més gens.

Penetrància incompleta Situació en què una persona portadora d'una variant patogènica no presenta símptomes, o bé aquests són lleus o d'aparició tardana

Pipeline Seqüència d'etapes bioinformàtiques per processar i interpretar dades de seqüenciació massiva, incloent-hi control de qualitat, alineament, anotació, filtratge i priorització de variants segons el fenotip clínic.

REVEL Algoritme d'aprenentatge automàtic que combina múltiples predictors bioinformàtics per estimar la probabilitat de patogenicitat de variants *missense*. Proporciona una puntuació entre 0 i 1, amb valors més alts indicatius de major probabilitat de patogenicitat.

Short-read sequencing Tecnologia de segona generació que produeix fragments d'ADN curts (100–300 pb), àmpliament utilitzada en entorns clínics.

SpliceAI Algoritme de predicció de l'impacte de les variants sobre l'*splicing*, que calcula una puntuació quantitativa de l'efecte potencial, incloses alteracions fora dels llocs canònics.

Splicing Procés pel qual els introns són eliminats del transcrit primari i els exons s'uneixen per generar l'ARNm madur.

VarSome Plataforma en línia de lliure accés que integra informació genòmica i classifica variants segons els criteris ACMG/AMP (<https://varsome.com/>).



ENUMERACIÓ
DELS ARTICLES

4

Tesi en format de compendi de publicacions. La tesi consta de 8 objectius i **3 articles**.

- 1 **Anna Esteve-Garcia**, Estefania Cobos, Cristina Sau, Ariadna Padró-Miquel, Jaume Català-Mora, Pilar Barberán-Martínez, José M. Millán, Gema García-García i Cinthia Aguilera.
Deciphering complexity: TULP1 variants linked to an atypical retinal dystrophy phenotype.
Frontiers in Genetics, 2024; 15:1352063.
Factor d'impacte (2024): 2.8. Quartil (JCR 2024): Q2 en la categoria *Genetics & Heredity*.

- 2 **Anna Esteve-Garcia**, Cristina Sau, Ariadna Padró-Miquel, Jaume Català-Mora, Cinthia Aguilera i Estefania Cobos.
Expanding the Clinical Spectrum of CEP290 Variants: A Case Report on Non-Syndromic Retinal Dystrophy with a Mild Phenotype.
Genes. 2024; 15: 1584.
Factor d'impacte (2024): 2.8. Quartil (JCR 2024): Q2 en la categoria *Genetics & Heredity*.

- 3 **Anna Esteve-Garcia**, Ariadna Padró-Miquel, Jaume Català-Mora, Cristina Sau, Delia Yubero, Zelia Corradi, Frans Cremers, Pilar Barberán-Martínez, José Millán, Gema García-García, Estefania Cobos, Ilyana Ismael, Luis Arias i Cinthia Aguilera.
Personalised genomic strategies improve diagnostic yield in inherited retinal dystrophies: a stepwise, patient-centred approach.
Eye. 2025; 39: 2899–2911.
Factor d'impacte (2024): 3.2. Quartil (JCR 2024): Q1 en la categoria *Ophthalmology*.



INTRODUCCIÓ

5

5.1. Biologia de la retina i del procés visual

La visió és un dels sentits més sofisticats i determinants de l'espècie humana. Més enllà de percebre formes, colors i moviments, ens permet orientar-nos, comunicar-nos i mantenir una vida autònoma (1). Tot i la seva aparent immediatesa, és el resultat d'una seqüència altament precisa i coordinada —captació de la llum, conversió en senyals elèctrics, processament neuronal i interpretació cortical— que es completa en qüestió de mil·lisegons (1,2). Alteracions, fins i tot subtils, en qualsevol d'aquests mecanismes poden comprometre significativament la funció visual i, en conseqüència, tenir un impacte profund sobre la qualitat de vida (3).

La **retina**, situada a la paret posterior del globus ocular (Figura 1), és una estructura neurosensorial especialitzada que actua com a interfície primària entre la llum i el cervell. Mitjançant el procés de fototransducció, transforma els fotons en impulsos elèctrics que es transmeten a través del nervi òptic, iniciant així la cadena de processament visual (4). La seva arquitectura, organitzada en capes neuronals interconnectades, combina una eficiència funcional extraordinària amb una marcada vulnerabilitat davant alteracions genètiques i ambientals. Les distròfies hereditàries de la retina (DHR), objecte central d'aquesta tesi, exemplifiquen aquesta fragilitat (5). Comprendre en profunditat la seva organització cel·lular i molecular és, per tant, essencial per desxifrar els mecanismes fisiopatològics subjacents i interpretar amb precisió les variants genètiques implicades.

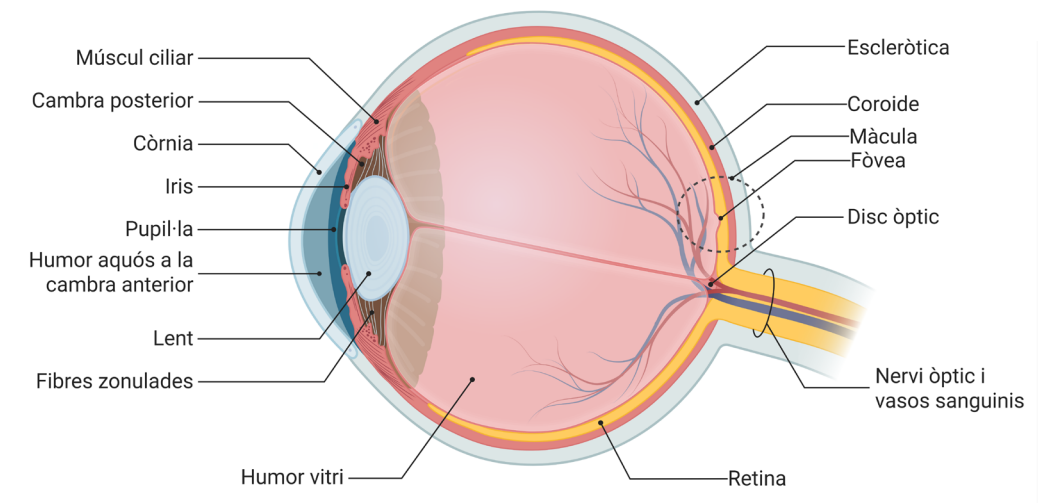


Figura 1. Anatomia esquemàtica de l'ull humà. Secció sagital amb les principals estructures implicades en la funció visual. S'hi representen les capes oculars (escleròtica, coroide i retina), els òrgans de captació i enfocament de la llum (còrnia, pupila, cristal·lí), així com les principals estructures retinals, rellevants en el context de les DHR: retina, màcula, fòvea i disc òptic. *Figura adaptada de BioRender.*

5.1.1. Estructura i funció de la retina

La retina forma part del sistema nerviós central, ja que deriva del teixit neuroectodèrmic que origina el diencèfal embrionari, precursor del cervell (4,6). Està constituïda per una xarxa laminar de neurones i cèl·lules glials (7), organitzada en deu capes histològiques ben definides (Figura 2). Les nou capes internes conformen la retina neurosensorial pròpiament dita, mentre que l'epiteli pigmentari de la retina (EPR) constitueix la capa externa. Encara que no participa directament en els circuits sinàptics, l'EPR exerceix un paper clau en el manteniment de l'homeòstasi retinal (6).

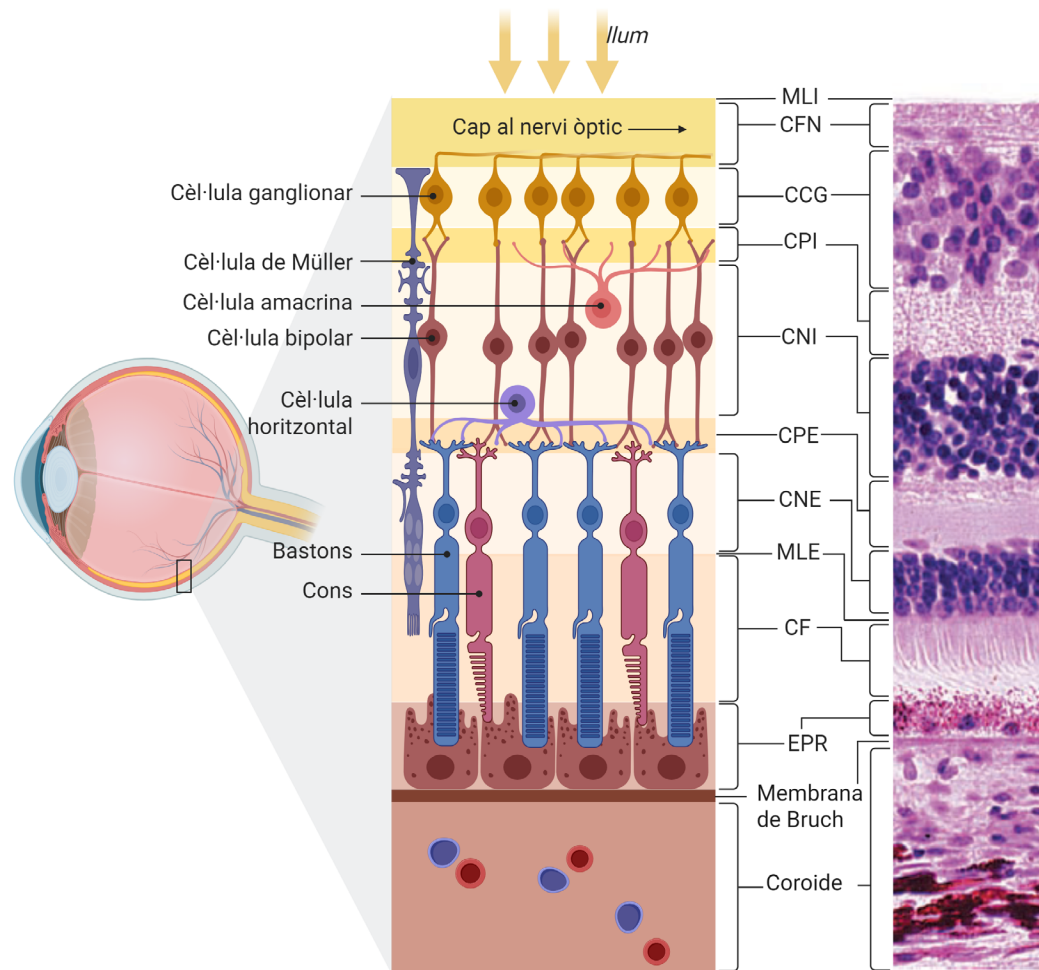


Figura 2. Estructura microscòpica de la retina. Esquema histològic de les deu capes retinals i dels principals tipus cel·lulars implicats en la transmissió i el processament de la informació visual. De dins cap enfora: MLI (membrana limitant interna), CFN (capa de fibres nervioses), CCG (capa de cèl·lules ganglionars), CPI (capa plexiforme interna), CNI (capa nuclear interna), CPE (capa plexiforme externa), CNE (capa nuclear externa), MLE (membrana limitant externa), CF (capa de fotoreceptors) i EPR (epiteli pigmentari de la retina). *Figura adaptada de BioRender.*

Funcionalment, la retina es divideix en dues regions principals:

- La **màcula**, situada al centre, és responsable de la visió d'alta resolució, imprescindible per a activitats que requereixen precisió com la lectura, l'escriptura o el reconeixement de rostres, així com per a una percepció cromàtica òptima (8). La seva regió més especialitzada, la **fòvea**, constitueix l'àrea de màxima agudesa visual (AV) i discriminació cromàtica, ja que presenta la densitat més elevada de cons disposats en un mosaic hexagonal regular. A més, està lliure de vasos sanguinis, formant la zona avascular foveal (9).
- La **retina perifèrica**, que ocupa la major part de la superfície retinal, està dominada pels bastons, especialitzats en la visió escotòpica o nocturna i en la detecció del moviment. Tot i tenir una resolució espacial inferior i una percepció cromàtica limitada, és fonamental per a l'orientació i la navegació, ja que garanteix la percepció global de l'entorn i l'adaptació a condicions de baixa il·luminació (8).

5.1.2. Tipus cel·lulars i organització sinàptica

La retina conté cinc tipus principals de neurones —fotoreceptors, bipolars, ganglionars, horitzontals i amacrines (Figura 2)— amb més de cent subtipus funcionals (7). Els **fotoreceptors** (bastons i cons) són els encarregats de captar la llum i iniciar la fototransducció (4). Els bastons, altament sensibles, operen en condicions de baixa lluminositat, mentre que els cons, actius en llum intensa (visió

fotòpica), permeten la percepció cromàtica. Es classifiquen en tres subtipus (S, M i L) segons la sensibilitat espectral al blau, verd o vermell, respectivament. L'ull humà conté aproximadament 120 milions de bastons i 6 milions de cons, distribuïts de manera desigual, com ja s'ha exposat: els cons es concentren a la màcula —especialment a la fòvea—, mentre que els bastons predominen a la perifèria (8). Aquest patró reforça l'especialització funcional entre la visió central i perifèrica.

Morfològicament, els fotoreceptors presenten una arquitectura polaritzada amb compartiments diferenciats (Figura 3) (10):

- **Segment extern (SE):** conté els discs membranosos que allotgen els pigments visuals —rodopsina als bastons i opsines als cons—, responsables directes de la captació de fotons. Aquests discs es renoven contínuament mitjançant un procés coordinat de síntesi i fagocitosi.
- **Segment intern (SI):** ric en mitocondris, genera l'energia necessària per sostenir el metabolisme cel·lular i l'alta demanda bioenergètica del SE.
- **Cili de connexió:** estructura homòloga al cili primari que uneix SE i SI, i actua com a via de transport intracel·lular selectiu de proteïnes, vesícules i altres components essencials.
- **Terminal sinàptic:** primer punt de transmissió del senyal visual, establint contacte amb les cèl·lules bipolars mitjançant mecanismes regulats per canals i proteïnes sinàptiques.

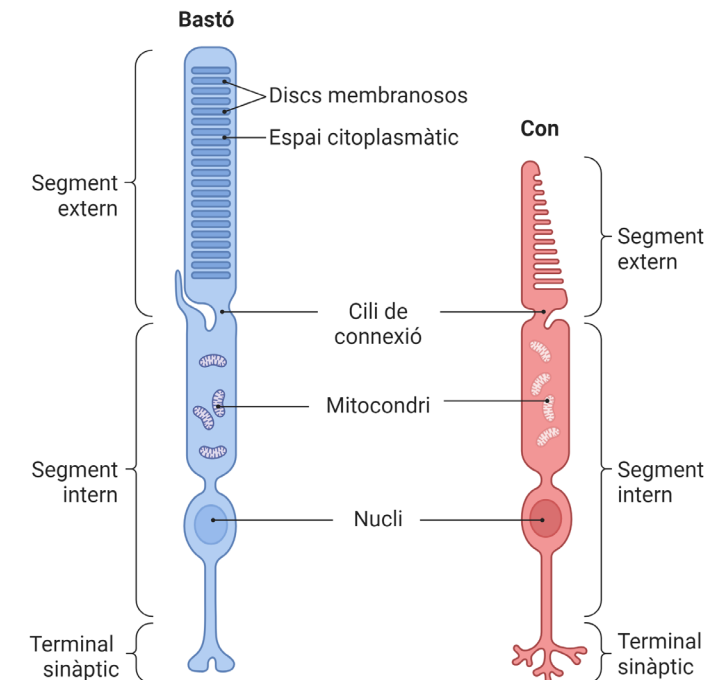


Figura 3. Estructura dels fotoreceptors. Representació esquemàtica d'un bastó i d'un con amb els principals compartiments funcionals. *Figura adaptada de BioRender.*

El senyal visual es transmet pel circuit vertical **fotoreceptors** → **cèl·lules bipolars** → **cèl·lules ganglionars**. Les cèl·lules bipolars integren i modulen els senyals, mentre que les ganglionars generen potencials d'acció que viatgen pel nervi òptic fins al cervell, on es forma la percepció visual conscient (4). Aquest circuit és regulat per les **cèl·lules horitzontals** i **amacrines**, que modulen lateralment la informació, refinant contrast, resolució espacial i sensibilitat al moviment.

L'EPR desenvolupa un paper fonamental en la supervivència dels fotoreceptors. Aquesta monocapa cel·lular fagocita diàriament els discs

envellits del SE, intercanvia nutrients i ions, elimina residus cel·lulars i regenera el cromòfor visual (11-*cis*) mitjançant el cicle visual (6).

Les cèl·lules de Müller, principals cèl·lules glials retinals, mantenen l'estabilitat estructural i bioquímica, mentre que astròcits i micròglia contribueixen a la resposta immune i la neuroprotecció. La **barrera hematorretiniana**, anàloga a l'hematoencefàlica, garanteix un entorn estable per a les neurones retinals, regulant l'intercanvi selectiu de nutrients, metabòlits i productes de rebuig entre la circulació sanguínia i el teixit neural.

5.1.3. Fototransducció i cicle visual

La **fototransducció** és el procés mitjançant el qual els fotoreceptors transformen l'estímul lumínic en una resposta elèctrica (11). S'inicia quan un fotó és absorbit pel pigment visual (rodopsina o opsina), fet que desencadena una cascada bioquímica que condueix a la hiperpolarització del fotoreceptor i a la modulació de l'alliberament de glutamat a la sinapsi amb les cèl·lules bipolars (Figura 4).

Els cons presenten una resposta més ràpida i menys sensible que els bastons, fet que permet una millor adaptació a la llum intensa i una recuperació visual més àgil (12). Aquestes diferències es deuen, en part, a isoformes proteiques específiques i a l'existència d'un cicle visual alternatiu, més ràpid, a les cèl·lules de Müller (11).

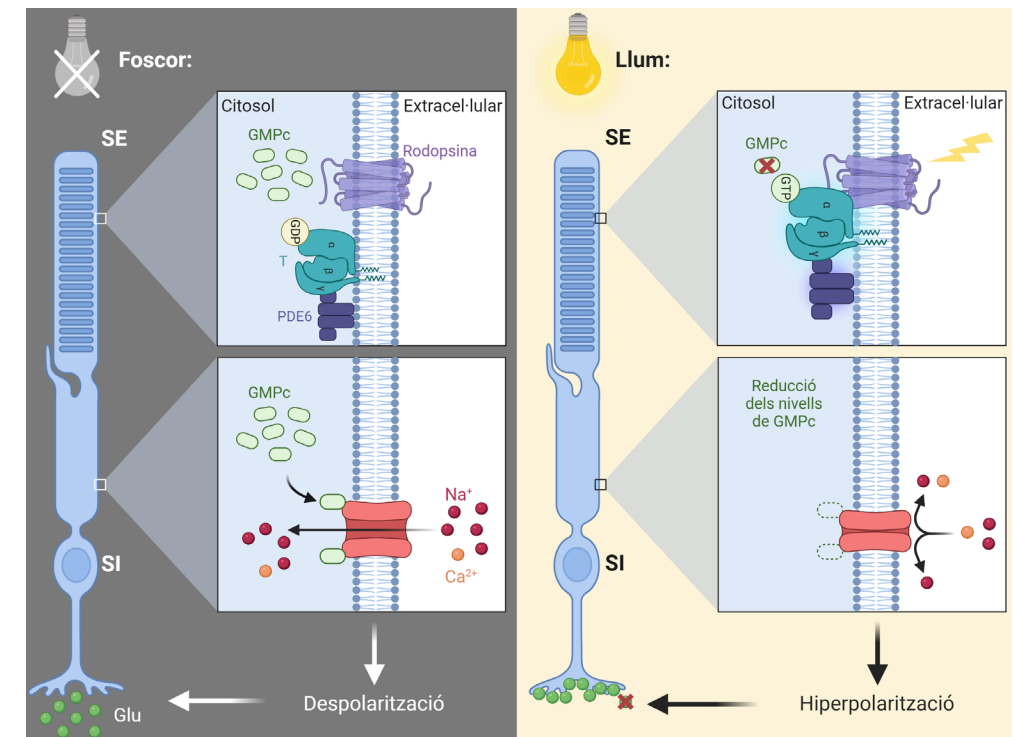


Figura 4. Cascada de fototransducció en bastons. En condicions de foscor (esquerra), la guanosina monofosfat cíclica (GMPc) manté oberts els canals catiónics del SE, permetent l'entrada contínua de Na^+ i Ca^{2+} i mantenint la cèl·lula despolaritzada. L'absorció d'un fotó (dreta) activa la rodopsina, que estimula la transducina (T) i aquesta, al seu torn, la fosfodiesterasa (PDE6). La conseqüent hidròlisi de GMPc provoca el tancament dels canals, la hiperpolarització de la membrana i la reducció de l'alliberament de glutamat (Glu). *Figura adaptada de BioRender, inspirada en Klapper et al. (2016) (13).*

La repetició del procés de fototransducció requereix la regeneració de l'11-*cis*-retinal, cromòfor derivat de la vitamina A, que confereix als pigments visuals la capacitat de captar fotons. Aquesta regeneració es duu a terme mitjançant el **cicle visual** a l'EPR (Figura 5) i depèn de proteïnes com LRAT, RDH12 i RPE65, entre d'altres, així com d'una aportació dietètica adequada de vitamina A (11).

Quan aquest cicle es veu alterat, com passa en diverses DHR, s'acumulen subproductes com la lipofuscina, que tenen un efecte tòxic, induint estrès oxidatiu i afavorint la degeneració progressiva dels fotoreceptors (14). La complexitat estructural i funcional de la retina fa que alteracions moleculars o cel·lulars puguin desencadenar els processos degeneratius característics d'aquestes malalties.

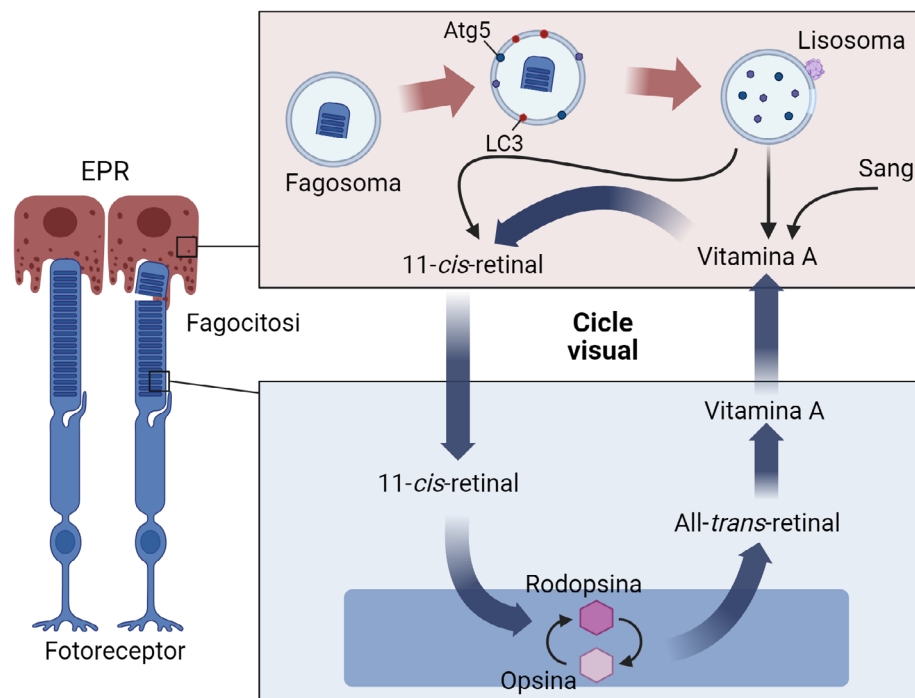


Figura 5. Cicle visual i funcions de l'EPR. L'activació de la rodopsina converteix l'11-*cis*-retinal en all-*trans*-retinal, que ha de ser regenerat a la forma activa (11-*cis*) per permetre nous cicles de fototransducció. Paral·lelament, l'EPR elimina diàriament els discs enveïts dels fotoreceptors mitjançant mecanismes d'autofàgia regulats per proteïnes com Atg5 i LC3, contribuint així a l'homeòstasi retinal. *Figura creada amb BioRender, adaptada de Boya & Codogno (2013) (15).*

5.2. Les distròfies hereditàries de la retina (DHR)

Les DHR són un grup heterogeni de malalties neurodegeneratives que afecten principalment la retina i, en alguns casos, estructures adjacents com la coroides o el vitri. Tot i compartir una mateixa localització anatòmica, presenten una gran diversitat clínica i genètica, amb més de 300 gens implicats i nombrosos fenotips descrits (16). En termes globals, representen la primera causa de ceguesa d'origen genètic i una de les principals causes de discapacitat visual en edat laboral als països desenvolupats (17,18). L'edat d'inici, el tipus cel·lular afectat, la velocitat de progressió i l'abast de la malaltia són molt variables, i aquesta heterogeneïtat, juntament amb la superposició fenotípica, dificulta sovint el diagnòstic (19).

L'abordatge de les DHR requereix una estratègia multidisciplinària que integri una exploració clínica experta, tècniques d'imatge estructural i funcional i estudis genètics (20). Els subapartats següents aborden l'epidemiologia, la classificació i l'estratègia diagnòstica que defineixen el marc clínic actual d'aquestes patologies.

5.2.1. Epidemiologia i impacte sociosanitari

Les DHR es consideren malalties minoritàries, ja que cadascuna d'elles és poc prevalent de manera individual. Tot i això, en conjunt afecten entre 1 de cada 2.000 i 1 de cada 4.000 persones a escala global (17,21–24). Aquestes xifres les situen entre les principals causes de discapacitat visual i ceguesa genètica en països desenvolupats. A l'Estat

espanyol, les estimacions són similars i la retinosi pigmentària (RP) concentra la majoria dels casos (25). Aplicades a la població catalana, aquestes dades suggereixen que prop de 2.000 persones podrien estar afectades per alguna DHR, moltes d'elles amb diagnòstic clínic de RP.

Tanmateix, l'impacte d'aquestes malalties transcendeix les xifres epidemiològiques. Les DHR són patologies **cròniques, progressives** i, en la majoria dels casos, **sense tractament curatiu**. Poden debutar a qualsevol edat, sovint en moments vitals decisius —infància, adolescència o inici de l'edat adulta— i evolucionar cap a pèrdua visual greu o ceguesa legal. Aquesta discapacitat té repercussions en diversos àmbits de la vida quotidiana: limita l'autonomia i la mobilitat, dificulta l'aprenentatge i l'accés al treball, i restringeix la participació social (3). L'impacte emocional és igualment profund: ansietat, depressió i aïllament social són freqüents, afectant no només la persona diagnosticada sinó també el seu entorn familiar i social (26,27).

En l'àmbit estructural, persisteixen obstacles com el retard diagnòstic, la manca de professionals especialitzats, la desigualtat territorial en l'accés a recursos i el desconeixement generalitzat de les DHR (28,29), factors que poden reforçar l'estigma i la discriminació. En aquest context, les unitats especialitzades tenen un paper clau: garantir atenció experta i longitudinal, així com contribuir a la visibilització i divulgació d'aquestes malalties.

Els models d'atenció coordinada, basats en equips multidisciplinaris, amb una transició fluida entre etapes pediàtrica i adulta, poden reduir el temps diagnòstic, millorar l'assessorament genètic i facilitar l'accés a assajos clínics i a noves teràpies (20). Aquest

enfocament ha d'estar centrat en el pacient, incorporant les especialitats necessàries segons les comorbiditats i responent a les seves necessitats mèdiques, emocionals i socials.

5.2.2. Diversitat fenotípica i classificació clínica

La classificació clínica continua sent una eina fonamental en l'avaluació inicial de les DHR, ja que orienta la sospita diagnòstica, guia la selecció de proves i facilita la interpretació dels resultats moleculars (30). Aquestes malalties abasten un ampli espectre, des de formes de ceguesa greu i precoç, com l'amaurosi congènita de Leber (ACL), fins a quadres d'inici adult més lleus, com algunes distròfies maculars (31).

Tot i l'ús creixent de classificacions basades en el gen causant (16,32), l'avaluació fenotípica continua sent indispensable, especialment quan l'estudi molecular no s'ha realitzat o no és conclouent (24,30). Els criteris classificatoris més utilitzats inclouen:

- **Àrea de la retina afectada:** perifèrica, macular o generalitzada.
- **Fotoreceptors implicats:** bastons, cons o ambdós.
- **Edat d'inici:** pediàtrica o adulta.
- **Evolució:** estacionària o progressiva.
- **Manifestacions extraoculars:** absents (no sindròmiques) o presents (sindròmiques).

La simptomatologia inicial pot orientar el diagnòstic: la nictalopia suggereix afectació de bastons, mentre que la fotofòbia i la discromatòpsia apunten a disfunció de cons. La pèrdua de visió central

o els escotomes paracentrals són típics de les distròfies maculars (p. ex., malaltia de Stargardt o de Best), mentre que la reducció progressiva del camp perifèric és característica de les degeneracions de bastons (p. ex., RP) (30). Tot i que habitualment l'afectació és **bilateral i simètrica**, poden existir asimetries en fases inicials o en casos de mosaïcisme o inactivació preferencial del cromosoma X (33).

Les **formes no sindròmiques**, definides per una afectació exclusivament ocular, representen aproximadament el 70–80% dels casos (31). Entre les principals destaquen:

- **RP:** forma més prevalent. Debut infantil o adolescent amb nictalopia i constricció progressiva del camp perifèric, que pot evolucionar cap a visió túnel i, posteriorment, afectació central (34). Inclou formes sectorials i clàssiques (Figura 6).
- **ACL:** forma més precoç i habitualment la més severa. Baixa visió des del naixement, nistagme, hipermetropia i resposta electroretinogràfica pràcticament abolida (35).
- **Ceguesa nocturna estacionària congènita (CNEC):** distròfia no progressiva amb nictalopia des de la infància i preservació relativa de la visió central. Inclou subtipus amb disfunció dels fotoreceptors (Riggs) o de les bipolars (Schubert-Bornschein) i formes associades com *fundus albipunctatus* i malaltia d'Oguchi.
- **Distròfia de cons i cons-bastons (DC/DCB):** pèrdua bilateral de visió central en la infància o joventut, amb fotofòbia i discromatòpsia; a les DCB s'hi afegeixen nictalopia i pèrdua perifèrica precoç.

- **Acromatòpsia:** disfunció congènita dels cons (Figura 6), clàssicament estacionària, amb nistagme, fotofòbia i discromatòpsia marcada; funció dels bastons preservada i, per tant, visió nocturna conservada.
- **Distròfies maculars:**
 - ❖ **Malaltia de Stargardt:** principal maculopatia juvenil d'origen genètic. Es caracteritza per una pèrdua progressiva de la visió central, amb edat d'inici variable, marcada heterogeneïtat fenotípica i acumulació de lipofuscina a l'EPR.
 - ❖ **Malaltia de Best:** expressivitat clínica i evolució variables, amb risc de neovascularització subretinal.
 - ❖ **Distròfia en patró:** caracteritzada per dipòsits de lipofuscina a l'EPR amb configuracions reticulars o geomètriques, d'inici típicament adult i evolució lenta amb afectació central.
- **Coroiderèmia:** lligada a l'X, amb afectació progressiva d'EPR, retina i coroides. En homes, nictalopia en la infància o l'adolescència i pèrdua perifèrica lenta durant dècades, amb preservació macular fins a fases avançades (36).
- **Retinòsquisi juvenil lligada a l'X:** separació de capes retinals a la màcula amb disminució d'AV i escotomes centrals des de la infància. Pot complicar-se amb hemorràgies vítries i desprendiment de retina per esquinçaments en zones de retinòsquisi perifèrica.

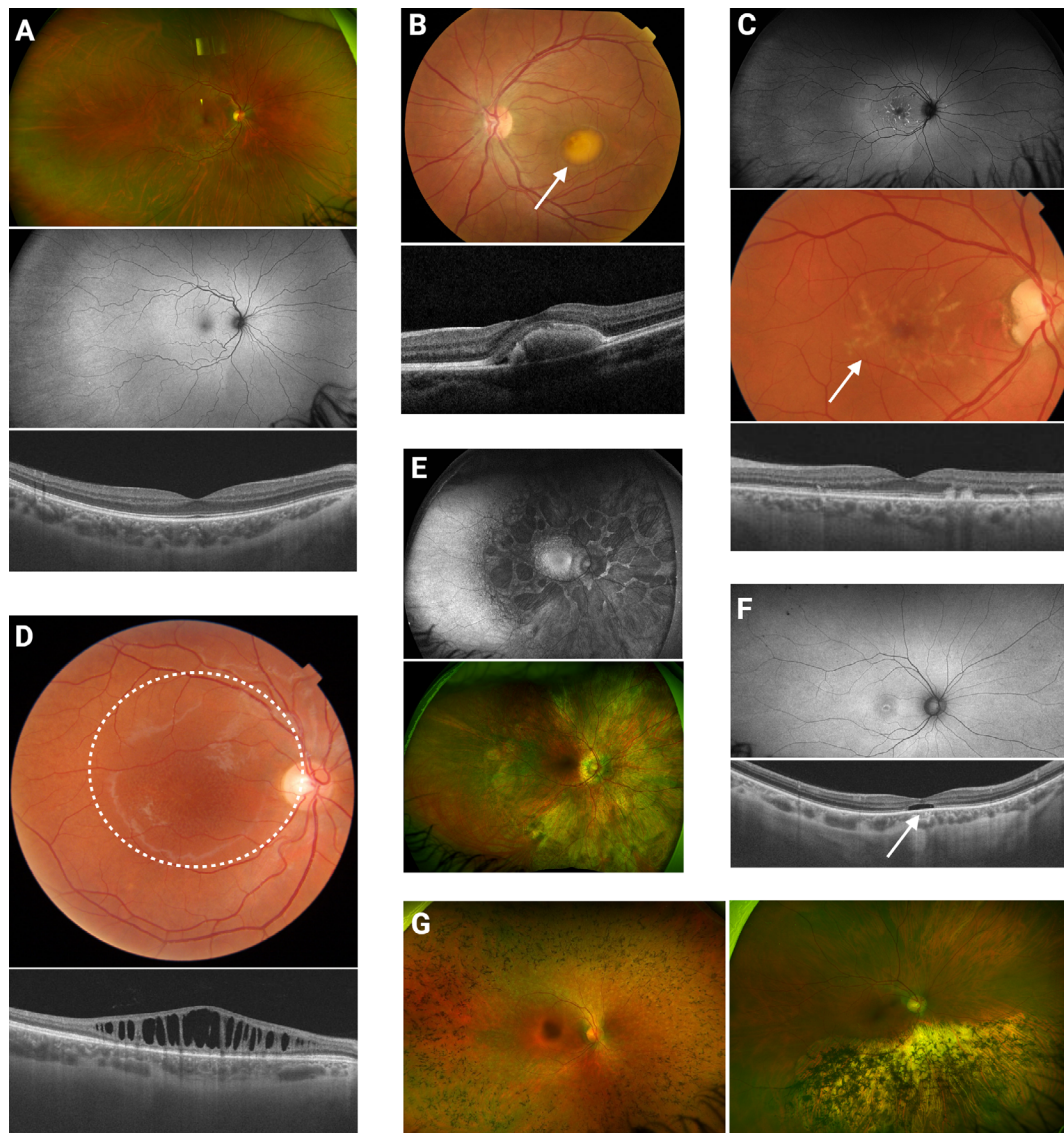


Figura 6. Característiques multimodals de formes no sindròmiques de DHR. **A)** Retina sana. **B)** Malaltia de Best: dipòsit groguenc subfoveal de tipus *egg-yolk* (fletxa). **C)** Malaltia de Stargardt: *flecks* hiperautofluorescents per acumulació de lipofuscina a l'EPR (fletxa) i atròfia macular. **D)** Retinòsqvisi juvenil: patró macular en radis de roda (cercle discontinu), amb separació de capes internes de la retina i cavitats intraretinals visibles a l'OCT. **E)** Coroiderèmia: atròfia extensa de l'EPR i de la coriocapil·lar, amb illots confluents de despigmentació i àrees hipoautofluorescents progressives.

F) Acromatòpsia: hipoautofluorescència central i discontinuïtat de la línia de l'el·lipsoide a l'OCT (fletxa), indicativa de pèrdua selectiva de cons. **G)** Retinosi pigmentària: forma clàssica (esquerra), amb espícules pigmentàries, atenuació vascular i pal·lidesa papil·lar, i forma sectorial (dreta), amb afectació predominant de la retina inferior. *Figura original amb imatges clíniques representatives de pacients.*

Altres DHR no sindròmiques menys prevalents inclouen la distròfia macular de Sorsby; les vitreoretinopaties hereditàries, amb anomalies del vitri i risc elevat de desprendiment de retina; l'atròfia girata, secundària a un defecte en el metabolisme de l'ornitina; i el monocromatisme de cons blaus, una forma lligada a l'X amb afectació selectiva dels cons L i M (36).

Les **formes sindròmiques**, que representen aproximadament entre un 20% i un 30% dels casos, es caracteritzen per una afectació multisistèmica. La majoria deriven de disfuncions del cili primari, present en gairebé tots els tipus cel·lulars i imprescindible per al transport intracel·lular (37). Quan aquest sistema es veu alterat, la disfunció retinal s'associa freqüentment a manifestacions auditives, neurològiques, renals o endocrines (38). Entre les DHR sindròmiques més freqüents destaquen:

- **Síndrome d'Usher:** la més prevalent, combina RP amb hipoacúsia neurosensorial congènita, amb o sense disfunció vestibular. Es distingeixen tres subtipus (I, II i III) segons la severitat auditiva, la funció vestibular i l'edat d'inici.

- **Síndrome de Bardet-Biedl:** distròfia retinal d'inici precoç, habitualment amb fenotip de RP, associada a obesitat, polidactília postaxial, hipogonadisme, disfunció renal i afectació cognitiva. Presenta marcada variabilitat clínica entre individus i famílies.
- **Síndrome de Senior-Løken:** combina distròfia retinal d'inici precoç (ACL o RP) amb nefronoptisi, sovint infradiagnosticada en fases inicials, que pot evolucionar cap a insuficiència renal progressiva.
- **Síndrome de Joubert:** caracteritzada per hipoplàsia o agenèsia del vermis cerebel·lós, amb hipotonia, atàxia i retard en el desenvolupament, així com alteracions oculars, entre les quals destaca la distròfia retinal.

Altres formes sindròmiques més minoritàries inclouen la síndrome d'Alström, la d'Stickler, l'albinisme oculocutani i el pseudoxantoma elàstic (36).

El fenotip de les DHR s'inscriu en un espectre **clínic continu**, en el qual sovint s'identifiquen formes intermèdies. En alguns casos, fins i tot s'observa una evolució d'una presentació inicialment no sindròmica cap a manifestacions sistèmiques (37,39). Aquesta naturalesa dinàmica, juntament amb la marcada variabilitat interindividual i la superposició fenotípica (Figura 7), dificulta que cap sistema classificatori en pugui reflectir de manera exhaustiva la complexitat d'aquestes malalties (31).

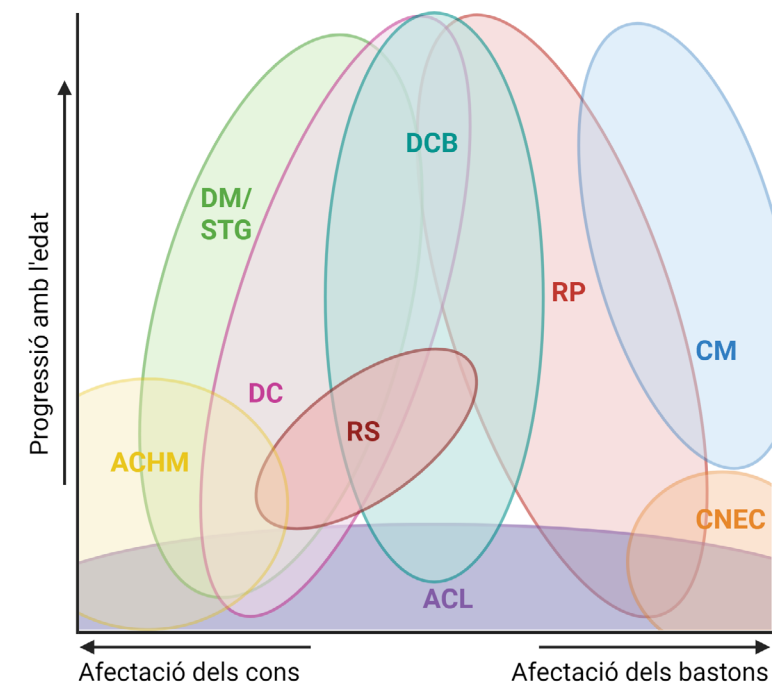


Figura 7. Superposició fenotípica de les principals formes no sindròmiques de DHR. Representació esquemàtica segons el tipus cel·lular afectat (cons o bastons) i la progressió amb l'edat. Les àrees de superposició són orientatives i expressen una gradació qualitativa, no quantitativa; cada cas clínic s'ha d'abordar individualment, i la figura s'ha d'entendre com una guia general i no com un patró fix. ACHM, acromatòpsia; ACL, amaurosi congènita de Leber; CM, coroiderèmia; CNEC, ceguesa nocturna estacionària congènita; DC, distròfia de cons; DCB, distròfia de cons-bastons; DM/STG, distròfies maculars/malaltia de Stargardt; RP, retinosi pigmentària; RS, retinòsquisi juvenil. *Inspirada en Estrada-Cruzcano et al. (2012) (40).*

Davant l'heterogeneïtat clínica de les DHR, l'enfocament diagnòstic actual requereix la integració de múltiples criteris (Taula 1) i un seguiment prolongat en el temps, sovint de caràcter multidisciplinari. Aquesta necessitat és especialment rellevant en pacients amb afectació

precoç o fenotips inicialment dubtosos, on la definició clínica pot canviar amb l'evolució natural de la malaltia. A més, la presència de complicacions oculars intercurrents, com cataractes o desprendiments de retina, pot interferir en la valoració funcional, agreujant les dificultats diagnòstiques (16). Tot plegat justifica un abordatge estructurat, flexible i adaptatiu al llarg del temps.

Taula 1. Classificació clínica de les DHR segons la presència de manifestacions extraoculars i la topografia predominant de l'afectació de la retina. *Taula original.*

	Topografia predominant	Entitat clínica	Evolució clínica	Herència	Edat d'inici
No sindròmica	Perifèrica	CNEC	Estacionària	XL/AD/AR	Infància
		RP/distròfia de bastons	Progressiva	AR/AD/XL	Infància/ joventut
	Macular (central)	Acromatòpsia	Estacionària	AR	Infància
		Malaltia de Stargardt	Progressiva	AR	Infància a edat adulta
		Malaltia de Best	Progressiva	AD	Infància a edat adulta
		Retinòsquisi juvenil	Progressiva	XL	Infància
	Generalitzada	ACL	Progressiva	AR	Naixement
		Coroiderèmia	Progressiva	XL	Adolescència
		Distròfia de cons-bastons	Progressiva	AR/AD	Infància/ adolescència
Sindròmica	Perifèrica	Síndrome d'Usher	Progressiva	AR	Infància/ adolescència
		Síndrome de Bardet–Biedl	Progressiva	AR	Infància
	Generalitzada	Síndrome de Joubert	Progressiva	AR	Naixement/ infància
		Síndrome de Senior-Løken	Progressiva	AR	Infància

Abreviatures: ACL: Amaurosi congènita de Leber; AD: autosòmica dominant; AR: autosòmica recessiva; CNEC: ceguesa nocturna estacionària congènita, RP: retinosi pigmentària; XL: lligada al cromosoma X.

5.2.3. Diagnòstic clínic i funcional

L'abordatge diagnòstic de les DHR segueix un procés estructurat que integra anamnesi detallada, exploració oftalmològica, tècniques d'imatge, proves funcionals i estudi molecular (Figura 8). Aquest itinerari permet avançar des d'una sospita inicial —motivada per **síntomes** visuals com nictalopia, fotofòbia o pèrdua visual progressiva, per **troballes fortuïtes** en revisions oftalmològiques de rutina o per **antecedents familiars**— fins a establir un diagnòstic de precisió.

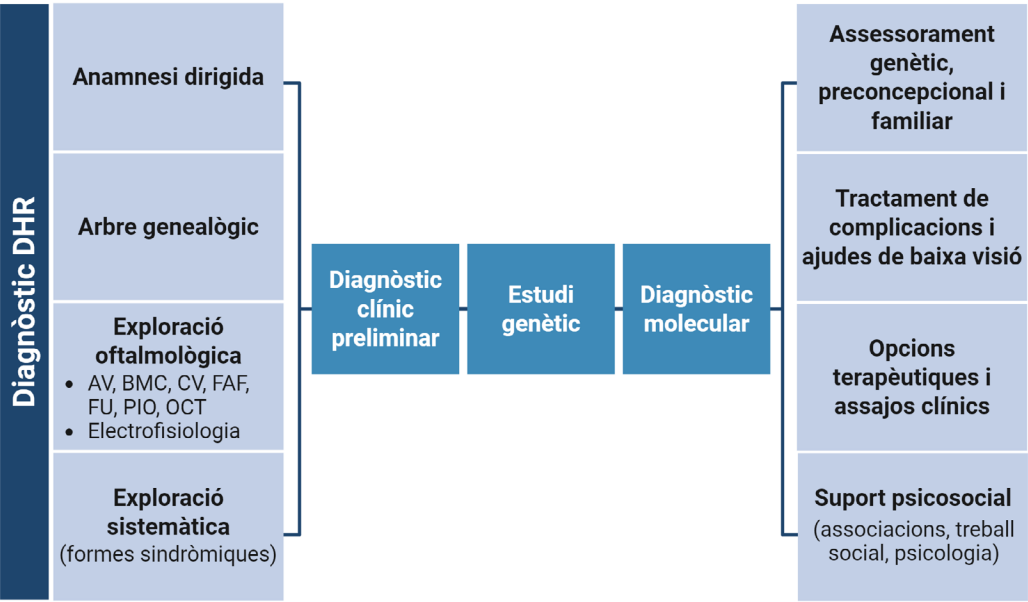


Figura 8. Esquema del procés diagnòstic en les DHR: avaluació clínica, estudi genètic i diagnòstic molecular, que permeten implementar accions individualitzades. *Abreviatures:* AV: agudesa visual; BMC: biomicroscòpia; CV: camp visual; FAF: autofluorescència; FU: fons d'ull; PIO: pressió intraocular; OCT: tomografia de coherència òptica. *Figura original.*

Anamnesi i història familiar

L'**anamnesi dirigida** és essencial per identificar manifestacions clíniques subtils, difícils de descriure pel pacient, com dificultats d'orientació en baixa lluminositat, problemes de conducció nocturna o tendència a ensopegar. En pediatria, el nistagme, la descoordinació motriu i el baix rendiment escolar poden ser indicadors precoços de dèficit visual.

Segons Stephenson et al. (2022) (41), la sospita de DHR es reforça davant de:

- inici dels símptomes abans dels 40 anys;
- afectació bilateral i simètrica;
- antecedents familiars;
- evolució progressiva;
- signes oculars (p. ex., cataracta subcapsular posterior juvenil) o sistèmics (com hipoacúsia neurosensorial o polidactília) associats.

En canvi, la simptomatologia unilateral o marcadament asimètrica i l'inici després dels 60 anys són més típics de patologies adquirides, com la degeneració macular associada a l'edat (DMAE), inflamacions oculars cròniques o lesions traumàtiques, que requereixen una avaluació acurada abans de sol·licitar proves genètiques.

La recollida d'**antecedents familiars** i la detecció de consanguinitat són fonamentals. L'elaboració d'un **arbre genealògic** facilita la identificació del patró d'herència i la selecció de l'individu

idoni per a l'estudi molecular (20). Paral·lelament, cal descartar diagnòstics diferencials que poden simular una DHR, com la retinopatia autoimmune, les uveïtis posteriors (infeccioses o no) i la toxicitat retinal per fàrmacs (p. ex., hidroxicloroquina o deferoxamina). També s'han de considerar antecedents de prematuritat o trastorns neurològics (41).

En fases avançades, certes malalties adquirides poden presentar signes funduscòpics similars a les DHR, com espícules pigmentàries per migració de cèl·lules de l'EPR, pal·lidesa del disc o atenuació arteriolar. Aquests casos requereixen una valoració clínica i bioquímica exhaustiva abans d'atribuir el quadre a una DHR.

Exploració oftalmològica i proves d'imatge

L'avaluació inicial ha d'incloure AV i pressió intraocular (PIO). La **biomicroscòpia** pot revelar cataractes subcapsulars posteriors —freqüents en RP—, opacitats vítries o altres signes de cronicitat. L'**examen de fons d'ull** és indispensable per detectar espícules pigmentàries, atròfia macular o atenuació vascular; no obstant això, pot ser normal en fases inicials, fet que reforça la necessitat d'una lectura experta i d'un seguiment evolutiu.

La **tomografia de coherència òptica (OCT)** és l'eina de referència per estudiar la retina amb resolució quasi histològica (2). Permet identificar alteracions específiques segons el fenotip i l'estadi evolutiu, com la disrupció de la membrana limitant externa o de la línia de l'el·lipsoide —indicatives de degeneració de fotoreceptors—, així com edema macular cistoide, retinòsqusi macular o traccions

vitreoretinals. En DHR associades a *CRB1* és típic l'engruiximent i la desorganització laminar de les capes internes de la retina.

L'**autofluorescència (FAF)** reflecteix el contingut de lipofuscina de l'EPR. La hipoautofluorescència indica atrofia de l'EPR i dels fotoreceptors, i es pot observar a l'àrea macular en la malaltia de Stargardt o a la perifèria en casos de RP. En canvi, la hiperautofluorescència suggereix acumulació de lipofuscina i es manifesta típicament en lesions perifoveals (*flecks*, Stargardt) o en d'anell hiperautofluorescent (RP), que delimita el front de degeneració retinal. Tècniques avançades com l'OCT-angiografia o l'òptica adaptativa aporten informació addicional sobre la perfusió retinal i la morfologia dels fotoreceptors, amb una resolució gairebé cel·lular (2).

Proves funcionals

Les proves funcionals mesuren directament la integritat retinal. La **campimetria** estàtica (estratègies 10-2 o 24-2) i la cinètica (Goldmann) delimiten i quantifiquen escotomes i en permeten el seguiment. L'**electroretinografia de camp complet (ffERG)** és clau per discriminar si l'afectació és de bastons, cons o mixta, i detectar activitat residual en fases avançades. L'**electroretinografia multifocal (mfERG)** avalua la funció macular i és útil en Stargardt, Best o RP avançada.

Altres proves com els potencials visuals evocats o l'electrooculograma tenen un paper complementari en el diagnòstic diferencial, especialment en patologia del nervi òptic o en entitats concretes com la malaltia de Best.

Estudi genètic

L'**estudi genètic** és un pas essencial davant qualsevol sospita de DHR, un cop descartades altres causes adquirides o neurològiques. Aquest estudi molecular culmina el procés diagnòstic i, en cas de confirmació, permet validar o redefinir la sospita clínica, establir el patró d'herència, orientar l'assessorament reproductiu i determinar l'elegibilitat per a teràpies dirigides (18). En el context de les DHR es poden dur a terme diverses modalitats d'estudi genètic (Figura 9). Aquesta tesi se centra principalment en els estudis diagnòstics —adreçats al pacient afectat (cas índex)— i, en alguns casos, en estudis de confirmació. Altres modalitats (presimptomàtic, segregació, portadors) tenen un paper complementari, especialment en l'àmbit familiar i reproductiu.

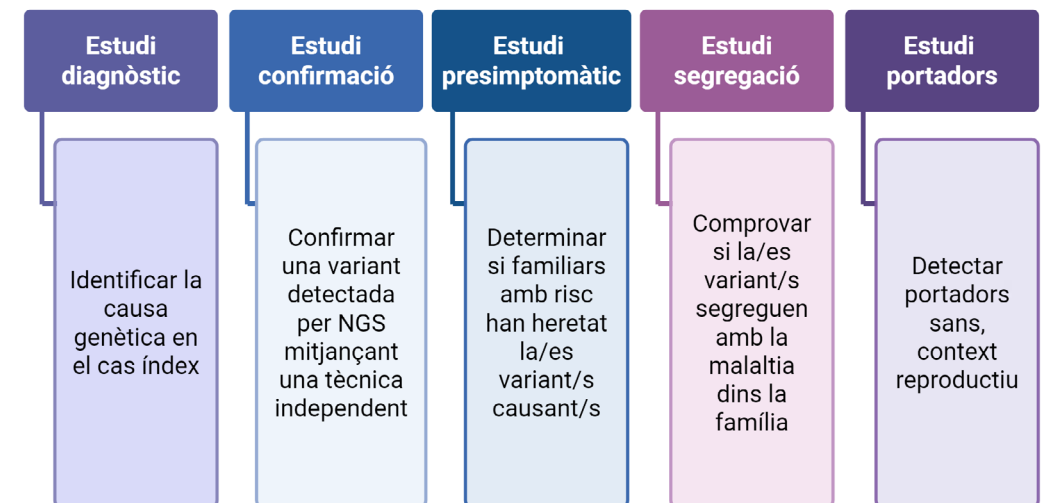


Figura 9. Tipus principals d'estudi genètic en l'àmbit clínic, segons l'objectiu i el context assistencial. *Figura original.*

Tots els estudis genètics han de realitzar-se en el marc d'un **assessorament genètic**, amb **consentiment informat** i discussió prèvia de les possibles implicacions personals i familiars (20,42). La interpretació dels resultats ha de ser multidisciplinària, amb implicació de clínics i genetistes, i contextualitzada, i la comunicació amb el pacient, clara i empàtica (43).

En síntesi, el diagnòstic de les DHR requereix una **aproximació transversal** que integri anamnesi, exploració experta, tecnologies d'imatge i proves funcionals, culminades per una interpretació genètica rigorosa. La qualitat del procés depèn, en última instància, de l'expertesa clínica i de l'adaptació personalitzada a cada pacient (16,20).

5.3. Bases genètiques de les DHR

L'anàlisi de les DHR requereix anar més enllà de la caracterització fenotípica per comprendre'n les causes moleculars subjacents. La identificació del gen *RHO* com a primer gen associat a la RP, l'any 1990 (44), va marcar l'inici d'una nova etapa en l'estudi d'aquestes malalties. Des de llavors, el coneixement del paisatge genètic s'ha expandit de manera exponencial, amb la identificació de 338 gens causants de DHR (RetNet, <https://sph.uth.edu/retnet/>, consulta del 6 de juliol de 2025). Aquest avenç ha consolidat la genètica com a pilar central, tant en el diagnòstic com en el desenvolupament de teràpies personalitzades.

Les DHR mostren una heterogeneïtat genètica excepcional, tant pel gran nombre de gens implicats com per la diversitat de variants i mecanismes moleculars que les originen. Encara que la majoria responen a un model monogènic amb herència mendeliana clàssica, cada vegada es coneixen més excepcions, com l'herència digènica o oligogènica, el mosaïcisme i la influència de factors modificadors, que introdueixen un nivell addicional de complexitat interpretativa (45,46).

Aquest apartat aprofundeix en els fonaments moleculars que expliquen aquesta complexitat: els gens implicats i les seves funcions, els tipus de variants i els mecanismes de patogenicitat, els patrons d'herència i la correlació genotip-fenotip. També s'hi aborden les implicacions terapèutiques derivades d'aquest coneixement, clau per entendre la fisiopatologia, interpretar la variabilitat clínica i avançar en

la resolució de casos molecularment no resolts, amb l'objectiu final de consolidar la medicina de precisió.

5.3.1. Gens implicats i funcions moleculars

Els gens associats a DHR participen en processos bàsics per al funcionament i la supervivència dels fotoreceptors i de l'EPR. Alguns codifiquen proteïnes de la cascada de **fototransducció**, com *GNAT1*, *PDE6B* o *RHO* (Figura 10). Quan aquestes proteïnes perden la seva funció, la resposta lumínica dels bastons queda compromesa, provocant nictalopia i pèrdua de visió perifèrica sovint abans que s'hi detectin alteracions estructurals (11). Per aquest motiu, aquestes formes poden passar desapercebudes en una exploració morfològica convencional.

Altres gens, com *LRAT*, *RDH12* o *RPE65*, intervenen en el **cicle visual**. Les variants en *LRAT* i *RPE65* bloquegen la síntesi de l'11-*cis*-retinal i provoquen una disfunció visual greu des de les primeres etapes, tot i la preservació estructural inicial dels fotoreceptors. Aquesta característica ha estat determinant per al desenvolupament de teràpies gèniques, ja que l'eficàcia d'aquests tractaments depèn de l'existència de cèl·lules viables en les quals transferir el gen funcional (47). En canvi, les variants en *RDH12* s'associen habitualment a una degeneració estructural més precoç, fet que en pot limitar el potencial terapèutic (11).

Gens com *CEP290*, *IFT140* o *RPGR* tenen un paper central en el **transport ciliar**, regulant el trànsit intracel·lular entre el SE i SI (37). Quan aquest procés es veu alterat, la degeneració progressiva dels fotoreceptors pot limitar-se a la retina o bé formar part de ciliopaties sistèmiques, com les síndromes de Joubert o Bardet-Biedl (38).

També hi ha gens implicats en la **sinapsi retinal**, com *CABP4*, *CACNA1F* i *NYX*, que regulen la transmissió del senyal elèctric entre fotoreceptors i cèl·lules bipolars (36). Quan aquesta connexió falla, la llum és captada, però el senyal no es transmet de manera eficient a les neurones postsinàptiques, donant lloc a fenotips com la CNEC (34).

Una proporció significativa de gens relacionats amb DHR intervenen en processos cel·lulars més generals, agrupats sota el concepte d'**homeòstasi cel·lular**. Entre aquests hi ha els implicats en la fagocitosis dels discs del SE per part de l'EPR (p. ex., *MERTK*), en la protecció contra l'estrès oxidatiu (p. ex., *CERKL*) o en el manteniment de l'arquitectura i la polaritat cel·lular (p. ex., *CRB1*).

Finalment, alguns gens participen en la **regulació gènica** mitjançant mecanismes com l'*splicing* (p. ex., *PRPF31*, *SNRNP200*) o el control transcripcional. Malgrat la seva expressió generalitzada en múltiples teixits, les variants en aquests gens poden tenir un impacte predominant a la retina, probablement a causa de la seva renovació cel·lular constant, l'elevada demanda metabòlica i l'exposició permanent a estrès lumínic, factors que la fan especialment vulnerable a qualsevol disfunció molecular (5).

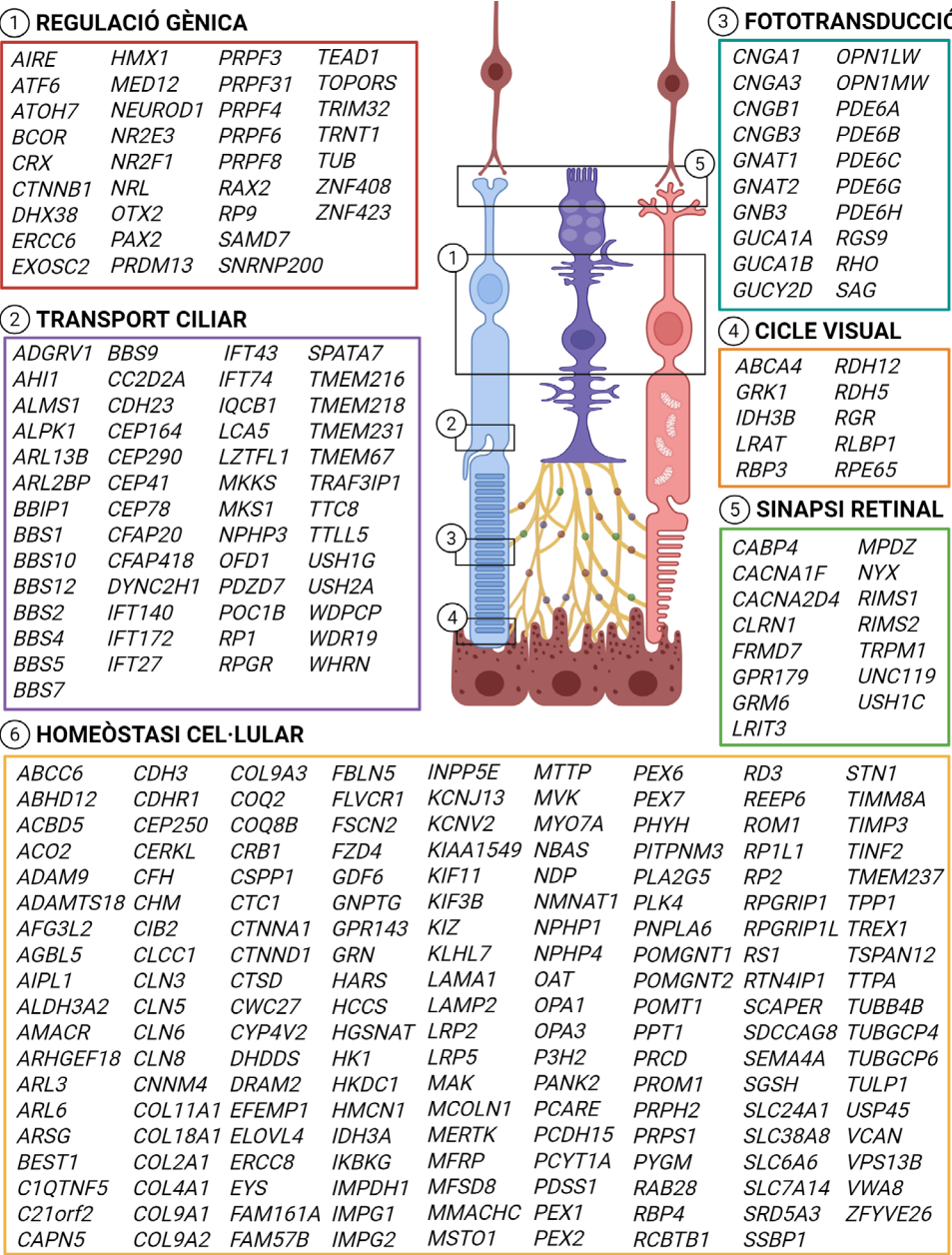


Figura 10. Classificació funcional dels gens associats a DHR en sis categories principals: ① regulació gènica, ② transport ciliar, ③ fototransducció, ④ cicle visual, ⑤ sinapsi retinal i ⑥ homeòstasi cel·lular. S’hi inclouen els gens seqüenciats a la cohort de l’Hospital Universitari de Bellvitge. *Figura original, inspirada en Verbakel et al. (2018) (34).*

Tanmateix, molts d’aquests gens presenten **pleiotropia funcional**, ja que intervenen simultàniament en diversos processos biològics. Per exemple, *ABCA4* —el gen més prevalent en DHR a Europa (25,48)— participa tant en el cicle visual com en la gestió lipídica al SE (17,49). De manera similar, *CRB1* intervé en la polaritat cel·lular i en la sinapsi, mentre que *CEP290* i *RPGR* tenen rols amplis en la morfologia, la senyalització i la dinàmica intracel·lular (39,50–52). Aquesta característica contribueix a la **variabilitat fenotípica** observada en pacients amb alteracions genètiques en un mateix gen, amb manifestacions que poden anar des de formes sindròmiques fins a maculopaties o RP.

Aquesta diversitat molecular i funcional explica tant l’heterogeneïtat clínica i genètica de les DHR com les dificultats per diagnosticar-les, classificar-les i establir correlacions genotip-fenotip. Per abordar aquesta complexitat, és essencial aprofundir en el paper de cada gen i en els mecanismes que en condicionen la patogenicitat.

5.3.2. Tipus de variants i mecanismes de patogenicitat

Les DHR poden ser causades per una àmplia varietat de variants genètiques que actuen a través de múltiples mecanismes moleculars. A diferència d’altres malalties mendelianes més homogènies, pràcticament tots els tipus de variants descrits —des de canvis puntuals fins a alteracions estructurals complexes— s’han associat a aquestes patologies. Aquestes variants poden alterar directament la proteïna codificada o interferir en processos reguladors i de processament del transcrit (21,25,53,54), incidint en qualsevol etapa

del flux d'informació genètica, des de la transcripció fins a la síntesi proteica (Figura 11). Comprendre aquests mecanismes és essencial per a la interpretació precisa de les variants detectades.

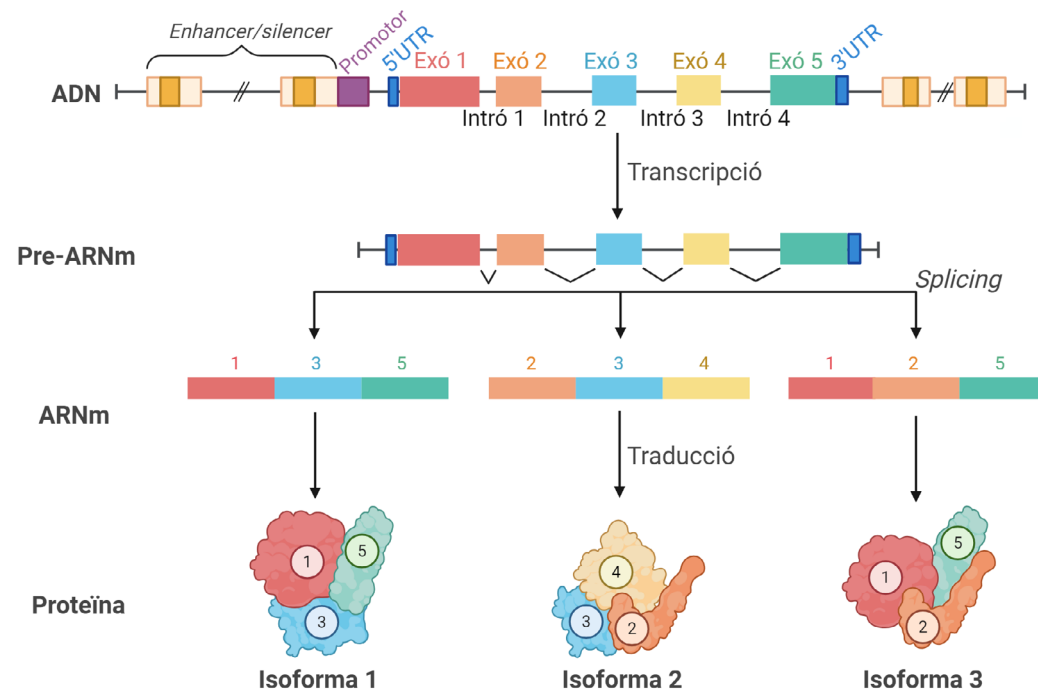


Figura 11. Esquema del flux d'informació genètica (ADN → ARN → proteïna) i de l'*splicing* alternatiu. A la part superior es mostra l'estructura d'un gen típic amb exons, introns i regions reguladores (*enhancers*, promotor, UTRs). Durant la transcripció es genera un pre-ARNm, processat per eliminar introns i unir exons mitjançant l'*splicing*. L'*splicing* alternatiu permet generar diversos ARNm madurs i isoformes proteiques a partir d'un mateix gen, fenomen especialment rellevant a la retina. *Figura adaptada de BioRender.*

A continuació es revisen els principals tipus de variants i els mecanismes pels quals esdevenen patològiques:

Variants codificants

Afecten directament les regions exòniques i modifiquen la seqüència de la proteïna resultant. Sovint són més fàcils d'interpretar pel seu impacte estructural o funcional directe:

- **Missense:** substitució d'un aminoàcid. Poden ser neutres o altament disruptives i constitueixen el tipus de variant més freqüent en DHR (25,54), especialment en *ABCA4*, on més del 60% de les variants descrites són *missense* (17).
- **Nonsense (*stop gain*):** introdueixen un codó de terminació prematur i generalment activen el mecanisme de degradació *nonsense-mediated decay* (NMD), evitant la síntesi de proteïnes truncades potencialment tòxiques. Són habituals en gens associats a formes recessives greus, com *USH2A* o *CEP290*.
- **Indels (insercions o delecions):** si la seva longitud no és múltiple de tres nucleòtids, desplacen el marc de lectura (*frameshift*) i generen proteïnes aberrants o truncades; si són *in-frame*, mantenen el marc però poden alterar la funció proteica. Sovint es detecten en *RPGR* o *RP1*.
- **Codons d'inici o terminació:** la pèrdua del codó d'inici (*start loss*) pot impedir la síntesi proteica, mentre que variants *stop loss* poden allargar la proteïna amb dominis anòmals, comprometent-ne l'estabilitat.

Variants d'*splicing*

L'*splicing* és el procés que elimina introns i uneix exons per generar un ARNm funcional (Figura 11). La retina, amb una de les taxes més altes d'*splicing* alternatiu de l'organisme, és especialment vulnerable a alteracions d'aquest mecanisme. Es calcula que entre el 15% i el 60% de les variants patogèniques en DHR interfereixen amb l'*splicing*, ja sigui de manera directa —modificant punts canònics d'unió— o indirecta —alterant elements reguladors que controlen la inclusió o exclusió d'exons (Figura 12) (55).

Els principals tipus són:

- **Llocs canònics:** variants no codificants localitzades a les posicions ± 1 i ± 2 de l'intró, imprescindibles per al reconeixement de la maquinària d'*splicing*. La seva alteració acostuma a provocar exclusió d'exons, retenció d'introns o activació de llocs críptics, sovint amb *frameshift* i degradació del transcrit per NMD (51,56). Exemple: *RPGR* c.1415-1G>A, que altera el lloc acceptor de l'intró 11 i provoca l'exclusió de l'exó 12, amb pèrdua de funció.
- **Intròniques profundes:** variants no codificants situades lluny dels exons (habitualment a més de 50 pb) que creen llocs donadors o acceptors aberrants i promouen la inclusió de pseudoexons. Exemples: *CEP290* c.2991+1655A>G i *USH2A* c.7595-2144A>G (18,57).
- **Exòniques:** variants codificants que poden alterar la seqüència de reconeixement de l'*splicing* o modificar elements reguladors

interns, com els potenciadors d'*splicing* exònics (ESE) (58). Exemple: *ABCA4* c.6342G>A, que elimina un ESE, activa un lloc aberrant i indueix la degradació del transcrit per NMD (59).

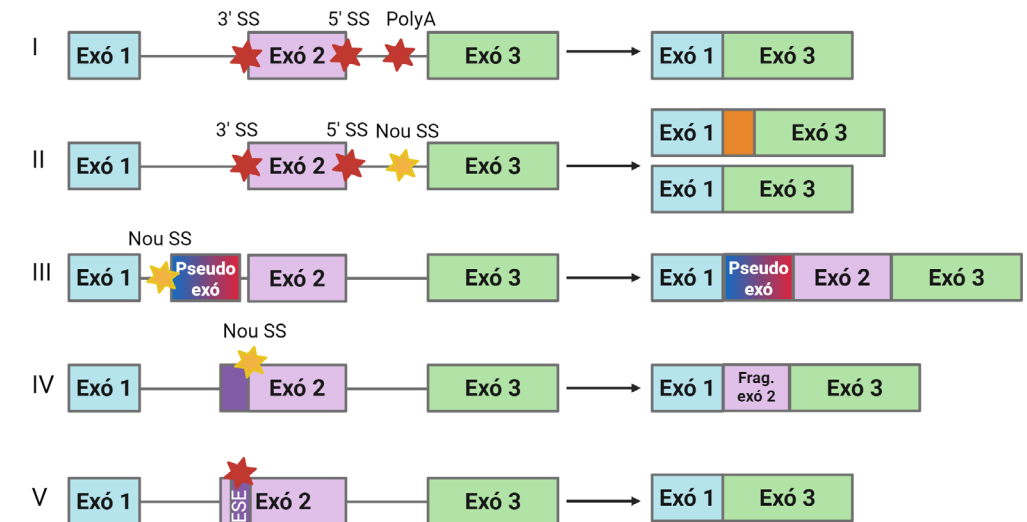


Figura 12. Principals mecanismes d'alteració del processament del transcrit en DHR. (I) Variants en llocs canònics que provoquen deleció d'un exó. (II) Variants que activen llocs d'*splicing* alternatius. (III) Variants intròniques profundes amb inclusió de pseudoexons. (IV) Variants exòniques que generen llocs aberrants d'unió. (V) Variants que alteren ESE i afavoreixen l'exclusió de l'exó afectat. Abreviatures: ESE: element potenciador d'*splicing* exònic; SS: punt d'*splicing*; PolyA: senyal de poliadenilació. Figura creada amb BioRender, adaptada de Abramowicz & Gos (2018) (55).

Variants en regions reguladores

Tradicionalment s'ha prioritzat l'estudi de les regions codificants perquè són les que codifiquen proteïna. No obstant això, cada vegada hi ha més evidència que variants en regions no codificants —com

intròniques profundes, promotors, UTRs o *enhancers*— poden afectar la transcripció, l'estabilitat o la traducció de l'ARNm, amb impacte en la producció proteica. Per exemple, una variant *upstream* del *GUCY2D* (c.-148T>C) ha demostrat reduir l'activitat transcripcional (53,60). Aquest tipus de troballes reforcen la necessitat d'incloure regions no codificants en estudis dirigits a pacients sense diagnòstic molecular concloent.

Variants estructurals

Les variants estructurals (*structural variants*, SVs), com delecions o duplicacions (*copy number variants*, CNVs), poden provocar tant pèrdua com guany de funció. Un exemple clàssic és la deleció homozigota de *NPHP1*, freqüent en la síndrome de Senior-Løken (61). Altres SVs menys habituals, com inversions o translocacions, poden interrompre gens clau o alterar-ne la seva regulació (62). També s'han descrit insercions d'elements mòbils, com l'element *Alu* en *RP1*, que introdueix centenars de nucleòtids addicionals i genera un codó de terminació prematur (63).

Mecanismes moleculars de patogenicitat

Un mateix tipus de variant pot tenir efectes molt diferents segons el context genètic (*cis/trans*), la dosi gènica, el domini proteic afectat, el tipus cel·lular o el nivell d'activitat residual.

Els mecanismes principals són:

1. **Pèrdua de funció:** absència o reducció significativa de l'activitat proteica.

- Variants **amorfes/nul·les:** originen absència total de proteïna funcional i s'associen sovint a formes recessives greus.
- Variants **hipomòrfiques:** conserven activitat parcial, habitualment amb fenotips més lleus o d'inici tardà. Exemple: *ABCA4* p.(Asn1868Ile), associada a baixa penetrància i efectes dependents del context (64).
- **Haploinsuficiència:** propietat de determinats gens en què una sola còpia funcional és insuficient per mantenir l'activitat normal. Exemple: variants en heterozigosi a *PRPF31* associades a RP dominant (65).

2. **Guany de funció:** la proteïna adquireix una activitat nova o exacerbada, que en alguns casos és tòxica per a la cèl·lula. Malgrat ser poc freqüent, és un mecanisme rellevant en certes DHR dominants. Exemple: variants de *CRX* que activen l'expressió aberrant de gens en fotoreceptors.
3. **Efecte dominant negatiu:** la proteïna alterada interfereix amb la funció de la proteïna normal, ja sigui formant complexos disfuncionals o segrestant l'al·lel salvatge. Exemple: certes variants de *RHO* es pleguen de manera anòmala i s'acumulen al reticle endoplasmàtic, comprometent la viabilitat cel·lular i causant RP.

En general, les variants associades a DHR tendeixen a ser **úniques per pacient o família**, sobretot en contextos recessius i poblacions genèticament heterogènies. No obstant això, existeixen **hotspots mutacionals** en alguns gens, com *CEP290* c.2991+1655A>G,

responsable de fins al 15% dels casos d'ACL (30,66), o la regió ORF15 de *RPGR*, amb elevada concentració de variants patogèniques, però difícil de seqüenciar amb tècniques convencionals (67).

5.3.3. Patrons d'herència i correlació genotip-fenotip

Tot i ser tradicionalment considerades malalties mendelianes, les DHR sovint desafien els patrons hereditaris clàssics (31). La manca de correlació directa entre genotip i fenotip, sumada a mecanismes atípics com el mosaïcisme, la penetrància incompleta, l'expressivitat variable o l'herència digènica, obliguen a adoptar un enfocament diagnòstic flexible i contextualitzat.

Aproximadament el 60% dels casos de DHR segueixen un patró d'herència **autosòmic recessiu (AR)**, en què la malaltia es manifesta quan l'individu hereta dues còpies alterades del mateix gen. Gens com *ABCA4*, *CERKL*, *CNGB1*, *EYS* o *USH2A* són responsables d'una part substancial dels diagnòstics. Sovint no hi ha antecedents familiars, ja que els progenitors són portadors asimptomàtics. Aquestes formes acostumen a presentar un inici precoç i un pronòstic més greu, tot i que la gravetat pot variar segons el gen, el tipus de variant i altres factors genètics o epigenètics (17,25,54).

Els casos amb herència **autosòmica dominant (AD)** representen aproximadament entre el 15% i el 25% i tenen una rellevància clínica i familiar considerable, ja que una sola còpia alterada és suficient per causar malaltia (36). Els gens més freqüentment implicats són *BEST1*,

CRX, *PRPF31*, *PRPH2* i *RHO*. Aquest patró es caracteritza principalment per dos fenòmens:

- **Penetrància incompleta:** com en *PRPF31*, on la dosi funcional de proteïna pot compensar parcialment la pèrdua d'activitat, donant lloc tant a individus afectats com a portadors asimptomàtics dins de la mateixa família (65).
- **Expressivitat variable:** com en variants de *RHO*, capaces de generar tant formes típiques de RP com formes sectorials de progressió més lenta (31).

Aquests fenòmens expliquen que alguns casos puguin semblar esporàdics o que el diagnòstic es retardi en absència d'antecedents familiars evidents.

L'herència **lligada al cromosoma X (XL)** representa prop del 10% dels casos de DHR (25). En gens com *CHM*, *RPGR*, *RP2* o *RS1*, els homes —amb una sola còpia del cromosoma X— presenten fenotips més precoços i severs, mentre que les dones poden ser portadores asimptomàtiques o manifestar formes atenuades en funció de la inactivació preferencial del cromosoma X (33,68). Així, algunes portadores de variants en *RPGR* desenvolupen una RP típica, mentre que d'altres romanen pràcticament asimptomàtiques (46,52).

En casos molt minoritaris s'han descrit formes amb **herència mitocondrial**, generalment associades a síndromes sistèmics on la retina és només una part d'un espectre clínic més ampli (36).

Més enllà dels patrons d’herència convencionals, les DHR també es veuen influïdes per mecanismes menys intuïtius:

- **Mosaïcisme:** pot ser somàtic, quan la variant només és present en una fracció de cèl·lules i causa fenotips parcials o atípics; o germinal, quan afecta només les cèl·lules germinals i pot donar lloc a descendència afectada de progenitors aparentment sans.
- **Herència digènica o oligogènica:** la interacció de variants en més d’un gen és necessària per generar el fenotip (45). Un exemple clàssic és la doble heterozigosi en *PRPH2* i *ROM1*, capaç de causar RP mentre que cadascuna de les variants per separat és asimptomàtica o de penetrància reduïda. De manera similar, variants combinades en *CDH23* i *PCDH15* poden originar la síndrome d’Usher tipus I (69,70).

Aquests mecanismes compliquen el diagnòstic de les DHR: lluny del model monogènic en què una sola variant explica el fenotip, aquest sovint resulta de múltiples factors moduladors. Així i tot, en alguns gens s’han establert correlacions genotip-fenotip relativament consistents que poden orientar el diagnòstic clínic (Taula 2). Per exemple, variants en *CHM* i *RS1* s’associen gairebé sempre a coroiderèmia i retinòsquisi juvenil, respectivament, mentre que variants en *BEST1* es relacionen majoritàriament amb malaltia de Best. En altres casos, el fenotip depèn de la localització intragènica de la variant: variants en *USH2A* poden causar tant la síndrome d’Usher tipus II com una RP no sindròmica

(71), i en *RPGR*, la regió ORF15 s’ha associat a DCB o a RP segons la posició de la variant (72).

Taula 2. Correlació genotip-fenotip i diagnòstics diferencials
dels 20 gens més freqüents en DHR adultes (25). *Taula original.*

Gen	Correlació clínica clàssica	Herència	Fenotips alternatius
<i>ABCA4</i>	Malaltia de Stargardt	AR	DC, DCB, RP
<i>USH2A</i>	Síndrome d’Usher tipus II	AR	RP no sindròmica
<i>RPGR</i>	RP	XL	DC, DCB, distròfia macular
<i>RHO</i>	RP o RP sectorial	AD	CNEC
<i>BEST1</i>	Malaltia de Best Bestrofinopaties	AD AR	RP, distròfia macular, viteliforme adulta
<i>EYS</i>	RP	AR	DCB
<i>CRB1</i>	Distròfia macular	AR	ACL, RP
<i>PRPH2</i>	Distròfia macular / en patró	AD	ACL, RP
<i>RS1</i>	Retinòsquisi juvenil	XL	-
<i>CHM</i>	Coroiderèmia	XL	RP
<i>PRPF8</i>	RP	AD	-
<i>BBS1</i>	Síndrome de Bardet-Biedl	AR	RP no sindròmica
<i>RPE65</i>	ACL	AR	RP
<i>CEP290</i>	Síndrome de Joubert	AR	ACL, RP, Senior-Løken
<i>PRPF31</i>	RP (penetrància incompleta)	AD	-
<i>CNGA1</i>	RP	AR	-
<i>COL2A1</i>	Síndrome d’Stickler	AD	-
<i>MYO7A</i>	Síndrome d’Usher tipus I	AR	DHR no sindròmiques
<i>PROM1</i>	Distròfia Stargardt-like	AR	DC, DCB, RP
<i>RP1</i>	RP	AR / AD	DC

Nota: Les correlacions poden variar segons context clínic i estudis publicats, i no són excloents.

Una particularitat destacada de les DHR és la seva marcada variabilitat fenotípica, ja analitzada anteriorment en relació amb la pleiotropia funcional de molts gens. Aquesta diversitat es veu modulada pel tipus i la localització de la variant, factors epigenètics, elements reguladors no codificants, haplotips i interaccions gen-gen. En *ABCA4*, per exemple, s’ha proposat una **jerarquia al·lèlica** que classifica les variants en “lleus”, “moderades” o “greus” segons el seu

impacte funcional (56), fet que contribueix a explicar el seu ampli espectre fenotípic, que inclou malaltia de Stargardt, DCB, RP i formes generalitzades d'inici precoç (64,73). De manera similar, *CEP290* pot donar lloc tant a ACL com a síndrome de Joubert. A la inversa, un mateix fenotip clínic, com la RP, pot derivar d'alteracions en més de 90 gens amb mecanismes i patrons hereditaris específics (Figura 13).

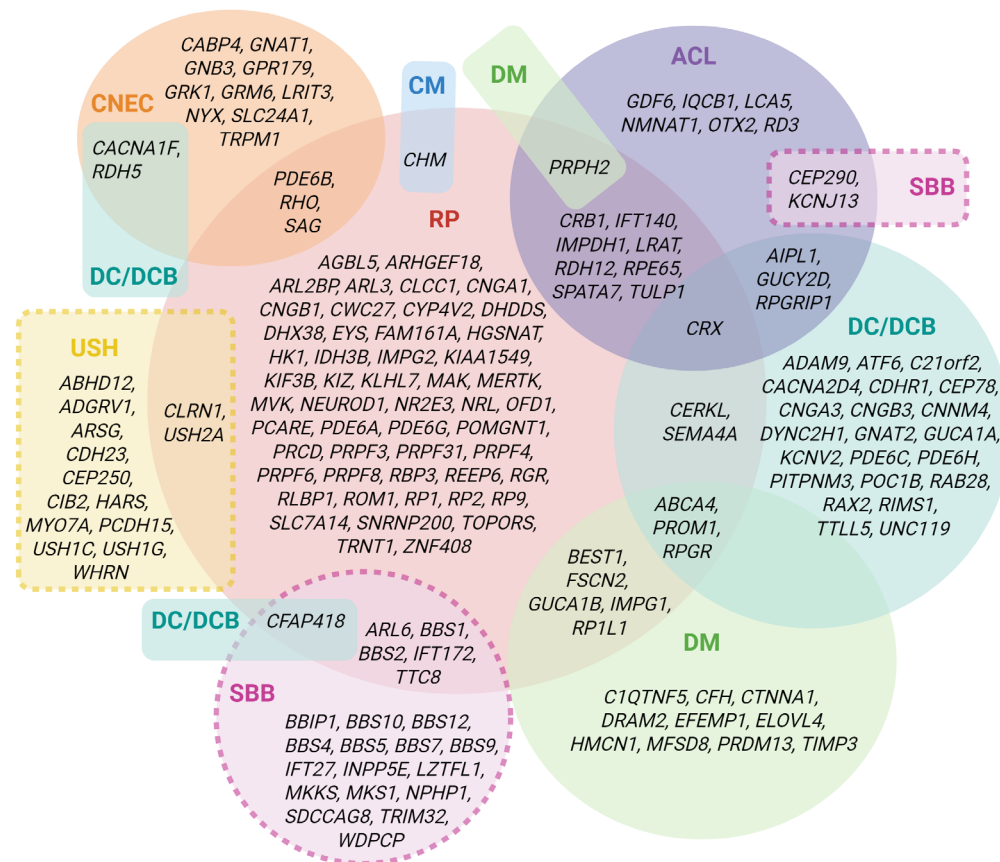


Figura 13. Superposició genotip-fenotip en les DHR.

Diagrama d'associacions entre gens i principals entitats clíniques. ACL, amaurosi congènita de Leber; CM, coroiderèmia; CNEC, ceguesa nocturna estacionària congènita; DC/DB, distròfies de cons i bastons; DM, distròfies maculars; RP, retinosi pigmentària; SBB, síndrome de Bardet-Biedl; USH, síndrome d'Usher. *Figura original.*

En aquest context, la correlació genotip-fenotip s'ha d'entendre com una eina orientativa més que no pas com una regla fixa. La seva interpretació exigeix integrar el coneixement de la biologia del gen, la naturalesa de la variant i la història clínica del pacient. Cada cas és, en última instància, un trencaclosques únic en què gen, variant, entorn familiar i fenotip interactuen de manera complexa.

5.3.4. Medicina de precisió i perspectives terapèutiques

L'avenç en el coneixement genètic de les DHR ha transformat un camp abans centrat en la classificació diagnòstica en un escenari de recerca translacional amb vocació terapèutica, on el diagnòstic molecular ha passat de ser una eina confirmatòria a esdevenir el punt de partida de la medicina de precisió. L'ull constitueix un model privilegiat per al desenvolupament de teràpies dirigides gràcies a la seva accessibilitat, l'arquitectura compartimentada, el privilegi immunològic, la possibilitat de monitoratge funcional i estructural i la presència d'un ull contralateral com a control (1). Aquestes característiques han situat les DHR al capdavant de la medicina genòmica translacional (18,74).

Actualment, només una minoria de pacients disposa d'un tractament aprovat. L'any 2017, la introducció de **voretigen neparvovec** (Luxturna) per a variants bial·lèliques patogèniques en *RPE65* va marcar un punt d'inflexió (47,75). Des d'aleshores, el ventall d'estratègies en desenvolupament s'ha ampliat de manera notable, tot i que la majoria es troben encara en fase preclínica o d'assaig clínic, segons el registre *ClinicalTrials.gov* (<https://clinicaltrials.gov/>).

Les principals línies de recerca inclouen:

- **Teràpies basades en ADN.** L'augmentació gènica mitjançant vectors de virus adenoassociats (AAV) és l'estratègia més avançada i ha demostrat millores funcionals i estabilització de la malaltia, com en el cas de Luxturna (47,76). Els principals reptes inclouen la capacitat limitada de càrrega —que dificulta abordar gens grans com *ABCA4* o *USH2A*—, la immunogenicitat i la necessitat potencial de readministració. Per superar aquestes limitacions, s'exploren estratègies de doble vector i minigens. També s'estan desenvolupant plataformes alternatives d'administració, com nanopartícules o vectors no virals, per ampliar-ne l'aplicabilitat. Paral·lelament, l'edició genòmica (CRISPR-Cas9 o editors de base) ofereix opcions de correcció directa, tot i que actualment es troba principalment en fase preclínica i amb reptes rellevants d'eficiència, especificitat i seguretat *in vivo* (18,77).
- **Teràpies basades en ARN.** Els oligonucleòtids antisentit (ASO) permeten modular l'*splicing* i corregir transcrits defectuosos; han arribat fins a assaig clínic de fase 3 per *CEP290* (Sepofarsen) i també s'investiguen per *USH2A* i *ABCA4* (57,78). Alhora, s'estan desenvolupant tecnologies emergents d'edició transitòria de l'ARN (REPAIR, LEAPER), que ofereixen l'avantatge de no modificar de manera permanent el genoma i, per tant, podrien reduir riscos, tot i que encara es troben lluny de la seva aplicació clínica (18).

- **Teràpies basades en proteïna.** Estratègies com els PROTACs i les *ubiquibodies* utilitzen la maquinària d'ubiquitinació-proteasoma per eliminar proteïnes patogèniques. En formes dominants de RP, s'han desenvolupat PROTACs dirigits a RHO alterada amb evidència prometedora en models preclínics (18,74). Tot i això, es tracta encara de conceptes experimentals amb reptes de penetració tissular, estabilitat i especificitat.
- **Altres estratègies.**
 - ❖ La **teràpia cel·lular**: el trasplantament de RPE derivat de cèl·lules mare pluripotents induïdes o de progenitors retinals té com a objectiu reemplaçar teixit degenerat independentment del gen causal (74).
 - ❖ L'**optogenètica**: permet conferir fotosensibilitat a neurones internes en absència de fotoreceptors. Els primers assajos clínics han mostrat una recuperació parcial de la funció visual, fet que evidencia el potencial translacional d'aquesta tecnologia (18).
 - ❖ Els **fàrmacs moduladors**: inclouen antioxidants, retinoides sintètics i inhibidors de vies de mort cel·lular, i podrien actuar com a teràpies adjuvants o preventives per alentir la degeneració (28).

Aquesta diversitat d'estratègies permet estratificar el tractament segons el gen causant, l'estadi evolutiu i el perfil funcional del pacient (Figura 14), i reflecteix el canvi de paradigma cap a la medicina de precisió.

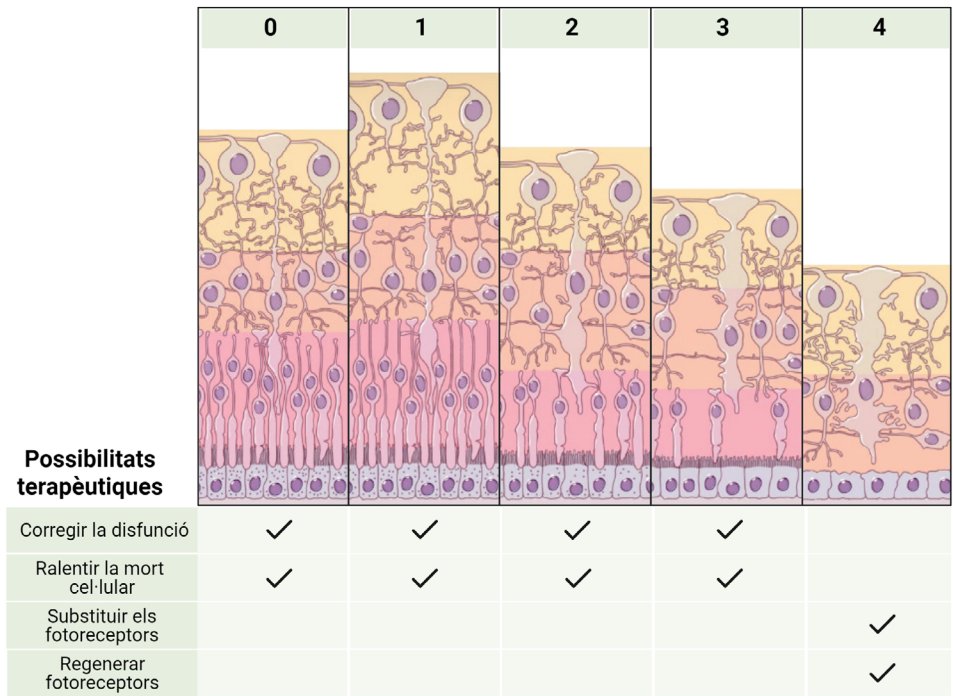


Figura 14. Etapes de degeneració retinal en les DHR i estratègies terapèutiques segons l'estadi evolutiu. *Figura creada amb BioRender, adaptada de Jacobson & Cideciyan (2010) (79).*

Per últim, l'eficàcia de les estratègies dirigides a ADN o ARN depèn de la viabilitat dels fotoreceptors i d'una caracterització genètica concloent, atès que l'elegibilitat és genotip-dependent (18). El patró d'herència també condiciona l'elecció terapèutica: en les DHR amb herència AR o XL s'acostuma a aplicar augmentació gènica, mentre que en les formes AD sovint cal silenciar o degradar l'al·lel patogènic (80,81). En canvi, estratègies genotip-independents —com la teràpia cel·lular, l'optogenètica o determinats moduladors farmacològics— es poden aplicar en fases avançades (quan els fotoreceptors ja s'han perdut) i sense necessitat d'identificar el gen causal.

5.4. Diagnòstic molecular de les DHR

El diagnòstic molecular és una eina fonamental en el maneig clínic de les DHR. Conèixer la causa genètica no només permet establir un diagnòstic precís i posar nom a la malaltia, sinó que també orienta el pronòstic, l'assessorament genètic i la planificació reproductiva (16,82). A més, com s'ha vist en l'apartat anterior, la majoria de teràpies emergents són gen-dependents, fet que situa el diagnòstic genètic al centre de la medicina de precisió. Sense aquesta caracterització genètica, moltes opcions terapèutiques i serveis especialitzats queden fora de l'abast del pacient.

El procés comença habitualment amb una mostra de sang perifèrica, d'on s'extreu l'ADN genòmic. Un cop aïllat, aquest ADN es fragmenta i es prepara per a la seqüenciació. Des de la generació de dades brutes fins a l'emissió de l'informe, el diagnòstic molecular activa un circuit multidisciplinari que integra tècniques de biologia molecular, anàlisi bioinformàtica i interpretació clínica (Figura 15).

Aquest apartat revisa les principals tecnologies de seqüenciació i els criteris d'interpretació de variants en DHR, i analitza com les causes dels casos no resolts poden convertir-se en una oportunitat per implementar estratègies innovadores que millorin el rendiment diagnòstic.

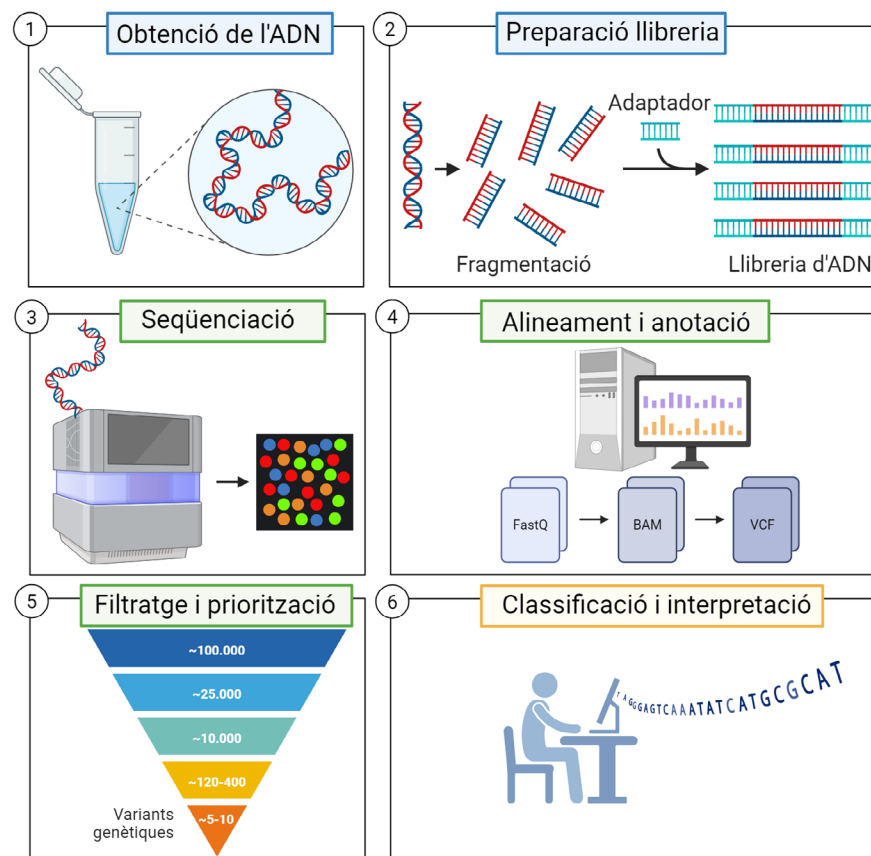


Figura 15. Flux de treball simplificat de l'anàlisi genòmica mitjançant NGS. Els colors indiquen les fases de laboratori (blau), bioinformàtica (verd) i anàlisi clínica (groc). *Figura original elaborada a partir de Austin et al. (2022) (83).*

5.4.1. Tècniques de seqüenciació

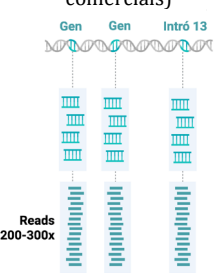
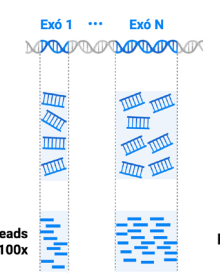
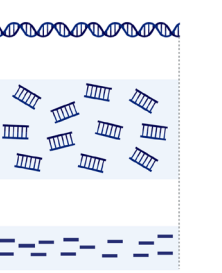
Durant dècades, el diagnòstic genètic de les DHR es va basar en la seqüenciació individual de gens seleccionats segons el quadre clínic i el patró d'herència sospitat, mitjançant la tècnica de seqüenciació Sanger. Malgrat la seva elevada precisió analítica, era un procés lent, costós i amb un abast molt limitat, que rarament superava un rendiment diagnòstic del 15–20% (32).

La introducció de la seqüenciació massiva o de nova generació (*Next Generation Sequencing*, NGS) va suposar un canvi de paradigma, en permetre l'anàlisi simultània de centenars de gens associats a DHR en una única prova, reduint dràsticament temps i costos i augmentant de manera notable el rendiment diagnòstic (32). El seu desenvolupament va ser possible gràcies als avenços del Projecte Genoma Humà —culminat el 2003—, que va proporcionar el primer mapa complet del genoma i les bases tecnològiques per a la seva aplicació clínica (84).

En menys d'una dècada, la NGS ha permès abordar amb més eficàcia l'elevada heterogeneïtat genètica de les DHR, incrementant el percentatge de diagnòstics confirmats i aportant informació amb implicacions terapèutiques, familiars i reproductives rellevants (32,84,85).

Actualment, les principals modalitats de NGS utilitzades en el diagnòstic molecular de les DHR es basen en tecnologies de *short-read sequencing*, que generen fragments curts d'ADN (100–300 pb) posteriorment alineats amb el genoma de referència (84). Les tres aproximacions més utilitzades són els panells dirigits de gens, la seqüenciació de l'exoma complet (*Whole Exome Sequencing*, WES) i la seqüenciació del genoma complet (*Whole Genome Sequencing*, WGS), amb diferències en abast, variants que es poden detectar, cost i capacitat de reanàlisi, entre d'altres (Taula 3) (86).

Taula 3. Comparació de tècniques NGS. Taula original.

	Panells dirigits (personalitzats o comercials) 	WES 	WGS 
Regions analitzades	Gens seleccionats ± regions d'interès	Tots els exons (~1–2% del genoma)	Tot el genoma (regions codificants i no codificants)
Cobertura	Alta i uniforme	Variable segons regió	Generalment uniforme
Variants detectades	SNVs, indels i CNVs en els gens inclosos	Variants codificants i CNVs	Variants codificants, intròniques, reguladores, SVs i CNVs
Volum de dades	Baix (~centenars–milers de variants)	Mitjà (~20.000–100.000 variants)	Molt alt (~4–5 milions de variants)
Temps i costos	Ràpid i assequible	Intermedis	Elevats
Reanalitzable	No	Sí	Sí
Aplicabilitat clínica	Fenotips definits; cribratge de portadors	Estàndard en DHR, versàtil	Casos no resolts, recerca
Avantatges	Disseny a mida, alta especificitat; fàcil d'interpretar	Cobertura de tots els gens implicats	Detecció global, incloses SVs i mecanismes complexos
Limitacions	No inclou gens fora del disseny	Cobertura desigual; regions codificants i intròniques flanquejants	Volum massiu de dades, dificultat interpretativa i clínica, alt nombre de VUS
Riscos ètics	Baix	Troballes inesperades	Risc alt de troballes no relacionades

Abreviatures: CNVs: variants de nombre de còpia; SNVs: variants de nucleòtid únic; SVs: variants estructurals; VUS: variants de significat clínic incert; WES: seqüenciació de l'exoma complet; WGS: seqüenciació del genoma complet.

Un paràmetre tècnic clau en totes elles és la **cobertura** (*coverage*), que indica el nombre mitjà de lectures per base: per exemple, 100x significa que cada base s’ha seqüenciat, de mitjana, cent vegades. En DHR, es recomana una cobertura mitjana de ≥100–150x, amb un mínim de 20–30x per base per garantir la fiabilitat diagnòstica (85).

Els **panells dirigits** —personalitzats segons l’experiència clínica d’un centre o disponibles com a kits comercials estandarditzats— inclouen els principals gens associats a DHR, amb alta cobertura de regions exòniques i, sovint, de regions genòmiques d’interès com l’intró 13 d’*USH2A* o l’ORF15 de *RPGR* (32). Representen una opció eficient tant tècnica com econòmicament, amb alta sensibilitat diagnòstica i una interpretació més acotada. Tanmateix, depenen de la selecció de gens inclosos i requereixen actualitzacions periòdiques per mantenir-se alineats amb el coneixement científic més recent (87).

El **WES** cobreix totes les regions codificants (1–2% del genoma) i genera dades reutilitzables que permeten aplicar panells virtuals personalitzats segons fenotip i coneixement disponible (86). La seva flexibilitat i escalabilitat l’han consolidat com la tècnica més utilitzada —en el moment de redacció d’aquesta tesi (juliol de 2025)— en la pràctica clínica per al diagnòstic de DHR (16). Presenta, però, cobertura desigual en algunes regions —sobretot exons rics en GC— i capacitat limitada per detectar SVs o variants no codificants (88).

El **WGS** permet analitzar tot el genoma, incloent-hi regions codificants i no codificants —com introns profunds, elements reguladors i seqüències intergèniques—, així com SVs com insercions, delecions de gran mida o inversions (89). A diferència del WES, no

requereix captura prèvia i ofereix una cobertura més uniforme, fet que afavoreix la detecció d'alteracions complexes i n'incrementa el potencial diagnòstic. No obstant això, el gran volum de dades que genera exigeix anàlisis bioinformàtiques avançades i planteja reptes interpretatius, sobretot en relació amb variants no codificants, la qual cosa en limita l'ús clínic a entorns de recerca o casos complexes (16,83).

Finalment, la **seqüenciació Sanger**, tot i haver estat àmpliament reemplaçada, continua sent una eina complementària de referència per validar variants detectades per NGS, fer estudis de segregació, seqüenciació dirigida i detecció de portadors en assessorament genètic reproductiu, gràcies a la seva fiabilitat, simplicitat i baix cost (32).

5.4.2. Interpretació i classificació de variants

La seqüenciació genòmica d'alta resolució identifica milers de variants per individu, de les quals només una fracció és clínicament rellevant. Determinar quines variants són realment patogèniques i responsables del fenotip constitueix un pas crític per transformar dades massives en valor clínic. Aquest procés requereix expertesa genòmica i clínica, així com la integració de múltiples capes d'evidència: patró d'herència, correlació fenotípica, funció i fisiopatologia del gen, i context clínic del pacient (90).

Per harmonitzar aquest procés, l'*American College of Medical Genetics and Genomics* i l'*Association for Molecular Pathology* (ACMG/AMP) van publicar l'any 2015 unes guies consensuades que han esdevingut l'estàndard internacional (91). Aquestes guies

defineixen criteris jerarquitzats segons la força de l'evidència —molt sòlida (PVS), sòlida (PS), moderada (PM), de suport (PP), i els seus equivalents benignes (BS-BP)— que inclouen, entre d'altres, freqüència poblacional (gnomAD), impacte funcional (p. ex., *nonsense*, *frameshift*), configuració *cis/trans*, prediccions *in silico* (REVEL, CADD, SpliceAI), dades funcionals, segregació familiar i correlació fenotípica (Taula 4). La combinació d'aquests criteris permet classificar les variants en patogènica (P), probablement patogènica (LP), de significat clínic incert (VUS), probablement benigna (LB) o benigna (B) (Taules 5 i 6). En la pràctica clínica, només les variants P/LP es consideren **accionables**: confirmen el diagnòstic, orienten el seguiment, justifiquen estudis familiars i faciliten l'accés a opcions reproductives —diagnòstic prenatal o preimplantacional (DGP)— i a assajos clínics o teràpies dirigides (18).

Tot i la seva solidesa, el marc ACMG/AMP manté marges de subjectivitat i variabilitat interlaboratorial, ja que la classificació depèn de la qualitat de les dades i de la selecció i pes assignat a cada criteri. Estudis comparatius han evidenciat una concordança limitada entre laboratoris (92,93), fet que subratlla la necessitat d'harmonització i d'adaptar els criteris a cada gen o patologia. Per abordar-ho, els *Variant Curation Expert Panels* (VCEP) de ClinGen han introduït ajustos clau: (i) llindars de freqüència al·lèlica diferenciats segons mecanisme i patró d'herència; (ii) criteris específics per a variants en *trans* en malalties recessives; i (iii) ponderació ajustada de l'evidència funcional (94). Tanmateix, aquestes guies cobreixen només una part dels més de 300 gens associats a DHR, de manera que sovint cal aplicar els criteris amb flexibilitat i una avaluació crítica de tota l'evidència disponible (56).

Taula 4. Criteris ACMG/AMP. Adaptat de Richards et al. (2015) (91).

Criteris per classificar una variant com a patogènica		Criteris per classificar una variant com a benigna	
Criteri molt sòlid	PVS1. Variant de pèrdua de funció en gens on aquest mecanisme és conegut per causar la malaltia.	Criteri molt sòlid	BA1. Freqüència superior al 5% en població control per a un gen específic de la malaltia estudiada.
	PS1. Canvi del mateix aminoàcid que una altra variant P/LP. PS2. Variant <i>de novo</i> (confirmat). PS3. Evidència funcional que demostra un efecte deleteri sobre la proteïna. PS4. Prevalença significativament més alta en individus afectats que en controls.		BS1. Freqüència en individus no afectats més alta que en afectats. BS2. Observada en individus amb tota seguretat no afectats. BS3. Estudis funcionals indiquen que no té cap efecte sobre la funció de la proteïna. BS4. No co-segrega amb la malaltia.
Criteris sòlids	PM1. Localització en domini funcional/ <i>hotspot</i> amb variants B/LB. PM2. Absència o molt baixa freqüència en bases de dades poblacionals de control. PM3. Variant observada en <i>trans</i> amb una altra variant LP/P en malalties recessives. PM4. Variant <i>missense</i> nova, o bé inserció/deleció <i>in-frame</i> no repetitiva. PM5. Nou canvi d'aminoàcid en una posició on ja s'ha descrit un altre canvi patogènic. PM6. Variant <i>de novo</i> (no confirmat).	Criteris sòlids	
	PP1. Co-segregació amb la malaltia en diversos individus afectats. PP2. Gen on hi ha poques variants <i>missense</i> B/LB i moltes de P/LP. PP3. Algoritmes bioinformàtics prediuen un efecte deleteri. PP4. El fenotip del pacient és molt específic d'una malaltia amb base genètica concreta. PP5. Fonts respectades la classifiquen com a LP/P.		BP1. Variant <i>missense</i> en un gen on només es coneixen variants de pèrdua de funció causants de malaltia. BP2. Variant observada en <i>cis</i> amb una altra variant P/LP, o en <i>trans</i> amb una variant P/LP en una entitat dominant. BP3. Canvi/deleció <i>in-frame</i> en una regió repetitiva sense alteració de la funció de la proteïna. BP4. Algoritmes bioinformàtics prediuen que no té cap efecte sobre la proteïna. BP5. Trobat en individus afectats per una altra causa genètica. BP6. Fonts respectades la classifiquen com a LB/B. BP7. Variant sinònima que no afecta l' <i>splicing</i> .
Criteris moderats		Criteris de suport	

Taula 5. Categories de classificació de variants segons ACMG/AMP. Adaptada de Richards et al. (2015) (91).

Categoria	Probabilitat de patogenicitat	Ús clínic	Exemples d'evidència
P	>99%	Diagnòstic, accés a teràpies, assajos i assessorament reproductiu.	<i>Frameshift</i> o <i>nonsense</i> ; evidència funcional sòlida; segregació en múltiples casos.
LP	90–99%	Ídem si concorda amb el fenotip.	Variant rara amb dades funcionals limitades
VUS	10–90%	No accionable. Requereix més dades.	Variant sense prou evidències o amb informació contradictòria
LB	1–10%	Molt probablement no relacionada amb la malaltia. No s'informa clínicament.	Freqüència lleugerament elevada, sense dades funcionals.
B	<1%	No relacionada amb la malaltia. No s'informa clínicament.	Polimorfisme comú, evidència funcional negativa.

Amb l'evolució del camp, alguns criteris s'han revisat. El **PM2** (absència en bases de dades poblacionals) ha passat de tenir força moderada a força de suport, atès que l'absència a gnomAD no és, per si sola, prova de patogenicitat, especialment en gens grans o poblacions poc representades. Igualment, ja no es recomana utilitzar **PP5** i **BP6** (basats en classificacions prèvies) per manca de verificabilitat i transparència (95).

Repositoris públics com **ClinVar** i **LOVD** agreguen classificacions aportades per laboratoris i experts d'arreu del món i en milloren la transparència i comparabilitat. Eines com **VarSome** i **Franklin** permeten una aplicació automatitzada dels criteris ACMG/AMP i són útils com a punt de partida, però no substitueixen la revisió experta,

imprescindible per integrar context clínic, literatura actualitzada, mecanismes de patogenicitat i especificitats de cada gen.

Taula 6. Combinació de criteris ACMG/AMP per a la classificació de variants. Adaptada de Richards et al. (2015) (91).

Classificació	Combinació de criteris
P	(i) 1 molt sòlid (PVS1) i a) ≥ 1 sòlid (PS1-PS4) o b) ≥ 2 moderats (PM1-PM6) o c) 1 moderat (PM1-PM6) i ≥ 2 de suport (PP1-PP5) o d) ≥ 4 de suport (PP1-PP5) (ii) ≥ 2 sòlids (PS1-PS4) o (iii) 1 sòlid (PS1-PS4) i a) ≥ 3 moderats (PM1-PM6) o b) 2 moderats (PM1-PM6) i ≥ 2 de suport (PP1-PP5) o c) 1 moderat (PM1-PM6) i ≥ 4 de suport (PP1-PP5)
LP	(i) 1 molt sòlid (PVS1) i 1 moderat (PM1-PM6) o (ii) 1 sòlid (PS1-PS4) i 1-2 moderats (PM1-PM6) o (iii) 1 sòlid (PS1-PS4) i ≥ 2 de suport (PP1-PP5) o (iv) ≥ 3 moderats (PM1-PM6) o (v) 2 moderats (PM1-PM6) i ≥ 2 de suport (PP1-PP5) o (vi) 1 moderat (PM1-PM6) i ≥ 4 de suport (PP1-PP5)
B	(i) ≥ 2 sòlids (BS1-BS4) (ii) 1 sòlid (BA1)
LB	(i) 1 sòlid (BS1-BS4) i ≥ 1 de suport (BP1-BP7) o (ii) ≥ 2 de suport (BP1-BP7)
VUS	(i) No compleix els criteris anteriors (ii) Els criteris de classificació benignes i patogènics són contradictoris

Les variants *missense* i intròniques —incloses les intròniques profundes— són les més prevalents en les DHR i la seva patogenicitat sovint és difícil de determinar (60,96). Els algoritmes predictius bioinformàtics en faciliten la priorització (criteris PP3/BP4), però els criteris més sòlids —**PS3** (evidència funcional positiva) i **BS3** (evidència funcional negativa)— requereixen dades experimentals. L'estudi funcional és, per tant, necessari per caracteritzar l'impacte real de les variants. No obstant això, la inaccessibilitat del teixit retinal i l'expressió estrictament retinal d'alguns gens continuen impedit el seu estudi *in vivo*.

Aquestes dificultats han impulsat el desenvolupament de models i assajos *in vitro* dissenyats per reproduir processos clau de la retina. L'anàlisi d'ARN procedent de teixits perifèrics o de gens amb expressió extraretinal pot aportar evidències directes d'alteracions d'*splicing*, però no és factible per a gens d'expressió exclusiva a la retina. En aquests casos, els sistemes basats en **minigens** i **midigens** (Figura 16) s'han consolidat com a eines altament informatives per analitzar els mecanismes moleculars de les DHR i millorar la interpretació de variants. Els minigens contenen un exó amb els introns adjacents inserit en un vector d'expressió, mentre que els midigens incorporen fragments genòmics més extensos, cosa que permet detectar defectes d'*splicing* més complexos en un context més proper al genoma natiu (97).

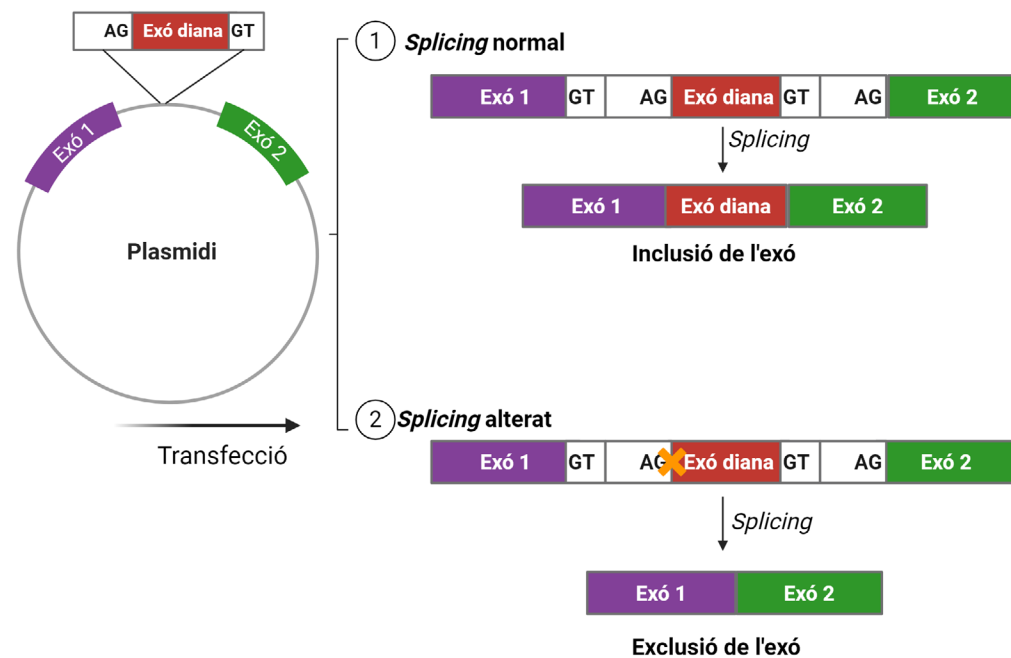


Figura 16. Esquema del funcionament d'un assaig de minigen. El fragment genòmic que conté l'exó objectiu s'insereix en un vector i es transfecta en cèl·lules cultivades. En condicions normals, l'exó s'inclou en el transcrit madur. Una variant patològica pot provocar l'exclusió de l'exó (*exon skipping*), evidenciant un defecte d'*splicing*. Figura creada amb BioRender, adaptada de Abramowicz & Gos (2018) (55).

5.4.3. Rendiment i limitacions del diagnòstic molecular

L'aplicació generalitzada de la NGS juntament amb el refinament dels criteris interpretatius i eines bioinformàtiques, ha suposat un salt qualitatiu en el diagnòstic molecular de les DHR. Actualment, els estudis genètics en cohorts àmplies i ben caracteritzades mostren un rendiment diagnòstic d'entre el 50% i el 70% (25,48,85,87,88), unes xifres molt superiors a l'era pre-NGS (98). No obstant això, el fet que prop del 40% dels pacients amb fenotips clínics clarament compatibles

amb una DHR continuïn sense un diagnòstic molecular concloent posa de manifest les limitacions vigents. Aquestes responen a múltiples factors, sovint interrelacionats, que inclouen aspectes tècnics, interpretatius i biològics. Com s'ha assenyalat anteriorment, malgrat la seva elevada sensibilitat, la *short-read sequencing* presenta restriccions per detectar variants en determinades regions genòmiques (62,99). A això s'hi afegeixen les dificultats en la interpretació de variants genètiques i el coneixement encara incomplet de les bases moleculars de les DHR, que expliquen per què una part substancial dels casos roman sense resolució diagnòstica.

Entendre per què una proporció significativa de pacients continua sense diagnòstic no només constitueix un repte clínic, sinó que també representa una oportunitat per optimitzar els fluxos de treball i avançar cap a un model de medicina de precisió més eficient. Estratègies com la implementació progressiva del WGS com a tècnica de segon nivell, la reanàlisi sistemàtica del WES, l'ús de panells personalitzats per a regions de seqüenciació problemàtica, la incorporació d'estudis funcionals i l'aplicació de tecnologies emergents permeten superar moltes d'aquestes barreres (62,86,100).

Aquest plantejament ha estat el motor d'aquesta tesi, que respon de manera directa a les mancances detectades en el diagnòstic genètic convencional. L'aplicació d'enfocaments innovadors ha permès incrementar el rendiment diagnòstic i, alhora, contribuir a una comprensió més profunda dels mecanismes moleculars implicats en les DHR.



HIPÒTESIS

6

Tot i els avenços en les tècniques de seqüenciació genòmica i la seva incorporació a la pràctica clínica, prop del 40% dels pacients amb distròfies hereditàries de la retina continuen sense un diagnòstic molecular concloent després d'una anàlisi inicial basada en panells dirigits o en seqüenciació de l'exoma. En aquest subgrup de pacients, la causa genètica pot estar relacionada amb:

- Variants ja identificades però classificades com a variants de significat clínic incert.
- Variants no detectades o no reportades en l'anàlisi inicial, incloent-hi aquelles situades en regions no codificants, estructurals, repetitives o amb evidència limitada.
- Variants en gens candidats amb evidència preliminar de rellevància clínica o funcional.

A partir d'aquesta premissa, es formulen les següents hipòtesis:

1. Un enfocament seqüencial i personalitzat d'anàlisi i validació genètica pot millorar de manera significativa la taxa de diagnòstic molecular en pacients amb distròfies hereditàries de la retina no resolts.
2. L'aplicació d'aquest enfocament permetrà ampliar l'espectre de variants associades a aquestes malalties, establir noves correlacions genotip-fenotip i afavorir un assessorament genètic més precís i orientat a possibles opcions reproductives i terapèutiques.



OBJECTIUS



Objectiu general

1. Millorar el rendiment diagnòstic de les distròfies hereditàries de la retina en pacients adults.

Objectius específics

2. Caracteritzar genèticament una cohort de pacients adults amb diagnòstic clínic de distròfia hereditària de la retina i estudi genètic no concloent.
3. Identificar variants genètiques no detectables amb estratègies de seqüenciació convencionals.
4. Millorar el seguiment clínic, l'assessorament genètic i l'accés a opcions terapèutiques dels pacients estudiats.
5. Avaluar la rellevància diagnòstica i clínica de gens candidats emergents.
6. Establir noves correlacions genotip-fenotip per aprofundir en el coneixement de l'expressivitat i la variabilitat d'aquestes malalties.
7. Analitzar el mecanisme molecular de variants amb possible impacte patogènic.
8. Desenvolupar un protocol diagnòstic molecular escalable i transferible a la pràctica clínica.



INFORME DE LES DIRECTORES

8

En qualitat de directores de la tesi del Programa de Doctorat en Genètica, presentem l'informe referent a la recopilació de treballs que conformen la tesi doctoral de la doctoranda Anna Esteve Garcia. En aquest informe es detalla la seva participació en cadascun dels articles, així com la seva relació amb els coautors i altres tesis doctorals.

Article 1

Títol: *Deciphering complexity: TULP1 variants linked to an atypical retinal dystrophy phenotype.*

Revista: *Frontiers in Genetics*, 2024; 15:1352063.

Factor d'impacte (2024): 2.8.

Quartil (JCR 2024): Q2.

Decil (JCR 2024): 5è.

Àrea de coneixement: Genetics & Heredity.

La doctoranda Anna Esteve Garcia ha tingut una contribució destacada en totes les fases de l'estudi. Ha assumit la primera autoria i la coordinació del projecte, participant activament en l'anàlisi de dades, la redacció del manuscrit, la revisió crítica i la validació final.

Cap dels coautors ha utilitzat, ni de manera explícita ni implícita, els continguts d'aquest treball per a l'elaboració d'una altra tesi doctoral fins a la data de presentació d'aquest informe.

Aquest article representa una contribució original i significativa al projecte de recerca.

Article 2

Títol: *Expanding the Clinical Spectrum of CEP290 Variants: A Case Report on Non-Syndromic Retinal Dystrophy with a Mild Phenotype.*

Revista: *Genes*. 2024; 15: 1584.

Factor d'impacte (2024): 2.8.

Quartil (JCR 2024): Q2.

Decil (JCR 2024): 5è.

Àrea de coneixement: Genetics & Heredity.

En aquest article, la doctoranda Anna Esteve Garcia ha tingut una contribució rellevant. Ha assumit la primera autoria i la coordinació dels coautors, participant en la conceptualització i disseny metodològic de l'estudi, l'anàlisi i interpretació dels resultats, així com en la redacció principal i revisió del manuscrit. A més, ha supervisat el treball dels coautors.

Cap dels coautors ha emprat els resultats o continguts d'aquest article per a l'elaboració d'una altra tesi doctoral.

Aquest article complementa els resultats de l'article anterior i aporta un valor clínic i translacional a la tesi.

Article 3

Títol: *Personalised genomic strategies improve diagnostic yield in inherited retinal dystrophies: a stepwise, patient-centred approach.*

Revista: *Eye*. 2025; 39: 2899–2911.

Factor d'impacte (2024): 3.2.

Quartil (JCR 2024): Q1.

Decil (JCR 2024): 2n.

Àrea de coneixement: Ophthalmology.

La doctoranda Anna Esteve Garcia ha tingut una contribució predominant en aquest estudi. Ha assumit la primera autoria i la coordinació de l'estudi, participant en el disseny de la investigació, la realització de les anàlisis genètiques, la redacció del manuscrit i la coordinació general de la recerca. També ha supervisat els coautors en les seves tasques.

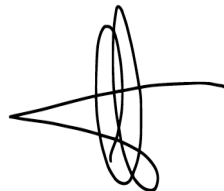
Cap dels coautors ha utilitzat els resultats o continguts d'aquest article per a l'elaboració d'una altra tesi doctoral.

Aquest article constitueix l'element central de la tesi i evidència la maduresa investigadora de la doctoranda.

Signatures:



Dra. Estefania Cobos Martín
Directora de tesi



Dra. Cinthia Aguilera Román
Directora de tesi



PUBLICACIONES

9

Resum **article 1**

Títol: Desxifrant la complexitat: variants en *TULP1* associades a un fenotip atípic de distròfia de retina (*Deciphering complexity: TULP1 variants linked to an atypical retinal dystrophy phenotype*)

Objectiu: Caracteritzar el fenotip clínic i el mecanisme molecular d'una forma atípica de distròfia hereditària de la retina associada a variants bial·lèliques en el gen *TULP1*.

Mètodes: Es va dur a terme una avaluació clínica exhaustiva i una anàlisi genètica mitjançant seqüenciació dirigida de l'exoma. La patogenicitat de la variant *TULP1* c.822G>T, no descrita prèviament, es va estudiar amb un assaig funcional de minigen dissenyat específicament per analitzar-ne l'impacte en l'*splicing*.

Resultats: El pacient presentava un patró simètric i inusual d'alteracions retinals, caracteritzat per un augment de l'autofluorescència al voltant dels vasos. Es van identificar dues variants en *trans* al gen *TULP1*: una *missense* prèviament descrita, c.1376T>C, p.(Ile459Thr), i la variant c.822G>T, p.(Lys274Asn). L'assaig de minigen va demostrar que aquesta última genera un codó de terminació prematur, suggerint l'activació del mecanisme de degradació de l'ARNm dependent de codons de terminació (NMD).

Conclusions: Els pacients amb variants bial·lèliques en *TULP1* poden presentar fenotips atípics caracteritzats per degeneració macular i pigmentació vascular periarteriolar. Aquest cas amplia l'espectre fenotípic associat a *TULP1* i reforça el valor dels estudis funcionals en el diagnòstic genètic de les distròfies hereditàries de la retina.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Stephen J. Bush,
Xi'an Jiaotong University, China

REVIEWED BY
Said El Shamieh,
Beirut Arab University, Lebanon
Lama Jaffal,
Lebanese International University, Lebanon

*CORRESPONDENCE
Anna Esteve-Garcia,
✉ aesteveg@bellvitgehospital.cat
Cinthia Aguilera,
✉ caguilerar@bellvitgehospital.cat

RECEIVED 07 December 2023
ACCEPTED 29 January 2024
PUBLISHED 21 February 2024

CITATION
Esteve-Garcia A, Cobos E, Sau C,
Padró-Miquel A, Català-Mora J,
Barberán-Martínez P, Millán JM,
García-García G and Aguilera C (2024),
Deciphering complexity: *TULP1* variants linked
to an atypical retinal dystrophy phenotype.
Front. Genet. 15:1352063.
doi: 10.3389/fgene.2024.1352063

COPYRIGHT
© 2024 Esteve-Garcia, Cobos, Sau, Padró-
Miquel, Català-Mora, Barberán-Martínez,
Millán, García-García and Aguilera. This is an
open-access article distributed under the terms
of the [Creative Commons Attribution License](#)
(CC BY). The use, distribution or reproduction in
other forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in this
journal is cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Deciphering complexity: *TULP1* variants linked to an atypical retinal dystrophy phenotype

Anna Esteve-Garcia^{1*}, Estefania Cobos², Cristina Sau¹,
Ariadna Padró-Miquel³, Jaume Català-Mora⁴,
Pilar Barberán-Martínez^{5,6}, José M. Millán^{5,6,7,8},
Gema García-García^{5,6,7} and Cinthia Aguilera^{3*}

¹Department of Clinical Genetics, Bellvitge University Hospital, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, ²Department of Ophthalmology, Bellvitge University Hospital, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, ³Genetics Laboratory, Bellvitge University Hospital, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, ⁴Department of Ophthalmology, SJD Barcelona Children's Hospital, Barcelona, Spain, ⁵Molecular, Cellular, and Genomic Biomedicine Group, Valencia, Spain, ⁶Joint Unit CIPF-IIS La Fe Molecular, Cellular and Genomic Biomedicine, Valencia, Spain, ⁷Center for Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain, ⁸University and Polytechnic La Fe Hospital of Valencia, Valencia, Spain

Introduction: *TULP1* exemplifies the remarkable clinical and genetic heterogeneity observed in inherited retinal dystrophies. Our research describes the clinical and molecular characteristics of a patient manifesting an atypical retinal dystrophy pattern, marked by the identification of both a previously unreported and a rarely encountered *TULP1* variant.

Methods: Whole-exome sequencing was performed to identify potential causative variants. The pathogenicity of the identified *TULP1* variants was evaluated through *in silico* predictors and a minigene splice assay, specifically designed to assess the effect of the unreported *TULP1* variant.

Results: We identified two *TULP1* gene variants in a patient exhibiting unusual and symmetrical alterations in both retinas, characterized by an increase in autofluorescence along the distribution of retinal vessels. These variants included a known rare missense variant, c.1376T>C, and a novel splice site variant, c.822G>T. For the latter variant (c.822G>T), we conducted a minigene splice assay that demonstrated the incorporation of a premature stop codon. This finding suggests a likely activation of the nonsense-mediated mRNA decay mechanism, ultimately resulting in the absence of protein production from this allele. Segregation analysis confirmed that these variants were in *trans*.

Discussion: Our data support that individuals with biallelic *TULP1* variants may present with a unique pattern of macular degeneration and periarteriolar vascular pigmentation. This study highlights the importance of further clinical and molecular characterization of *TULP1* variants to elucidate genotype–phenotype correlations in the context of inherited retinal dystrophies.

KEYWORDS

TULP1, inherited retinal dystrophy, atypical phenotype, whole-exome sequencing, minigene splice assay

1 Introduction

Inherited retinal dystrophies (IRDs) constitute a spectrum of conditions characterized by both clinical and genetic heterogeneity, affecting approximately 1 in 3,000 individuals (Hanany et al., 2020). This clinical diversity ranges from non-progressive diseases like night blindness to progressive conditions such as retinitis pigmentosa (RP) (García Bohórquez et al., 2021; Perea-Romero et al., 2021). The identification of over 300 genes conclusively linked to IRDs (RetNet, <https://web.sph.uth.edu/RetNet/>; accessed on 13 January 2024) also exhibits the complex nature of these conditions, marked by extensive genetic heterogeneity and variable expressivity. Notably, different variants within the same gene can lead to a wide range of clinical presentations (Chen et al., 2018; Bianco et al., 2023), and conversely, similar clinical manifestations may result from variants in different genes (García Bohórquez et al., 2021; Perea-Romero et al., 2021; Smirnov et al., 2021). Additionally, evidence supports the significant role of gene modifiers in human eye diseases (Meyer and Anderson, 2017; Li et al., 2021), introducing an added layer of complexity to the diagnosis and understanding of IRDs.

The *TULP1* gene serves as an example of the heterogeneity observed in IRDs. The link between *TULP1* and autosomal recessive IRDs was first established in 1998 (Banerjee et al., 1998; Hagstrom et al., 1998). Since then, *TULP1* biallelic variants have been extensively associated with various forms of IRDs, including non-syndromic RP, Leber congenital amaurosis, cone dystrophy, and rod–cone dystrophy (Ullah et al., 2016; Bodenbender et al., 2023). To date, the LOVD database (www.lovd.nl/gene, accessed on 13 January 2024) records a total of 117 unique *TULP1* variants. Among these, 46 are classified as variants of uncertain significance (VUS), while 106 are categorized as likely pathogenic or pathogenic.

TULP1 encodes Tubby-like protein 1, which is a member of the TULP protein family (North et al., 1997; Nishina et al., 1998). TULP proteins have been well-documented for their critical roles in the development and function of the central nervous system (Ikeda et al., 2002). Despite displaying different expression patterns, all TULP proteins share a conserved C-terminal region of approximately 200 amino acids known as the tubby domain. *TULP1*, in particular, is exclusively expressed in the retina, primarily within the cytoplasm of retinal photoreceptor cells (Ikeda et al., 1999). It is assumed that *TULP1* is involved in various protein–protein interactions and the intracellular protein transport, including rhodopsin and vesicle transport to and from the outer segments of photoreceptor cells (Hagstrom et al., 2001).

Bodenbender et al. (2023) reported the largest *TULP1*-related IRD cohort to date. This research established a connection between biallelic *TULP1* variants and a wide range of clinical phenotypes, emphasizing the remarkable heterogeneity in *TULP1*-related retinal dystrophy. The authors suggested that protein misfolding could be a key factor contributing to the variable clinical presentations resulting from *TULP1* gene variants. However, the intricate mechanisms underlying how *TULP1* misfolding leads to specific clinical phenotypes still remain unknown (Boggon et al., 1999; Ikeda et al., 2002).

In our current research, we explore the clinical and molecular characteristics of a patient with biallelic *TULP1* variants presented with a unique pattern of macular degeneration and periarteriolar

vascular pigmentation. Our primary focus lies on the identification of both a newly identified and a previously reported variant within the *TULP1* gene. This study aims to broaden the understanding of the relationship between *TULP1* and IRDs.

2 Materials and methods

2.1 Clinical evaluation

The proband underwent a comprehensive clinical assessment conducted by an experienced retinal ophthalmologist. The clinical diagnosis encompassed an array of ophthalmological evaluations, comprising visual acuity assessment, detailed fundoscopic examination, fundus photography, ultra-widefield autofluorescence (FAF) imaging, and spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT). Electrophysiological evaluations, involving full-field flash electroretinography (ffERG) and multifocal ERG (mfERG), were also performed, following the protocols established by the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) (McCulloch et al., 2015).

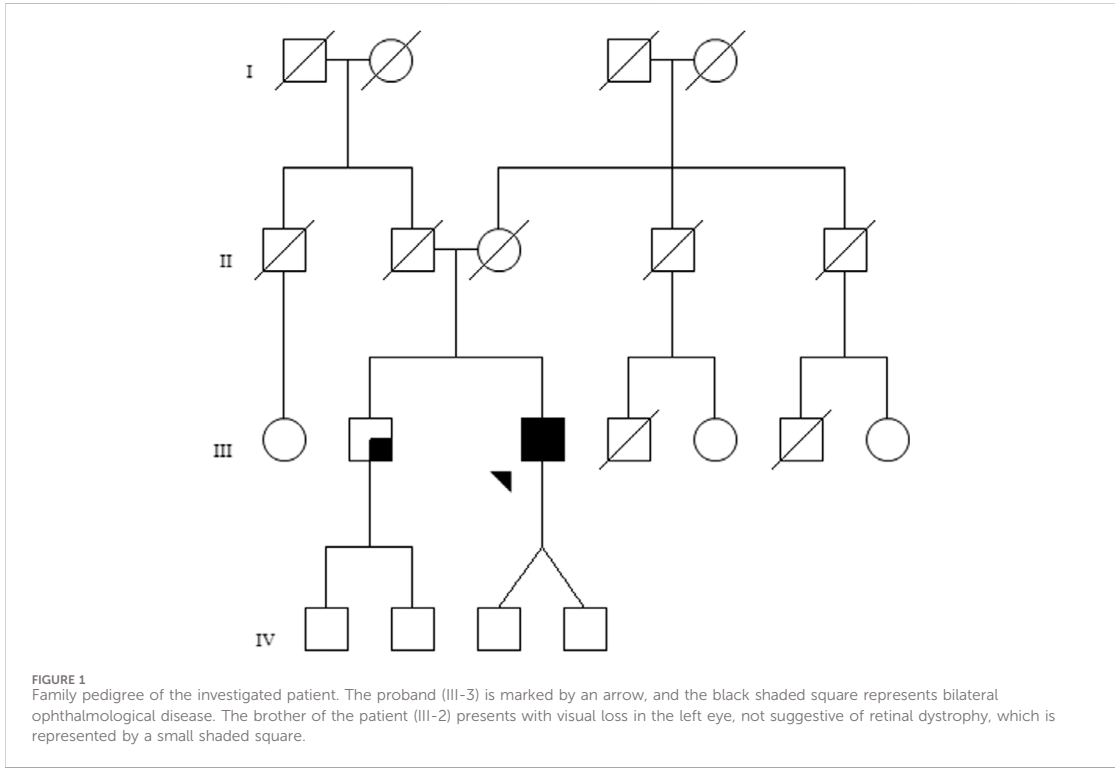
The study received the ethical approval (number PR014/22) from the Ethical Committee of the University Hospital of Bellvitge and adhered to the principles outlined in the Declaration of Helsinki (World Medical Association, 2013). Written informed consent for both the genetic analysis and the publication of the paper was obtained from the participating patient.

2.2 Whole-exome sequencing and analysis

Whole-exome sequencing (WES) was conducted with xGen Exome Panel v2.0 (Integrated DNA Technologies, Inc., Iowa, USA). The resulting genomic library was sequenced on a NovaSeq 6000 platform (Illumina, San Diego, USA), using a 2 × 100 bp paired-end module. Subsequent bioinformatic analysis was performed using the Data Genomics Exome pipeline (version v19.1) developed by Health in Code (Valencia, Spain). For copy number variation (CNV) analysis, VarSeq software (Golden Helix, Inc., Montana, USA) was used.

WES data were filtered by a virtual gene panel comprising 295 genes (Supplementary Data S1) associated with IRDs. Only variants with a read count greater than 20 and a frequency exceeding 30% were considered. Furthermore, variants were filtered based on a minor allele frequency of 1/500 in gnomAD v2.1.1 (Karczewski et al., 2020).

Variants showing a predicted deleterious effect on the encoded protein were retained for further analyses, with priority given to nonsense, frameshift, splice site, and missense variants. The impact of missense variants was evaluated through the REVEL *in silico* tool (Ioannidis et al., 2016). For assessing splice site variants, the following bioinformatics tools were used: SpliceAI (Jaganathan et al., 2019), MaxEntScan, and SPiP. The latter predictors were used through the MobiDetails platform (<https://mobidetails.iurc.montp.inserm.fr/MD/>) (Baux et al., 2021). The NMDescPredictor was used to predict whether the transcript might be subject to degradation by nonsense-mediated decay (NMD) or not (<https://nmdprediction.shinyapps.io/nmdescpredictor/>) (Coban-Akdemir et al., 2018).



To validate the identified variants and investigate their segregation, Sanger sequencing was used. This also aimed to ascertain whether the variants coexisted in the same allele (*cis* configuration) or in separate alleles (*trans* configuration).

2.3 Minigene splice assay

To confirm the pathogenicity of the *TULP1*(NM_003322.6): c.822G>T variant, which has the potential to impact splicing, a minigene splice assay was conducted. The assay was based on a previously described protocol (Rodríguez-Muñoz et al., 2022).

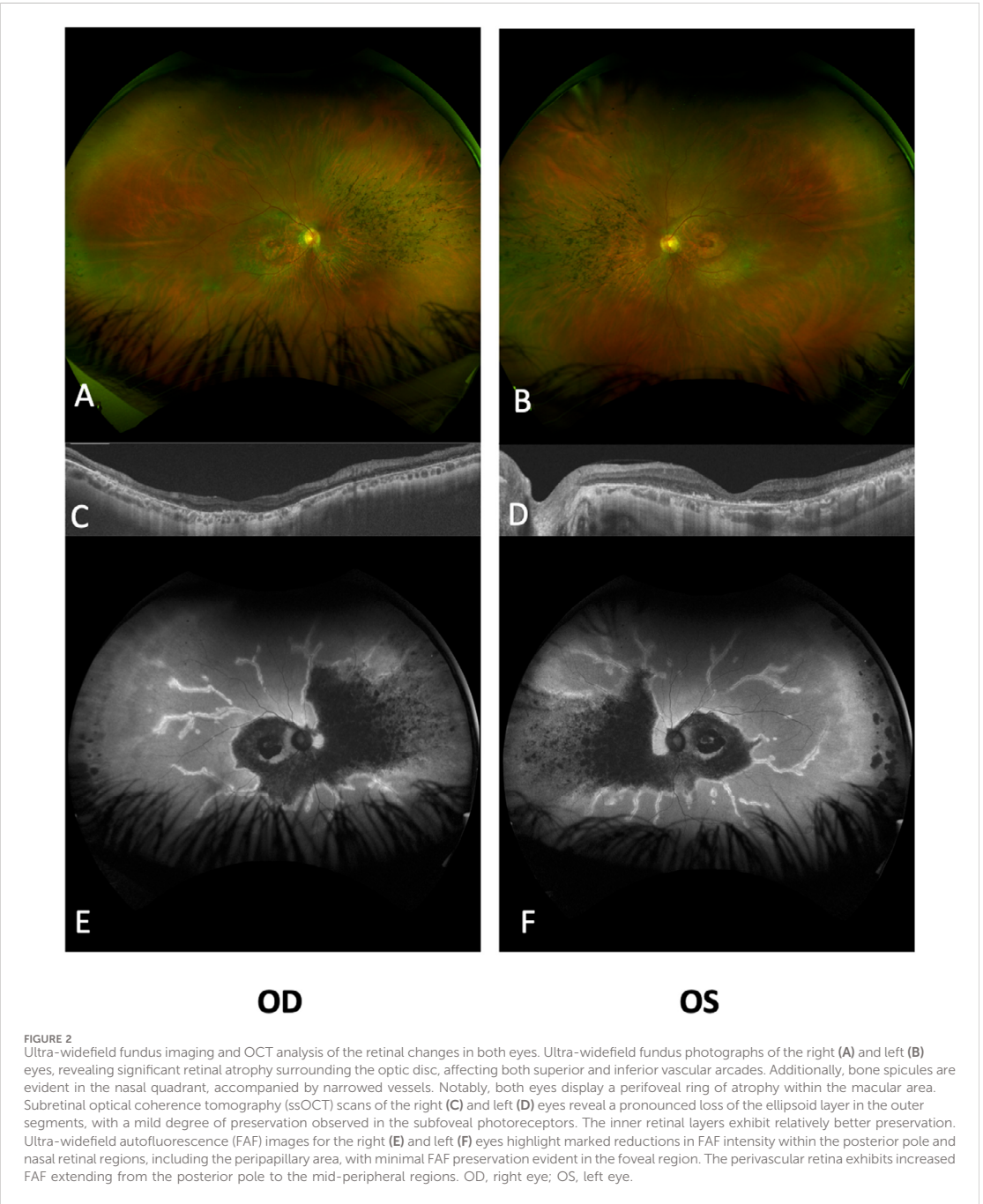
The exon containing the variant (exon 8) and approximately 250 bp of the adjacent 5' and 3' intronic regions were amplified from the patient's DNA using the Phusion High-Fidelity Polymerase enzyme (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The primers used for amplification also incorporated the restriction sites for the XhoI and NheI enzymes (Supplementary Table S1). These enzymes were subsequently used to digest both the pSPL3 vector (kindly provided by Dr. I. Botillo and Dr. S. Tufery-Giraud) and the purified amplicon. Following the purification of the digested products, the amplicon was inserted into the plasmid using T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific). NEB Stable competent *Escherichia coli* cells were transformed with vector construction by electroporation. Wild-type and mutant constructs were confirmed by Sanger sequencing. Then, two

replicates of the transfection were carried out as follows: 500 ng of wild-type and mutant constructs were separately transfected in HEK293 cells using the Lipofectamine™ 3000 reagent (Thermo Fisher Scientific). After 24 h, the cells were collected, and total RNA was isolated using the RNeasy Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany). RT-PCR was performed using the PrimeScript RT Reagent Kit (TaKaRa, Kusatsu, Japan). The cDNA was amplified with the FIREPol DNA Polymerase enzyme (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) using pSPL3-specific primers. The products were separated on a 2% agarose gel, and bands were purified with the QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). The results were analyzed by Sanger sequencing.

3 Results

3.1 Clinical description

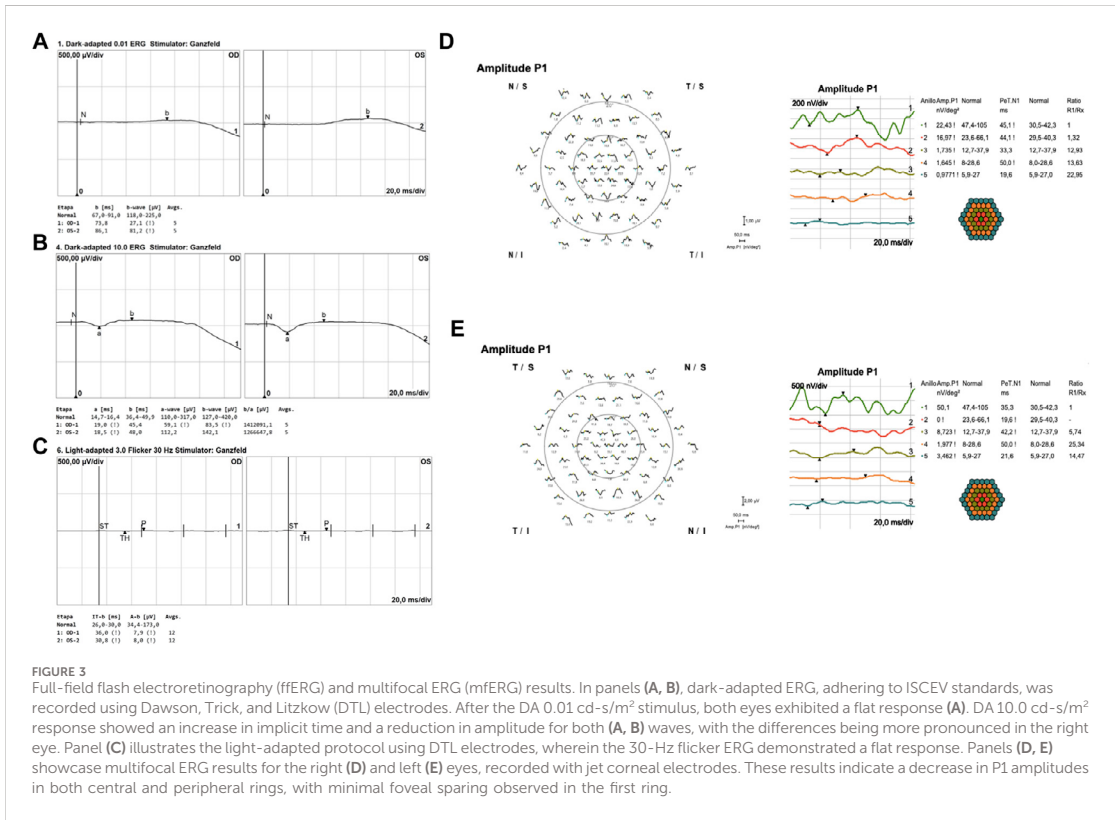
The family pedigree is shown in Figure 1. The proband, identified as III.3, is a 51-year-old Caucasian male who presented at our joint Ophthalmology-Genetics Clinic with a 10-year history of bilateral progressive vision loss and photophobia. He mentioned experiencing nyctalopia from the age of 20, which he attributed to his preexisting myopia and astigmatism. The patient's brother, a 59-year-old man, referred to be experiencing visual impairment in his left eye. No other



relevant ophthalmological family history was noted. The proband has two asymptomatic children.

Upon the initial ophthalmic evaluation of the proband, Snellen visual acuity measurements were 20/800 in the right

eye (OD) and 20/1600 in the left eye (OS). Anterior segment biomicroscopy revealed the presence of bilateral nuclear cataracts. Fundus examination unveiled a distinctive pattern of retinal pathology with an extensive atrophy of the retinal pigment



epithelium, notably between the arcades in the posterior pole accompanied by a mild preservation of the perifoveal retina, characteristic of a bull's eye maculopathy. The atrophic changes extended into the nasal region, progressing toward the equatorial retina, where some intraretinal spicule-shaped pigmentary deposits were discernible.

SD-OCT imaging confirmed foveal thinning, along with evident distortion and the loss of the outer nuclear layer, external limiting membrane, ellipsoid zone, and retinal pigment epithelium bilaterally. FAF imaging revealed a well-defined hypofluorescent area in the posterior pole and nasal retina, encircled by a hyperautofluorescent border. Additionally, a prominent increase in autofluorescence around the retinal arteries was observed in the equatorial retina, extending into the mid-peripheral region (Figure 2). The ffERG results revealed a diminished response in both scotopic and photopic protocols. MfERG displayed a notable absence of responses in the four peripheral rings, with residual responses in the central ring showing reduced amplitudes (Figure 3).

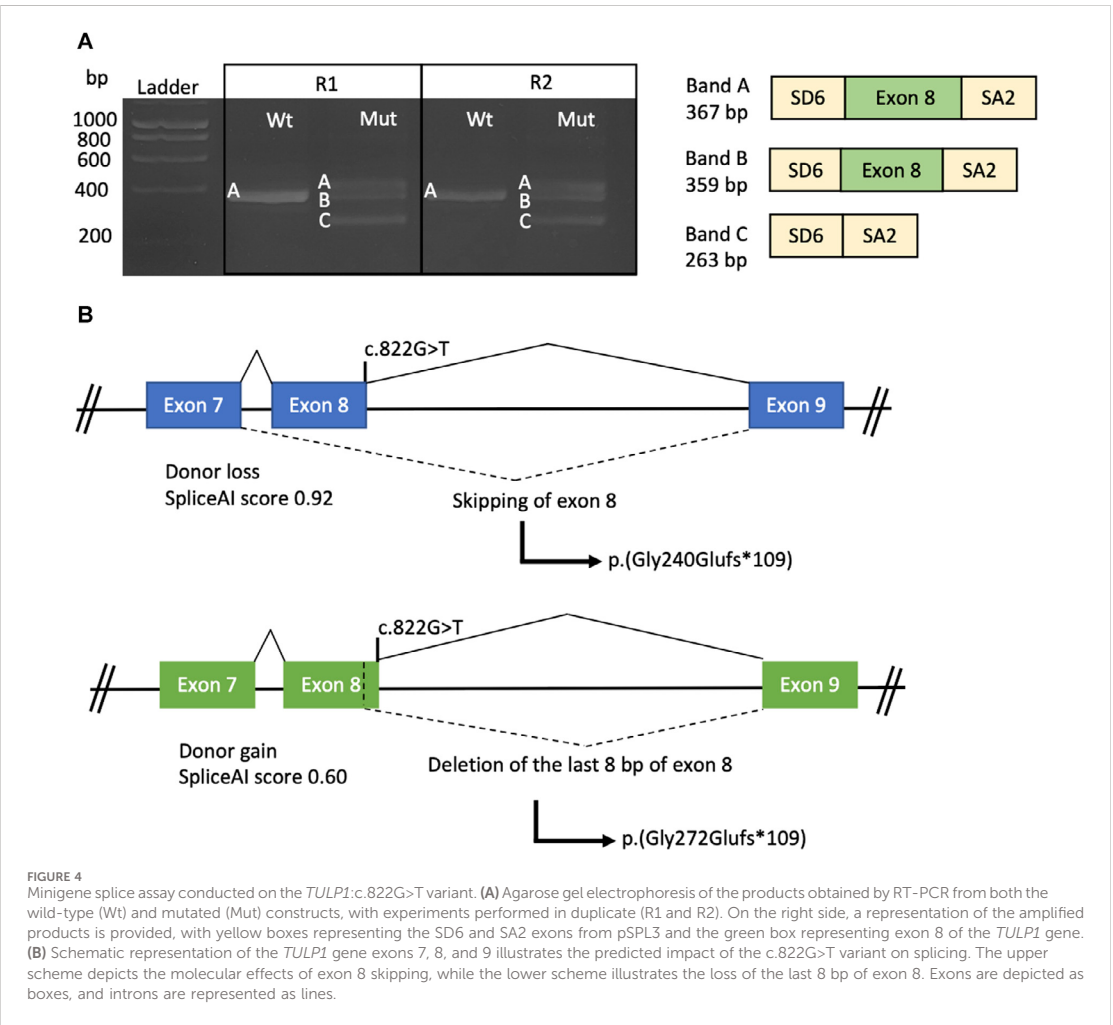
Comprehensive evaluation of the ophthalmic assessments and clinical symptoms led to the clinical diagnosis of cone-rod dystrophy in the patient.

An ophthalmic examination of the proband's brother, a 59-year-old man, revealed scarring with loss of macular photoreceptors in the left eye, without affecting the right eye, which is not suggestive of retinal dystrophy.

3.2 Identification of biallelic variants in the TULP1 gene

WES analysis identified a total of 36 variants after filtering the exome data for the 295 candidate IRD genes and applying a population allele frequency threshold of 1/500. Among these variants, only four were predicted to have potential deleterious effects on the corresponding proteins according to the REVEL score (Supplementary Table S2). Finally, two variants, *GUCY2D* (NM_000180.4):c.1664A>G and *NPHP4*(NM_015102.5):c.3630T>G, were excluded from further considerations. The former showed non-segregation with the disease within the family, while the latter was identified in a gene that follows an autosomal recessive inheritance pattern, lacking a second detected variant.

Two heterozygous variants within the *TULP1* gene emerged as the most promising candidates: an unreported variant, NM_003322.6:c.822G>T, and a previously described variant, NM_003322.6:c.1376T>C (Supplementary Table S2). The variant c.822G>T is a novel alteration located in exon 8/15, resulting on the substitution of a highly conserved lysine with asparagine at position 274 of the protein NP_003313.3:p.(Lys274Asn), located within the disordered domain of TULP1 (Supplementary Table S2). Importantly, this substitution is located on the final nucleotide of exon 8 and is predicted to impact the splicing process. *In silico*



splicing predictors suggested that the variant was likely to affect splicing (SpliceAI score 0.92, SPiP score 0.976, and MaxEntScan score -10.19), potentially leading to the loss of a donor splicing site and causing an exon skipping or the utilization of a cryptic splice site located eight nucleotides upstream (PP3-supporting). The variant was absent from gnomAD (PM2-supporting) (Supplementary Table S3). In line with the ACMG/AMP guidelines (Richards et al., 2015), the variant was initially classified as a variant of uncertain significance.

The second variant identified, c.1376T>C, is located in exon 14/15 within the *TULP1* gene, resulting in the amino acid substitution of a strongly conserved isoleucine with threonine at position 459 of the protein NP_003313.3:p.(Ile459Thr) (Supplementary Figure S1). This variant exhibits a low frequency in gnomAD v2.1.1 (allele frequency 0.000077 in the European non-Finnish population) (PM2-supporting). The *in silico* predictor REVEL suggests a deleterious impact on the protein, with a score of 0.865

(PP3-moderate). Notably, this variant is situated within the tubby domain, a known hotspot for *TULP1* variants (PM1-moderate). Furthermore, an alternative variant (chr6:35467877A>T, p.(Ile459Thr)) has been reported as pathogenic in the UniProt database (Bateman et al., 2023) (PM5-moderate). This variant has also been documented in the ClinVar database (Landrum et al., 2018) (VCF000194380.14), where it is classified as a variant of uncertain significance and likely benign (Supplementary Table S3). Additionally, the variant has been previously reported in several scientific articles (Wang et al., 2014; Ullah et al., 2016; Chen et al., 2018). In accordance with the ACMG/AMP guidelines, the variant was classified as likely pathogenic.

The segregation study conducted in the patient's brother demonstrated that the variants were located in different alleles (*trans* configuration) (Supplementary Figure S2). Although this finding supported the use of the PM3-moderate criterion for

classifying the c.822G>T variant, it still remained classified as a variant of uncertain significance.

3.3 Minigene splice assay results

All the *in silico* predictors mentioned above predicted an aberrant splicing of the *TULP1*(NM_003322.6):c.822G>T variant. To validate the variant’s functional impact, a minigene splice assay was conducted.

In the wild-type minigene, a fragment corresponding to the wild-type mRNA was observed (Figure 4A, band A—Wt). However, in the mutant minigene, three transcripts were observed: the wild-type transcript (Figure 4A, band A—Mut) and two aberrant transcripts. One aberrant transcript results from the exclusion of exon 8 attributed to the loss of the native donor splice site (Figure 4A, band C—Mut) (SpliceAI: 0.92). Conversely, the alternative band encompasses exon 8, except for the final 8 bp, stemming from the activation of a cryptic donor site (Figure 4A, band B—Mut) (SpliceAI: 0.60).

Regarding the protein-level effect, both aberrant transcripts would generate a change in the reading frame, resulting in a premature stop codon and a truncated protein (Figure 4B). Therefore, mRNA degradation of both transcripts could occur through NMD, according to the NMDescPredictor.

Based on these findings, the NM_003322.6:c.822G>T variant was reclassified as pathogenic as it met the criteria for PVS1 in accordance with the ClinGen SVI splicing group’s recommendations (Walker et al., 2023).

4 Discussion

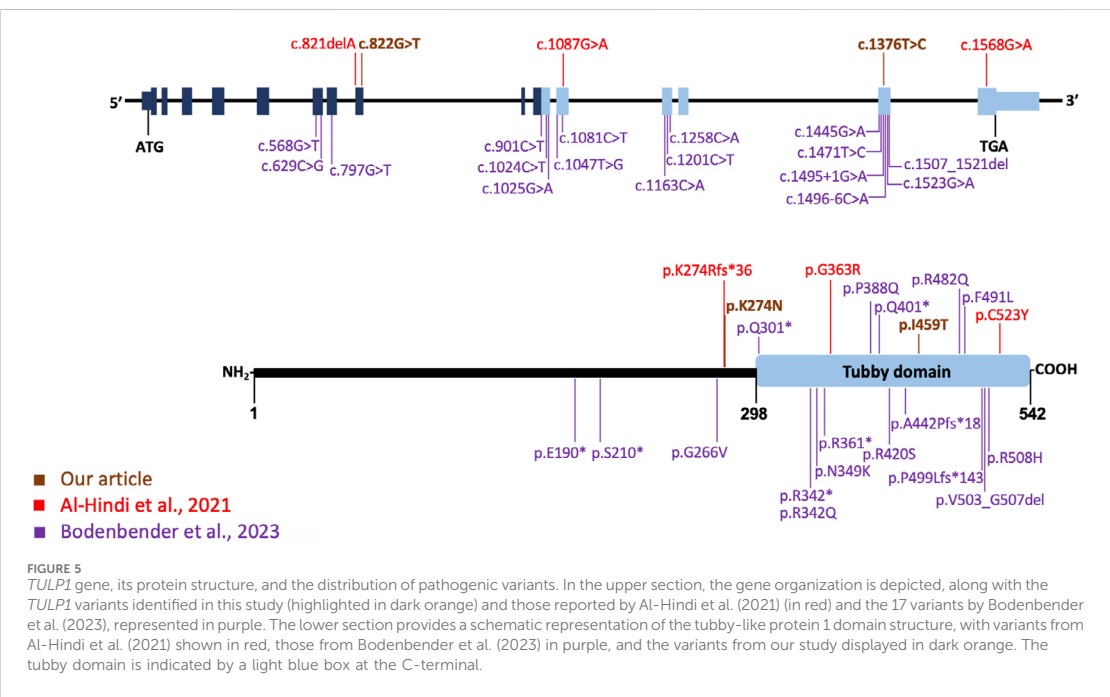
TULP1 is a crucial retinal protein for intracellular protein transport within photoreceptor cells. It has been associated with a wide range of retinal disorders including RP and early-onset RP, Leber congenital amaurosis, cone dystrophy, and rod-cone dystrophy (Banerjee et al., 1998; Hagstrom et al., 1998; Lobo et al., 2016; Woodard et al., 2021; den Hollander et al., 2007; Jacobson et al., 2014). Despite the diversity of associated conditions, consistent differences in clinical presentation attributed to specific *TULP1* variants, or their impacts on the protein have not been reported (North et al., 1997; Lobo et al., 2016; Remez et al., 2020; Jia et al., 2022). Notably, it has been suggested that patients carrying homozygous or compound heterozygous *TULP1* pathogenic variants, particularly those affecting the tubby domain and/or resulting in a loss-of-function (LOF) effect, typically exhibit a severe, early-onset form of retinal dystrophy (den Hollander et al., 2007; Jacobson et al., 2014; Jia et al., 2022; Mataftsi et al., 2007).

Here, we describe a patient presenting a novel *TULP1* gene variant (c.822G>T), which has been predicted to disrupt the splicing process. The variant is located within the disordered domain, for which structural information is currently lacking (Boggon et al., 1999; Lobo et al., 2016). In a hypothetical scenario where the protein is synthesized, it is possible that the tubby domain might be absent. Our minigene splice assays demonstrated that the c.822G>T variant induces exon 8 skipping, resulting in the formation of a premature

stop codon p.(Gly240Glufs*109). Alternatively, there is a possibility that, instead of exon skipping, the last eight base pairs of exon 8 are omitted, thereby leading to a premature stop codon p.(Gly272Glufs*109). In both scenarios, the introduction of a premature stop codon is likely to activate the NMD mechanism, ultimately resulting in the absence of protein production from this allele (Figure 4B). Similarly, Bodenbender et al. (2023) performed minigene assays for the c.1495+1G>A and c.1496–6C>A *TULP1* variants. In both cases, the variants were predicted to induce frameshift variants and premature termination codons, leading to the probable degradation of the mutant transcript via the NMD mechanism. The first variant achieved this by inducing exon 14 skipping and the insertion of 17 amino acids p.(Ala442Profs*18), while the second variant activated a cryptic acceptor site p.(Pro499Leufs*143). Further functional studies would be required in retinal cells to establish the pathogenic mechanism, considering that splicing is specific to the tissue.

On the other hand, the c.1376T>C, p.(Ile459Thr) variant induces a substitution at amino acid position 459, replacing an isoleucine with a threonine. This change entails a shift from a hydrophobic side chain to a polar one, which could potentially affect protein stability or induce misfolding (Lobo et al., 2016). The variant p.(Ile459Thr) is located in the tubby domain of TULP1, which has previously been shown to exhibit DNA-binding activity and function as a transcription factor (Carroll et al., 2004). Missense variants situated in the tubby domain are expected to accumulate at the endoplasmic reticulum, potentially activating the unfolded protein response, which can promote apoptosis and photoreceptor cell death (Jia et al., 2022). Interestingly, the variant c.1376T>C has been previously reported in *trans* with the c.1112+2T>C variant in a patient with non-syndromic RP (Wang et al., 2014). Although both our patient and the patient reported by Wang et al. (2014) present the same missense variant (c.1376T>C) affecting the tubby domain and another variant that causes LOF, their phenotypes are markedly distinct, illustrating the significant variability in patients with *TULP1* variants.

Our case exhibits bull’s eye maculopathy characterized by perivascular pigmentation and increased autofluorescence around retinal vessels (Figure 2). This phenotype corresponds to observations detailed by Al-Hindi et al. (2022), who reported a similar distinctive phenotype in two patients with cone dysfunction and a perivascular pattern of retinal degeneration. Case 1 in Al-Hindi et al. (2022) displays a clinical and FAF appearance remarkably similar to our patient, both in progression and test outcomes. However, notable differences exist, such as a greater degree of macular atrophy in our patient, potentially linked to the older age of our subject (51 years vs. 19 years). Remarkably, case 1 is a homozygous carrier of the p.(Gly363Arg) missense variant impacting the tubby domain (Figure 5). The second case in Al-Hindi et al. (2022) shares similarities with our case in terms of the bull’s eye maculopathy. The FAF also suggests periarteriolar hyperautofluorescence. Interestingly, case 2 shares a genotype composition similar to our patient, carrying a missense variant (p.(Cys523Tyr)) affecting the tubby domain, alongside a LOF variant (p.(Lys274ArgfsTer36)). In contrast to cases described by Al-Hindi et al. (2022), our patient lacks pigment clumps surrounding vessels and shows no signs of perivascular choroidal atrophy. However, the distinct pattern of periarterial degeneration



observed in both our case and Al-Hindi et al. (2022) cases has not been documented in other studies.

Bodenbender et al. (2023) reported a total of 17 different *TULP1* pathogenic variants, categorized as missense, splice site, and nonsense variants, and one in-frame deletion. All documented variants, except the missense variant p.(Gly266Val), either affected the tubby domain or led to LOF (Figure 5). The p.(Gly266Val) variant, identified in *trans* with a LOF *TULP1* variant, was associated with cone dystrophy in a male patient (P15 in their series) diagnosed at age 40. This suggests that missense variants like p.(Gly266Val), not affecting the tubby domain, may result in a relatively mild reduction of protein activity and a later-onset phenotype. When comparing our case with those in Bodenbender et al. (2023) series, participant P17 stands out as the most analogous, exhibiting bull’s eye maculopathy. Although P17’s retinography only captures the central 50°, there is no apparent perivascular hyperautofluorescence pattern. Similarly, on OCT, mirroring our case, outer segments are visible, although with foveal discontinuity.

In this study, we present a single case of a patient with compound heterozygous *TULP1* variants. The prevalence of biallelic pathogenic *TULP1* variants is remarkably low, accounting for less than 1% of reported non-syndromic IRD cases, as documented in GeneReviews (Fahim et al., 2023; Kumaran et al., 2023). Within our extensive cohort of over 1,000 pediatric and adult patients diagnosed with IRDs, we have identified an additional case, distinct from the one presented here, with confirmed *TULP1* pathogenic variants (internal data). Our findings align with the existing literature, which documents only 78 patients with *TULP1*-associated IRDs from 44 families

(Hagstrom et al., 1998; Ullah et al., 2016; Bodenbender et al., 2023; Woodard et al., 2021; den Hollander et al., 2007). This collective evidence underscores the limited occurrence of such cases, reinforcing the distinctive nature of our reported case.

Additional factors have been suggested to contribute to the variable clinical presentation observed in *TULP1*-related IRDs, including protein misfolding (Bodenbender et al., 2023), environmental factors or the influence of genetic modifiers (Meyer and Anderson, 2017). *MAP1A* has been suggested as a modifier gene for *TULP1* in a mouse model (Maddox et al., 2012; Youn et al., 2022), offering protective effects and elucidating variations in disease manifestation. However, the analysis of the *MAP1A* gene in our patient revealed five homozygous variants (Supplementary Table S4) with a high population frequency, predicted to have no impact on the protein. Consequently, these variants may not significantly influence the patient’s phenotype. Nevertheless, exploring the *MAP1A* gene on all patients with biallelic variants in *TULP1* would be of great interest to determine if there are specific variants associated with a protective effect or those linked to a more severe phenotype.

To gain a deeper insight into the pathogenesis and variations in the phenotype, further investigations should be conducted using animal models of the retina. Additionally, these studies can contribute to the development of gene therapies, similar to those that have been successfully developed for other IRDs (Russell et al., 2017). Efforts have been made for *TULP1*, although a supplementation therapy trial targeting photoreceptors in *Tulp1*^{−/−} mouse retinas demonstrated limited effectiveness (Palfi et al., 2020). This study is still crucial to increase our understanding

of the phenotypic traits of the disease. This knowledge forms the basis for early diagnosis and future therapies.

In conclusion, we described a patient with biallelic *TULP1* variants, displaying an atypical perivascular pattern of retinal degeneration. Furthermore, we illustrated that the variant c.822G>T induces aberrant splicing, resulting in either exon 8 skipping or the loss of the last 8 bp of exon 8, both culminating in LOF. The molecular characterization of the c.822G>T variant allowed its reclassification, establishing its pathogenic effect. This highlights the importance of conducting functional studies on variants situated outside canonical splice sites that still show potential to impact splicing.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in [Supplementary Material](#).

Ethics statement

The studies involving humans were approved by the Ethical Committee of the University Hospital of Bellvitge. The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participant(s) provided their written informed consent to participate in this study. Written informed consent was obtained from the individual(s) for the publication of any potentially identifiable images or data included in this article.

Author contributions

AE-G: conceptualization, investigation, project administration, and writing—original draft. EC: conceptualization, supervision, and writing—review and editing. CS: writing—review and editing. AP-M: writing—review and editing. JC-M: writing—review and editing. PB-M: investigation and writing—review and editing. JM: writing—review and editing. GG-G: investigation and writing—review and editing. CA: conceptualization, supervision, and writing—review and editing.

References

Al-Hindi, H., Chauhan, M. Z., Sanders, R., Samarah, H., DeBenedictis, M., Traboulsi, E., et al. (2022). *TULP1* related retinal dystrophy: report of rare and novel variants with a previously undescribed phenotype in two cases. *Ophthalmic Genet.* 43 (2), 277–281. doi:10.1080/13816810.2021.2010769

Banerjee, P., Kleyn, P. W., Knowles, J. A., Lewis, C. A., Ross, B. M., Parano, E., et al. (1998). *TULP1* mutation in two extended Dominican kindreds with autosomal recessive Retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 18 (2), 177–179. doi:10.1038/ng0298-177

Bateman, A., Martin, M. J., Orchard, S., Magrane, M., Ahmad, S., Alpi, E., et al. (2023). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res.* 51 (D1), D523–D531. doi:10.1093/nar/gkac1052

Baux, D., Van Goethem, C., Ardouin, O., Guignard, T., Bergougnoux, A., Koenig, M., et al. (2021). MobiDetails: online DNA variants interpretation. *Eur. J. Hum. Genet.* 29 (2), 356–360. doi:10.1038/s41431-020-00755-z

Bianco, L., Arrigo, A., Antropoli, A., Manitto, M. P., Martina, E., Aragona, E., et al. (2023). Association between genotype and phenotype severity in *ABCA4* -associated retinopathy. *JAMA Ophthalmol.* 141 (9), 826–833. doi:10.1001/jamaophthalmol.2023.3188

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and co-funded by the European Union (Grant No. CP22/00028 and Grant No. PI22/01371 to GG-G, Grant No. PI22/00213 to JM), Ministerio de Universidades (Grant No. FPU20/04736 to PB-M) and Comité de Recerca, Hospital Universitari de Bellvitge (Grant No. PUB22015 to EC).

Acknowledgments

The authors thank the patient for his participation in this study and Health in Code for performing the sequencing analysis on the proband’s sample. We thank CERCA Programme/Generalitat de Catalunya for institutional support.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher’s note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors, and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2024.1352063/full#supplementary-material>

Bodenbender, J. P., Marino, V., Bethge, L., Stingl, K., Haack, T. B., Biskup, S., et al. (2023). Biallelic variants in *TULP1* are associated with heterogeneous phenotypes of retinal dystrophy. *Int. J. Mol. Sci.* 24 (3), 2709. doi:10.3390/ijms24032709

Boggon, T. J., Shan, W. S., Santagata, S., Myers, S. C., and Shapiro, L. (1999). Implication of tubby proteins as transcription factors by structure-based functional analysis. *Science* 286 (5447), 2119–2125. doi:10.1126/science.286.5447.2119

Carroll, K., Gomez, C., and Shapiro, L. (2004). Tubby proteins: the plot thickens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (1), 55–63. doi:10.1038/nrm1278

Chen, X., Sheng, X., Liu, Y., Li, Z., Sun, X., Jiang, C., et al. (2018). Distinct mutations with different inheritance mode caused similar retinal dystrophies in one family: a demonstration of the importance of genetic annotations in complicated pedigrees. *J. Transl. Med.* 16 (1), 145. doi:10.1186/s12967-018-1522-7

Coban-Akdemir, Z., White, J. J., Song, X., Jhangiani, S. N., Fatih, J. M., Gambin, T., et al. (2018). Identifying genes whose mutant transcripts cause dominant disease traits by potential gain-of-function alleles. *Am. J. Hum. Genet.* 103 (2), 171–187. doi:10.1016/j.ajhg.2018.06.009

den Hollander, A. I., van Lith-Verhoeven, J. J. C., Arends, M. L., Strom, T. M., Cremers, F. P. M., and Hoyng, C. B. (2007). Novel compound heterozygous *TULP1* mutations in a family with severe early-onset retinitis pigmentosa. *Archives Ophthalmol.* 125 (7), 932–935. doi:10.1001/archophth.125.7.932

Fahim, A. T., Daiger, S. P., and Weleber, R. G. (2023). “Nonsyndromic retinitis pigmentosa overview,” in *GeneReviews*® - NCBI bookshelf (University of Washington, Seattle: GeneReviews).

García Bohórquez, B., Aller, E., Rodríguez Muñoz, A., Jaijo, T., García García, G., and Millán, J. M. (2021). Updating the genetic landscape of inherited retinal dystrophies. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 9. doi:10.3389/fcell.2021.645600

Hagstrom, S. A., Adamian, M., Scimeca, M., Pawlyk, B. S., Yue, G., and Li, T. (2001). A role for the Tubby-like protein 1 in rhodopsin transport. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (9), 1955–1962.

Hagstrom, S. A., North, M. A., Nishina, P. M., Berson, E. L., and Dryja, T. P. (1998). Recessive mutations in the gene encoding the tubby-like protein *TULP1* in patients with Retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 18 (2), 174–176. doi:10.1038/ng0298-174

Hanany, M., Rivolta, C., and Sharon, D. (2020). Worldwide carrier frequency and genetic prevalence of autosomal recessive inherited retinal diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117 (5), 2710–2716. doi:10.1073/pnas.1913179117

Ikeda, A., Nishina, P. M., and Naggert, J. K. (2002). The tubby-like proteins, a family with roles in neuronal development and function. *J. Cell Sci.* 115 (1), 9–14. doi:10.1242/jcs.115.1.9

Ikeda, S., He, W., Ikeda, A., Naggert, J. K., North, M. A., and Nishina, P. M. (1999). Cell-specific expression of tubby gene family members (tub, *Tulp1*,2, and 3) in the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40 (11), 2706–2712.

Ioannidis, N. M., Rothstein, J. H., Pejaver, V., Middha, S., McDonnell, S. K., Baheti, S., et al. (2016). REVEL: an ensemble method for predicting the pathogenicity of rare missense variants. *Am. J. Hum. Genet.* 99 (4), 877–885. doi:10.1016/j.ajhg.2016.08.016

Jacobson, S. G., Cideciyan, A. V., Huang, W. C., Sumaroka, A., Roman, A. J., Schwartz, S. B., et al. (2014). *TULP1* mutations causing early-onset retinal degeneration: preserved but insensitive macular cones. *Investigative Ophthalmology Vis. Sci.* 55 (8), 5354–5364. doi:10.1167/iovs.14-14570

Jaganathan, K., Kyriazopoulou Panagiotopoulou, S., McRae, J. F., Darbandi, S. F., Knowles, D., Li, Y. L., et al. (2019). Predicting splicing from primary sequence with deep learning. *Cell* 176 (3), 535–548. doi:10.1016/j.cell.2018.12.015

Jia, D., Gao, P., Lv, Y., Huang, Y., Reilly, J., Sun, K., et al. (2022). *Tulp1* deficiency causes early-onset retinal degeneration through affecting ciliogenesis and activating ferroptosis in zebrafish. *Cell Death Dis.* 13 (11), 962. doi:10.1038/s41419-022-05372-w

Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alfoldi, J., Wang, Q., et al. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 581 (7809), 434–443. doi:10.1038/s41586-020-2308-7

Kumaran, N., Pennesi, M. E., and Yang, P. (2023). “Leber congenital amaurosis,” in *Early-onset severe retinal dystrophy overview* (University of Washington, Seattle: GeneReviews).

Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G. R., Chao, C., Chitipiralla, S., et al. (2018). ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 46 (D1), D1062–D1067. doi:10.1093/nar/gkx1153

Li, S., Datta, S., Brabbit, E., Love, Z., Woytowicz, V., Flattery, K., et al. (2021). Nr2e3 is a genetic modifier that rescues retinal degeneration and promotes homeostasis in multiple models of retinitis pigmentosa. *Gene Ther.* 28 (5), 223–241. doi:10.1038/s41434-020-0134-z

Lobo, G. P., Au, A., Kiser, P. D., and Hagstrom, S. A. (2016). Involvement of endoplasmic reticulum stress in *TULP1* induced retinal degeneration. *PLoS One* 11 (3), e0151806. doi:10.1371/journal.pone.0151806

Maddox, D. M., Ikeda, S., Ikeda, A., Zhang, W., Krebs, M. P., Nishina, P. M., et al. (2012). An allele of microtubule-associated protein 1A (*Mtap1a*) reduces photoreceptor degeneration in *Tulp1* and *tub* mutant mice. *Investigative Ophthalmology Vis. Sci.* 53 (3), 1663–1669. doi:10.1167/iovs.11-8871

Mataftsi, A., Schorderet, D. F., Chachoua, L., Boussalah, M., Nouri, M. T., Barthelmes, D., et al. (2007). Novel *TULP1* mutation causing leber congenital amaurosis or early onset retinal degeneration. *Investigative Ophthalmology Vis. Sci.* 48 (11), 5160–5167. doi:10.1167/iovs.06-1013

McCulloch, D. L., Marmor, M. F., Brigell, M. G., Hamilton, R., Holder, G. E., Tzekov, R., et al. (2015). ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update). *Doc. Ophthalmol.* 130 (1), 1–12. doi:10.1007/s10633-014-9473-7

Meyer, K. J., and Anderson, M. G. (2017). Genetic modifiers as relevant biological variables of eye disorders. *Hum. Mol. Genet.* 26 (R1), R58–R67. doi:10.1093/hmg/ddx180

Nishina, P. M., North, M. A., Ikeda, A., Yan, Y., and Naggert, J. K. (1998). Molecular characterization of a novel tubby gene family Member, *TULP3*, in mouse and humans. *Genomics* 54 (2), 215–220. doi:10.1006/geno.1998.5567

North, M. A., Naggert, J. K., Yan, Y., Noben-Trauth, K., and Nishina, P. M. (1997). Molecular characterization of *TUB*, *TULP1*, and *TULP2*, members of the novel tubby gene family and their possible relation to ocular diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (7), 3128–3133. doi:10.1073/pnas.94.7.3128

Palfi, A., Yesmambetov, A., Millington-Ward, S., Shortall, C., Humphries, P., Kenna, P. F., et al. (2020). AAV-delivered *Tulp1* supplementation therapy targeting photoreceptors provides minimal benefit in *Tulp1*–/– retinas. *Front. Neurosci.* 14, 14. doi:10.3389/fnins.2020.00891

Perea-Romero, I., Gordo, G., Iancu, I. F., Del Pozo-Valero, M., Almoguera, B., Blanco-Kelly, F., et al. (2021). Genetic landscape of 6089 inherited retinal dystrophies affected cases in Spain and their therapeutic and extended epidemiological implications. *Sci. Rep.* 11 (1), 1526. doi:10.1038/s41598-021-81093-y

Remez, L., Cohen, B., Nevet, M. J., Rizel, L., and Ben-Yosef, T. (2020). *TULP1* and *TUB* are required for specific localization of PRCD to photoreceptor outer segments. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (22), 8677. doi:10.3390/ijms21228677

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., et al. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American college of medical genetics and genomics and the association for molecular pathology. *Genet. Med.* 17 (5), 405–424. doi:10.1038/gim.2015.30

Rodriguez-Muñoz, A., Liquori, A., García-Bohorquez, B., Jaijo, T., Aller, E., Millán, J. M., et al. (2022). Functional assays of non-canonical splice-site variants in inherited retinal dystrophies genes. *Sci. Rep.* 12 (1), 68. doi:10.1038/s41598-021-03925-1

Russell, S., Bennett, J., Wellman, J. A., Chung, D. C., Yu, Z. F., Tillman, A., et al. (2017). Efficacy and safety of voretigene neparovvec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 390 (10097), 849–860. doi:10.1016/S0140-6736(17)31868-8

Smirnov, V. M., Nassisi, M., Solis Hernandez, C., Méjécace, C., El Shamieh, S., Condroyer, C., et al. (2021). Retinal phenotype of patients with isolated retinal degeneration due to *CLN3* pathogenic variants in a French retinitis pigmentosa cohort. *JAMA Ophthalmol.* 139 (3), 278–291. doi:10.1001/jamaophthalmol.2020.6089

Ullah, I., Kabir, F., Iqbal, M., Gottsch, C. B. S., Naeem, M. A., Assir, M. Z., et al. (2016). Pathogenic mutations in *TULP1* responsible for retinitis pigmentosa identified in consanguineous familial cases. *Mol. Vis.* 22, 797–815.

Walker, L. C., Hoya, M. de la, Wiggins, G. A. R., Lindy, A., Vincent, L. M., Parsons, M. T., et al. (2023). Using the ACMG/AMP framework to capture evidence related to predicted and observed impact on splicing: recommendations from the ClinGen SV1 Splicing Subgroup. *Am. J. Hum. Genet.* 110 (7), 1046–1067. doi:10.1016/j.ajhg.2023.06.002

Wang, F., Wang, H., Tuan, H. F., Nguyen, D. H., Sun, V., Keser, V., et al. (2014). Next generation sequencing-based molecular diagnosis of retinitis pigmentosa: identification of a novel genotype-phenotype correlation and clinical refinements. *Hum. Genet.* 133 (3), 331–345. doi:10.1007/s00439-013-1381-5

Woodard, D. R., Xing, C., Ganne, P., Liang, H., Mahindrakar, A., Sankurathri, C., et al. (2021). A novel homozygous missense mutation p.P388S in *TULP1* causes protein instability and retinitis pigmentosa. *Mol. Vis.* 2 (27), 179–190.

World Medical Association (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 310 (20), 2191–2194. doi:10.1001/jama.2013.281053

Youn, S. Y., Min, H., Jeong, S. R., Lee, J., Moon, S. J., Bok, J., et al. (2022). Microtubule-associated protein 1 A and tubby act independently in regulating the localization of stereocilin to the tips of inner ear hair cell stereocilia. *Mol. Brain* 15 (1), 80. doi:10.1186/s13041-022-00966-z



Supplementary Material

1 Supplementary Data

List of the 295 genes currently associated with inherited retinal dystrophies sourced from RetNet (<https://web.sph.uth.edu/RetNet/>; accessed on January 2024):

ABCA4, ABCC6, ABHD12, ACBD5, ACO2, ADAM9, ADAMTS18, ADGRA3, ADGRV1, ADIPOR1, AFG3L2, AGBL5, AH11, AHR, AIPL1, ALMS1, ARHGEF18, ARL2BP, ARL3, ARL6, ARMS2, ARSG, ASRGL1, ATF6, ATOH7, ATXN7, BBS1, BBS10, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS9, BCM, BEST1, CIQTNF5, C2, C3, CA4, CABP4, CACNA1F, CACNA2D4, CAPN5, CC2D2A, CCT2, CDH15, CDH23, CDHR1, CEP164, CEP19, CEP250, CEP290, CEP78, CERKL, CFAP410, CFAP418, CFB, CFH, CHM, CIB2, CISD2, CLCC1, CLN3, CLRN1, CLUAP1, CNGA1, CNGA3, CNGB1, CNGB3, CNNM4, COG6, COL11A1, COL2A1, COL9A1, CRB1, CRX, CSPPI, CTNNA1, CWC27, CYP4V2, DHDDS, DHX38, DMD, DRAM2, DTHD1, DYNC2H1, DYNC2I2, EFEMP1, ELOVL1, ELOVL4, EMC1, ENSA, ERCC6, ESPN, EXOSC2, EYS, FBLN5, FLVCR1, FSCN2, FZD4, GDF6, GNAT1, GNAT2, GNB3, GNPTG, GPR179, GRK1, GRM6, GUCA1A, GUCA1B, GUCY2D, HARS1, HGSNAT, HK1, HMCN1, HMX1, HTRA1, IDH3B, IFT140, IFT172, IFT27, IFT81, IMPDH1, IMPG1, IMPG2, INVS, IQCB1, ITM2B, JAG1, KCNJ13, KCNV2, KIAA1549, KIF11, KIF3B, KIZ, KLHL7, LAMA1, LCA5, LRAT, LRIT3, LRP5, LZTFLI, MAK, MAPKAPK3, MERTK, MFN2, MFRP, MFSD8, MIEF1, MIR204, MKKS, MKS1, MMP19, MT-ATP6, MT-ND4, MTRFR, MT-TH, MT-TL1, MT-TP, MT-TS2, MVK, MYO7A, NBAS, NDP, NEK2, NEUROD1, NMNAT1, NPHP1, NPHP3, NPHP4, NR2E3, NR2F1, NRL, NYX, OAT, OFD1, OPA1, OPA3, OPN1LW, OPN1MW, OPN1SW, OR2W3, OTX2, PANK2, PAX2, PCARE, PCDH15, PCYT1A, PDE6A, PDE6B, PDE6C, PDE6G, PDE6H, PDZD7, PEX1, PEX2, PEX7, PGK1, PHYH, PITPNM3, PLA2G5, PLK4, PMPCA, PNPLA6, POC1B, POC5, POMGNT1, PPT1, PRCD, PRDM13, PROM1, PROS1, PRPF3, PRPF31, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPH2, PRPS1, RAB28, RAX2, RB1, RBP3, RBP4, RCBT1, RD3, RDH11, RDH12, RDH5, REEP6, RGR, RGS9, RGS9BP, RHO, RIMS1, RIMS2, RLB1, ROM1, RP1, RP1L1, RP2, RP9, RPE65, RPGR, RPGRIP1, RPGRIP1L, RSI, RTN4IP1, SAG, SAMD11, SDCCAG8, SEMA4A, SLC24A1, SLC25A46, SLC38A8, SLC4A7, SLC7A14, SNRNP200, SPATA7, SPP2, TEAD1, TIMM8A, TIMP3, TLR3, TLR4, TMEM126A, TMEM216, TMEM237, TOPORS, TREX1, TRIM32, TRNT1, TRPM1, TSPAN12, TTC8, TTLL10, TTPA, TUB, TUBGCP4, TUBGCP6, TULP1, UNC119, USH1C, USH1G, USH2A, VCAN, WDPCP, WDR19, WFS1, WHRN, ZNF408, ZNF423, ZNF513.

2 Supplementary Figures and Tables

2.1 Supplementary Tables

Supplementary Table S1. Primers used to amplify the *TULP1*:c.822G>T variant. The tail added to the primers is indicated in lowercase letters and the restriction sites of the enzymes are indicated in bold in both the direct primer XhoI and in the reverse NheI.

Primer	Sequence (5' to 3')
TULP1 8D minigen	aagaat CTCGAGGCATACAAGACAGT GCTAGG
TULP1 8R minigen	aagaat GCTAGCAGAGGGGAGGCCTCAGAG

Supplementary Table S2. Variants obtained after filtering WES data.

Gene	Genomic coordinates (hg19)	Nucleotide change	Amino acid change	Variant type	Zigosity	ACMG classification
<i>GUCY2D</i>	chr17:7911346A>G	NM_000180.4:c.1664A>G	NP_000171.1:p.(Tyr555Cys)	Missense	Het	Variant of uncertain significance
<i>NPHP4</i>	chr1:5926447A>C	NM_015102.5:c.3630T>G	NP_055917.1:p.(Phe1210Leu)	Missense	Het	Variant of uncertain significance
<i>TULP1</i>	chr6:35476986C>A	NM_003322.6:c.822G>T	NP_003313.3:p.(Lys274Asn)	Missense	Het	Variant of uncertain significance
<i>TULP1</i>	chr6:35467877A>G	NM_003322.6:c.1376T>C	NP_003313.3:p.(Ile459Thr)	Missense	Het	Likely pathogenic

Supplementary Table S3. *TULP1* variants identified in our patient.

Nucleotide change (NM_003322.6)	Amino acid change (NP_003313.3)	Exon location	Variant type	dbSNP	gnomAD MAF	REVEL score	SpliceAI score	Conservation score PhyloP100	Published
c.822G>T	p.(Lys274Asn)	8/15	missense	-	-	-	0.92	4.522	No
c.1376T>C	p.(Ile459Thr)	14/15	missense	rs121909075	0.000077	0.865	-	7.491	Yes (4;22;23)

gnomAD, Genome Aggregation Database; MAF, minor allele frequency; REVEL, Rare Exome Variant Ensemble Learner

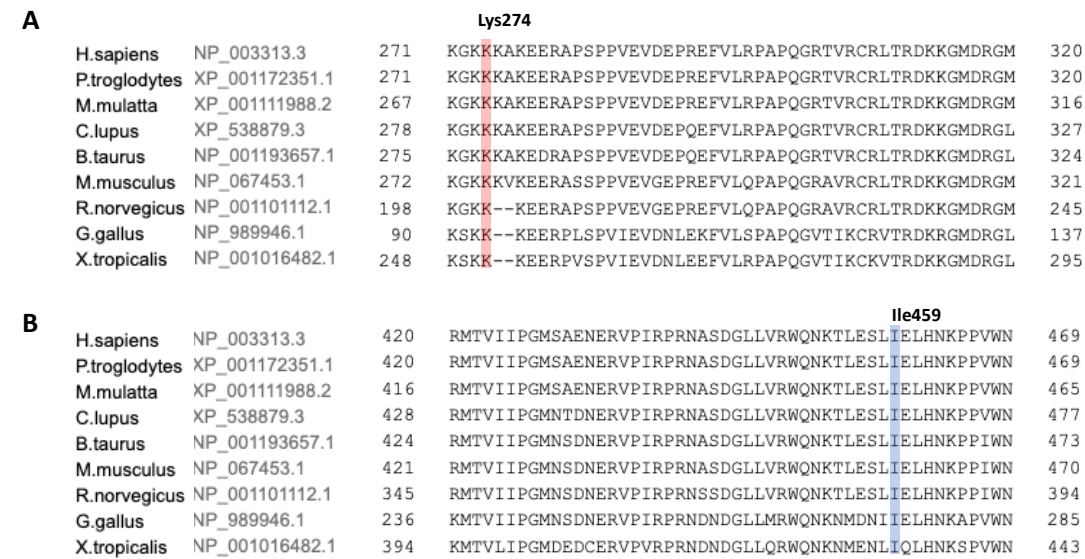
Supplementary Table S4. Variants identified in the modifier gene *MAP1A*.

Nucleotide change (NM_002373.5)	Amino acid change (NP_002364.5)	Exon location	Variant type	Zigosity	dbSNP	gnomAD MAF	REVEL score	SpliceAI score
c.3733G>A	p.(Asp1245Asn)	4/6	missense	Hom	rs12912505	0.1529	0.108	-
c.4408G>A	p.(Ala1470Thr)	4/6	missense	Hom	rs62020612	0.16313	0.039	-
c.2328C>T	p.(Pro776Pro)	4/6	synonymous	Hom	rs3862138	0.16145	-	0
c.3246G>A	p.(Gly1082Gly)	4/6	synonymous	Hom	rs1060939	0.35786	-	0
c.3735T>C	p.(Asp1245Asp)	4/6	synonymous	Hom	rs480108	0.35784	-	0

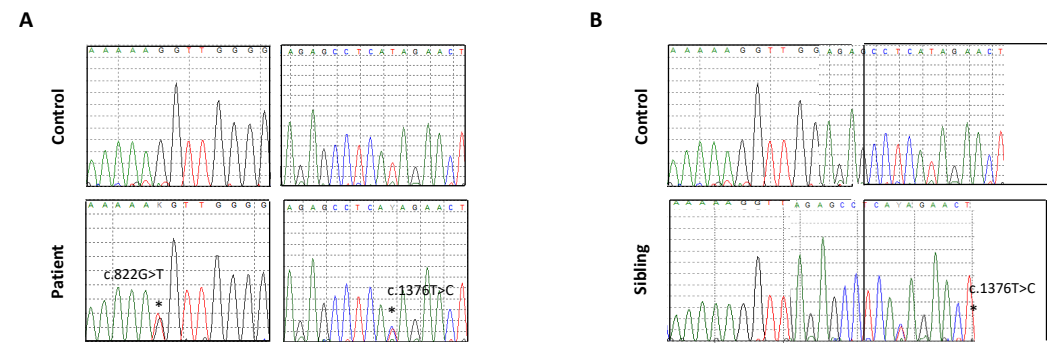
3 Data availability

The datasets presented in this study can be found in the ENA online repository, accession number PRJEB70601.

2.2 Supplementary Figures



Supplementary Figure S1. Conservation analysis of the variant identified in *TULP1* gene. **(A)** Multiple sequence alignment showing the conservation of amino acid Lys274 in TULP1 across evolution. **(B)** Comparative analysis of multiple sequence alignments illustrates the evolutionary conservation of the amino acid Lys459 in TULP1. These alignments were performed using HomoloGene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>).



Supplementary Figure S2. Sanger sequencing performed to validate the identified variants within the *TULP1* gene and assess their segregation. **(A)** Sequencing results for exon 8 and 14 sequencing of the *TULP1* gene, confirming the presence of the c.822G>T and c.1376T>C variants. **(B)** Segregation analysis revealed that the patient's sibling is a carrier of the *TULP1*:c.1376T>C variant, thereby confirming that the identified variants in the patient are in a *trans* configuration.

Resum **article 2**

Títol: Ampliant l'espectre clínic de variants en *CEP290*: cas clínic de distròfia de la retina no sindròmica amb fenotip lleu (*Expanding the Clinical Spectrum of CEP290 Variants: A Case Report on Non-Syndromic Retinal Dystrophy with a Mild Phenotype*).

Objectiu: Explorar la variabilitat fenotípica associada a variants bial·lèliques en el gen *CEP290* a partir de l'estudi de dos germans amb distròfia de la retina no sindròmica i manifestacions clíniques clarament contrastades.

Mètodes: Es van emprar tècniques de seqüenciació de l'exoma i anàlisi d'ARN per identificar i caracteritzar les variants. L'estudi es va completar amb una avaluació oftalmològica exhaustiva per valorar la funció retinal i la progressió clínica.

Resultats: Es van identificar dues variants en *trans* en *CEP290*: una *frameshift* c.955del, p.(Ser319LeufsTer16), i una *missense* c.5777G>C, p.(Arg1926Pro). Malgrat compartir el mateix genotip, la germana presentava un fenotip lleu, d'inici tardà i amb preservació funcional, mentre que el germà mostrava una forma greu, d'inici precoç i evolució progressiva de distròfia de retina.

Conclusions: Aquest cas amplia l'espectre fenotípic associat a *CEP290* i posa de manifest la notable variabilitat clínica entre individus amb el mateix genotip. Aquest fet reforça la necessitat d'un seguiment individualitzat i d'estratègies terapèutiques adaptades a cada pacient.

Case Report

Expanding the Clinical Spectrum of *CEP290* Variants: A Case Report on Non-Syndromic Retinal Dystrophy with a Mild Phenotype

Anna Esteve-Garcia ^{1,2}, Cristina Sau ¹, Ariadna Padró-Miquel ³, Jaume Català-Mora ^{4,5}, Cinthia Aguilera ^{3,*} and Estefania Cobos ^{5,6,*}

- ¹ Clinical Genetics Unit, Metropolitan South Clinical Laboratory, Bellvitge University Hospital, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain; aestevag@bellvitgehospital.cat (A.E.-G.); cristinasau@bellvitgehospital.cat (C.S.)
- ² PhD Program in Genetics, Faculty of Biology SED of Medicine and Health Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain
- ³ Genetics Laboratory, Metropolitan South Clinical Laboratory, Bellvitge University Hospital, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain; apadro@bellvitgehospital.cat
- ⁴ Department of Ophthalmology, SJD Barcelona Children's Hospital, Esplugues de Llobregat, 08950 Barcelona, Spain; jaume.catala@sjd.es
- ⁵ The Hereditary Retinal Dystrophies Unit, Ophthalmology Departments at SJD Barcelona Children's Hospital and University Hospital of Bellvitge, 08950 Barcelona, Spain
- ⁶ Department of Ophthalmology, Bellvitge University Hospital, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain
- * Correspondence: caguilerar@bellvitgehospital.cat (C.A.); ecobos@bellvitgehospital.cat (E.C.)

Abstract: Background/Objectives: Biallelic pathogenic variants in the *CEP290* gene are typically associated with severe, early-onset inherited retinal dystrophies (IRDs) in both syndromic and non-syndromic forms. This study explores the phenotypic variability of non-syndromic IRDs associated with *CEP290* variants, focusing on two siblings with biallelic variants, one of whom exhibits a remarkably mild phenotype, thereby expanding the clinical spectrum. **Methods:** Whole-exome sequencing (WES) and mRNA analysis were performed to identify and characterize *CEP290* variants in the siblings. Comprehensive ophthalmologic evaluations assessed retinal function and disease progression. **Results:** Two *CEP290* variants, a frameshift (c.955del, p.(Ser319LeufsTer16)) and a missense (c.5777G>C, p.(Arg1926Pro)), were identified in *trans* in both siblings. Despite sharing the same genetic variants, the sister exhibited significantly preserved retinal function, while the brother presented with a more severe, progressive retinal dystrophy. **Conclusions:** This study broadens the phenotypic spectrum of non-syndromic *CEP290*-related IRDs, demonstrating variability in disease severity ranging from mild to severe. These findings highlight the importance of personalized monitoring and tailored management strategies based on individual clinical presentations of *CEP290*-related IRDs.

Keywords: *CEP290*; retinal dystrophy; phenotypic heterogeneity

1. Introduction

The *CEP290* gene encodes a protein essential for ciliary function, particularly in photoreceptor cells, where it is critical for maintaining the structure and function of the connecting cilium [1,2]. This structure facilitates protein and vesicle transport, which are vital for photoreceptor activity and overall retinal function [3]. While *CEP290* is expressed in various tissues, including blood and fibroblasts, its expression is particularly enriched in photoreceptors, reflecting its pivotal role in this tissue [3,4]. Pathogenic variants in *CEP290* are associated with a wide spectrum of ciliopathies, including syndromic conditions, such

as Joubert syndrome (JBTS, MIM#610188), Senior-Løken syndrome (SLSN, MIM#610189), and Meckel syndrome (MKS, MIM#611134), as well as non-syndromic inherited retinal dystrophies (IRDs), like Leber congenital amaurosis (LCA, MIM#611755), cone-rod dystrophy (CRD), and retinitis pigmentosa (RP) [5–10].

Historically, *CEP290*-related IRDs were predominantly associated with severe, early-onset, and progressive retinal degeneration, typically manifesting in childhood [7–9]. However, recent studies have revealed a broader phenotypic spectrum of *CEP290* variants than was previously understood [11,12]. While many cases follow severe disease trajectories, some individuals have exhibited milder, more slowly progressing forms of retinal dystrophy [13,14]. These findings highlight the complexity of genotype–phenotype correlations and stress the need for individualized approaches to clinical care. Although *CEP290*-related CRD has been previously documented [13], the variability in its clinical presentation within families remains underreported.

In this study, we describe two siblings with biallelic *CEP290* variants who exhibit markedly different forms of non-syndromic CRD, ranging from severe to notably milder, slowly progressive presentations. By characterizing this variability, we aim to expand the understanding of the phenotypic spectrum of *CEP290*-related IRDs and to emphasize the importance of tailored clinical care strategies.

2. Materials and Methods

2.1. Case Presentation

The two siblings described in this study are part of an internal cohort of 1167 individuals, primarily of Spanish descent, diagnosed with IRDs (internal data). This cohort includes both pediatric and adult cases gathered through the Hereditary Retinal Dystrophies Unit—a collaborative unit integrating the Ophthalmology departments at SJD Barcelona Children's Hospital and Bellvitge University Hospital. Of these individuals, 964 underwent whole-exome sequencing (WES) as part of the genetic screening program. The cohort represents a wide range of IRD phenotypes, including both syndromic and non-syndromic forms, such as RP, LCA, CRD, SLSN, and JBTS.

2.2. Ophthalmologic Evaluation

Both probands underwent comprehensive ophthalmological assessments. Best-corrected visual acuity (BCVA) was measured using the ETDRS chart, and biomicroscopy was performed using slit-lamp examination. Tropicamide was administered to dilate the pupils, enabling detailed fundus examination. Retinal imaging, including fundus autofluorescence (FAF) and retinography, was obtained using Optos ultra-widefield (UWF™) retinal imaging (Optos California, Optos plc). To assess the retinal layers and detect structural abnormalities, swept-source optical coherence tomography (OCT) (Topcon Triton, Topcon Corporation) was performed. Retinal function was evaluated through central visual field testing (CV 10.2) and electrophysiology (Roland Consult), including full-field electroretinography (ffERG) and multifocal electroretinography (mfERG), following the current standards of the International Society for Clinical and Electrophysiology of Vision (ISCEV).

2.3. Whole-Exome Sequencing and Data Analysis

WES was conducted using the SureSelect XT HS Low Input Human All Exon v8 kit (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Paired-end sequencing (2 × 150 bp) was performed on the NovaSeq X Plus System (Illumina, San Diego, CA, USA). Bioinformatic analysis was performed using the Data Genomics Exome pipeline (v22.4.0) developed by Health in Code (Valencia, Spain). Copy number variation (CNV) analysis was carried out using VarSeq (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, USA). Sequence alignment and variant calling were conducted against the hg19 human genome reference.

A virtual panel including 489 genes associated with IRDs was applied to filter variants (Supplementary Data). A minimum read depth of 20 and an allele frequency threshold of 20% were applied. Variants with a minor allele frequency higher than 1 in 500, according to



Citation: Esteve-Garcia, A.; Sau, C.; Padró-Miquel, A.; Català-Mora, J.; Aguilera, C.; Cobos, E. Expanding the Clinical Spectrum of *CEP290* Variants: A Case Report on Non-Syndromic Retinal Dystrophy with a Mild Phenotype. *Genes* **2024**, *15*, 1584. <https://doi.org/10.3390/genes15121584>

Received: 27 October 2024
Revised: 4 December 2024
Accepted: 6 December 2024
Published: 9 December 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

gnomAD v2.1.1 [15], were excluded. Missense variants were analyzed using REVEL [16], while splice variants were assessed with SpliceAI [17]. Protein–protein interactions were analyzed with the STRING database [18]. Variants were classified following ACMG-AMP guidelines [19] and SVI-WG recommendations [20]. Parental DNA was analyzed using Sanger sequencing to confirm inheritance in *trans*.

Ethical approval for this study was obtained (reference number PR235/24) from the Research Ethics Committee of Bellvitge University Hospital. Informed consent was secured for genetic testing and the publication of clinical data.

2.4. mRNA Analysis of CEP290 Variants

To investigate the potential impact of the variants on mRNA, multiple experiments were conducted. mRNA was extracted from fresh whole blood samples using the Maxwell® RSC simplyRNA Blood Kit (Promega, San Diego, CA, USA) following the manufacturer’s protocol. Complementary DNA (cDNA) synthesis was performed using the PrimeScript™ RT Reagent Kit (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan).

2.5. Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR) Analysis

Gene expression analysis was performed in triplicate using TaqMan® probes Hs01551628_m1 (targeting exons 5–6 of the *CEP290* gene) and Hs99999905_m1 (targeting exon 3 of *GAPDH*) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The relative fold change in gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, as described by Livak et al. (2001) [21].

2.6. Exon Skipping Analysis

To evaluate the impact of the identified variants on mRNA splicing, primers were designed to amplify regions including exons 10–14 and exons 40–44 of the *CEP290* gene (NM_025114.3) (Table S1). These regions were amplified under standard PCR conditions, and the resulting amplicons were purified using the ExoSAP-IT™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer’s instructions. Purified PCR products were sequenced using the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). The resulting electropherograms were analyzed with Mutation Surveyor v5.1.2 software (SoftGenetics, LLC, State College, PA, USA).

3. Results

3.1. Clinical Findings

Proband 1 (Figure 1) is a 51-year-old male diagnosed with RP at age 3, initially presenting with photophobia. His height was measured at 174 cm (50th percentile), weight was 81.5 kg, and head circumference was 56 cm (50th percentile), with no dysmorphic features or non-ophthalmological health concerns. His symptoms included worsening night blindness and difficulty adjusting to light variations. At age 50, his ophthalmic examination revealed severe central visual impairment (20/500 OD, 20/640 OS) and peripheral visual field defects. Anterior segment examination showed bilateral central subcapsular cataract with intraocular pressure (IOP) of 20 mmHg. Fundus examination showed optic disc pallor, extensive pigmentary changes with bone spicules, macular atrophy, and thinned retinal vessels. FAF demonstrated hypoautofluorescence in the peripheral retina, extending into the superior and inferior nasal quadrants, and a hyperautofluorescent foveal ring (Figure 2A). OCT showed outer retinal layer loss and retinal pigment epithelium (RPE) thinning (Figure 2B). These findings led to a clinical diagnosis of early onset non-syndromic CRD.

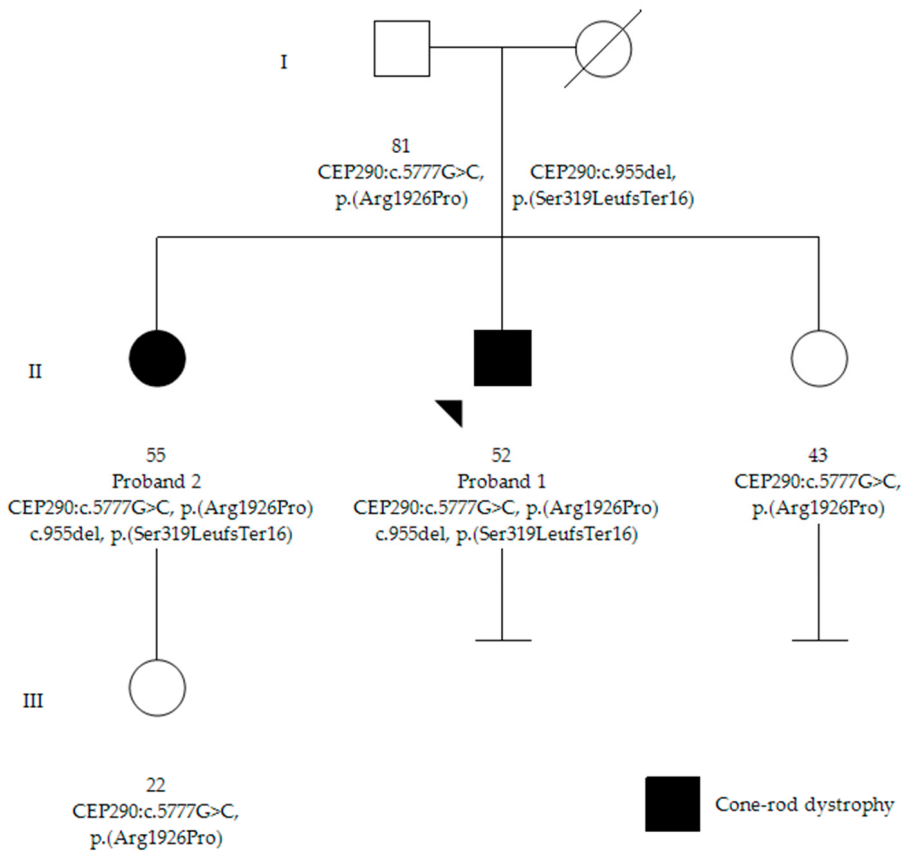


Figure 1. Family pedigree. Proband 1 is indicated by an arrow, and individuals with a clinical diagnosis of cone-rod dystrophy are shaded in black. Proband 2 has a 22-year-old asymptomatic daughter, and the affected siblings share a third sister who underwent a normal ophthalmological examination and remained unaffected. The family is of Spanish origin, with no other reported cases of ophthalmological diseases and no known consanguinity among relatives.

Proband 2 (Figure 1), the 55-year-old sister of proband 1, was referred at age 51 due to eye fatigue. Her height was measured at 152 cm (10–25th percentile), weight was 56.5 kg, and head circumference was 55 cm (50th percentile), with no dysmorphic features or additional health concerns. She exhibited milder ophthalmological symptoms, including mild photophobia and peripheral visual field loss, especially in the lower and right lateral areas, but denied experiencing nyctopia. Upon inquiry, childhood difficulties with object tracking were retrospectively reported. During the initial evaluation, her ophthalmic examination showed moderate visual impairment (20/100 OD, 20/50 OS) and bilateral posterior subcapsular cataracts. Fundus examination revealed less pronounced bilateral pigmentary changes and bone spicules in the inferior and temporal peripheral retina compared to proband 1, with normal optic disc and retinal vasculature. FAF revealed localized bilateral hypoautofluorescent patches in the inferior and temporal peripheral retina, sparing the posterior pole with a hyperautofluorescent demarcation line (Figure 2C). OCT showed minimal structural abnormalities with slight outer retinal layer disruption and preserved inner retina and foveal contour (Figure 2D). ffERG showed delayed and reduced photopic responses, preserved scotopic responses, and abolished flicker responses. MfERG revealed reduced central amplitudes (Supplementary Figure S1). These findings indicated a milder form of non-syndromic CRD.

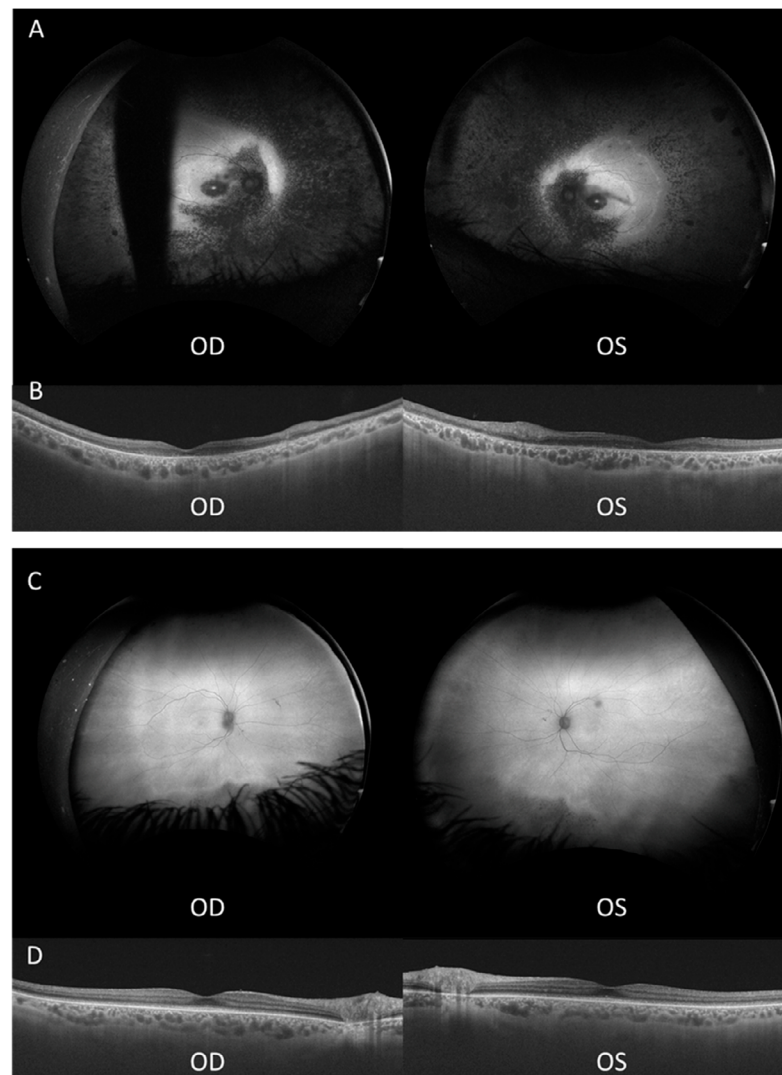


Figure 2. Ultra-widefield autofluorescence (FAF) and optical coherence tomography (OCT) of both eyes in each sibling. (A) FAF image of proband 1, with blinking artifact in OD. (B) OCT of proband 1. (C) FAF image of proband 2. (D) OCT of proband 2 showing discontinuities in external retinal layers. OD, right eye; OS, left eye.

3.2. Identification of Biallelic Variants in *CEP290*

WES analysis identified two heterozygous variants of *CEP290* in proband 1: NM_025114.3:c.955del, p.(Ser319LeufsTer16) and NM_025114.3:c.5777G>C, p.(Arg1926Pro). Due to the mild clinical presentation observed in proband 2, an initial diagnosis of *CEP290*-related IRD was considered unlikely. Consequently, WES was performed on proband 2, rather than targeted Sanger sequencing of the identified variants, to explore other potential molecular causes. Unexpectedly, the same two *CEP290* variants identified in proband 1 were also present in proband 2, suggesting a shared genetic basis for their IRD diagnosis, despite the observed clinical differences. No additional pathogenic/likely pathogenic variants or CNVs were detected in either sibling.

The variant NM_025114.3:c.955del, located in exon 12/54, resulted in a nucleotide deletion predicted to cause a frameshift, leading to a premature stop codon, p.(Ser319LeufsTer16).

This variant was predicted to result in a truncated protein, disrupting the coiled-coil domain (amino acids 59–565), which is critical for maintaining the proper conformation of the *CEP290* protein. More likely, it would cause a loss of function through mRNA degradation via nonsense-mediated decay (NMD), a mechanism strongly associated with pathogenicity in this gene (PVS1-very strong). Its low frequency in the gnomAD v2.1.1 population database (0.0006149%) (PM2-supporting) aligned with the recessive inheritance model for *CEP290*-related disorders. This variant was classified as pathogenic in ClinVar (ID:1073010) and HGMD (CD1212112). It has been associated with MKS in a homozygous patient [22] and with LCA in a compound heterozygous patient carrying another pathogenic variant (PM3-moderate) [23]. Additional truncating variants in *CEP290* have been linked to various ciliopathies, including JBTS and Bardet–Biedl syndrome [8,9,11]. Based on current evidence and ACMG classification guidelines, this variant has been classified as pathogenic.

The variant NM_025114.3:c.5777G>C, located in exon 42/54, resulted in an amino acid substitution, p.(Arg1926Pro), changing a positively charged arginine to a neutral proline. This protein codon resided within the RepA/Rep protein KID domain, a region essential for protein kinase interaction. It has a low frequency in the gnomAD v2.1.1 population database (0.0004187%) (PM2-supporting), consistent with its association with *CEP290*-related disorders in a recessive inheritance model. In silico predictions for this variant were uncertain (REVEL score 0.35), and functional studies have not been conducted. It has been classified as pathogenic in various databases, including HGMD (CM111853), ClinVar (ID: 659046), and LOVD (CEP290_000296). This variant has been reported in individuals with LCA in compound heterozygosity with other pathogenic/likely pathogenic variants (PM3-strong) [4,8,10,24], and it has been shown to segregate in a family with two affected members (PP1-supporting) [10]. Based on current evidence and following ACMG classification guidelines, this variant has been classified as likely pathogenic.

Parental segregation analysis confirmed that these variants were inherited in *trans* configuration.

3.3. Characterization of Identified *CEP290* Variants and Their Impact on Splicing

RT-qPCR results showed a significant reduction in *CEP290* mRNA levels in both proband 1 ($p = 0.0004$) and proband 2 ($p = 0.004$) compared to the control sample (Figure S2).

These findings suggest that the frameshift variant c.955del partially induced NMD, as the expression level was not reduced by 50%, indicating incomplete NMD activation. Although mRNA expression levels varied slightly between the two probands, the differences are not statistically significant.

To evaluate whether the c.955del variant caused exon skipping, a mechanism previously associated with milder forms of the disease [25], Sanger sequencing of exons 10–14 was performed (Figure S3A). The results confirmed that the c.955del variant did not trigger exon 12 skipping, consistent with in silico predictions (SpliceAI score = 0.04). Nonetheless, allele ratio analysis revealed a reduced presence of the mutant allele (45%) compared to the normal allele (55%). These findings support the conclusion of incomplete NMD activation, consistent with the observed *CEP290* mRNA expression results.

Sanger sequencing of exons 40–44 confirmed the presence of the missense variant c.5777G>C, with no evidence of exon 42 skipping, aligning with in silico predictions (SpliceAI score = 0.03). Interestingly, the results revealed exon 41 skipping in both the probands and the control samples. Notably, the agarose gel analysis (Figure S3B) showed more intense bands corresponding to exon 41 skipping in the probands' samples compared to the control. Additionally, a third band, approximately 350 bp in size, was detected. Future studies should aim to sequence this band to evaluate its potential impact on *CEP290* function.

4. Discussion

This study highlights the significant intra-familial variability in *CEP290*-related IRDs, demonstrated by the contrasting phenotypes observed in two siblings carrying identical

biallelic *CEP290* variants. Proband 1 exhibited a severe, early-onset CRD with rapid disease progression, while proband 2 presented a milder, late-onset form with slower progression. Comprehensive evaluations by nephrology and neurology affirmed the non-syndromic nature of their conditions.

Establishing clear genotype–phenotype correlations in *CEP290*-related conditions remains challenging. Different *CEP290* variants associated with CRD have been documented, yet most cases typically describe severe, early-onset presentations [6,13,26]. This study contributes novel insights by documenting the coexistence of a mild, late-onset CRD phenotype alongside a severe phenotype within the same family, emphasizing the complexity of the genetic and non-genetic factors influencing disease expression [26].

The c.955del frameshift variant has been associated with severe phenotypes, such as MKS and LCA, when combined with other loss-of-function alleles [4,6]. Meanwhile, the c.5777G>C missense variant has been reported in both homozygosity and compound heterozygosity, with null variants in severe cases [8,10,24]. Notably, to our knowledge, this study is the first to document the coexistence of c.955del with a missense variant, potentially explaining the milder phenotype observed in proband 2. These findings emphasize the critical role that specific variant combinations play in shaping genotype–phenotype correlations. For example, the c.2991 + 1655A>G deep intronic variant, first described by den Hollander et al. (2006) [27], has been shown to preserve correct splicing in most tissues but is insufficient in photoreceptors, leading to retinal-specific manifestations [11,28].

Residual *CEP290* protein activity, alternative splicing, genetic modifiers, and environmental factors likely influence the phenotypic differences between the siblings [29–31].

The observed reduction in *CEP290* expression is consistent with the activation of NMD. However, further experiments using NMD inhibitors would be necessary in order to confirm this hypothesis. Additionally, mechanisms like nonsense-associated altered splicing (NAS) or basal exon skipping (BES) could generate functional transcripts that bypass premature termination codons [11,25], potentially resulting in residual protein expression and a milder phenotype [32]. Exon 41 skipping was observed in both siblings and in the control sample, suggesting that it may be associated with the variant identified in exon 42 (c.5777G>C), given that changes in exon donor or acceptor sites can impact the splicing of neighboring exons, as shown in prior studies [11,25]. However, this exon skipping was also observed in all samples and controls in the study conducted by Drivas et al. (2015) [33].

Genetic modifiers such as *AHI1*, *RPGRIP1L*, and *CC2D2A*, which interact with *CEP290* at the protein level, may also contribute to phenotypic variability (Supplementary Figure S4) [34,35]. Proband 1 carried more variants in these genes than proband 2 (Supplementary Tables S2 and S3), including a *CC2D2A* variant predicted to have deleterious effects on protein level (Revel score: 0.683), which could partially explain the more severe phenotype.

Environmental and epigenetic factors, such as mechanisms involving endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD), may further influence disease severity [36,37]. These non-genetic influences, combined with the unique structural and functional demands of retinal cilia [3], highlight the complexity of *CEP290*-related retinal diseases.

Within our internal cohort of 964 IRD cases, nine additional individuals with biallelic *CEP290* pathogenic variants were identified (Supplementary Table S4), most of whom exhibited severe, early-onset retinal degeneration consistent with previously documented phenotypes [12]. Only one individual carried a missense variant in combination with a loss-of-function variant. While this patient displayed a non-syndromic phenotype, their disease course was far more aggressive than that of proband 2, further emphasizing the complexity of *CEP290* genotype–phenotype relationships.

Emerging therapeutic approaches, such as gene editing and antisense oligonucleotide (ASO) therapies, hold promise for managing *CEP290*-related IRDs [38,39]. However, the significant phenotypic variability associated with *CEP290* highlights the need for personalized strategies that account for specific genotypes, splicing profiles, and modifier influences to maximize treatment efficacy.

In conclusion, this study broadens the understanding of *CEP290*-related IRDs by documenting the coexistence of both severe and mild phenotypes within the same family. It highlights the complex interplay of the genetic, molecular, and environmental factors that contribute to the variability in disease expression. Although preliminary findings on splicing alterations were explored, they serve as a foundation for future, more comprehensive investigations into *CEP290* expression and splicing mechanisms.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes15121584/s1>. Figure S1: fFERG results for proband 2, Figure S2: qPCR analysis of *CEP290* gene expression, Figure S3: Impact of identified *CEP290* variants on splicing, Figure S4: Protein–protein interaction network of *CEP290*, Table S1. Primers used to evaluate the effect on splicing of the variants identified, Table S2. Variants in modifier genes (*AHI1*, *ARL13B*, *CC2D2A* and *RPGRIP1L*) identified in proband 1, Table S3. Variants in modifier genes (*AHI1*, *ARL13B*, *CC2D2A* and *RPGRIP1L*) identified in proband 2.

Author Contributions: Conceptualization, A.E.-G. and C.A.; methodology, A.E.-G., C.A., J.C.-M., and E.C.; validation, A.E.-G., C.A., E.C., J.C.-M., A.P.-M., and C.S.; investigation, A.E.-G.; writing—original draft preparation, A.E.-G.; writing—review and editing, A.E.-G., C.A., E.C., J.C.-M., A.P.-M., and C.S.; supervision, C.A. and E.C.; project administration, A.E.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by Hospital Universitari de Bellvitge (grant no. PUB22015, awarded to E.C.).

Institutional Review Board Statement: The study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Research Ethics Committee of Bellvitge University Hospital, protocol code PR235/24, on 25 October 2024.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Acknowledgments: We want to particularly acknowledge the participating family; Health in Code for performing the sequencing analysis; and Biobank HUB-ICO-IDIBELL (PT20/00171), integrated in the ISCIII Biobanks and Biomodels Platform, and Xarxa Banc de Tumors de Catalunya (XBTC) for their collaboration. We thank CERCA Programme/Generalitat de Catalunya for institutional support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Zia, A.; Nellisery, J.; Rivka, R.; Swaroop, A. *CEP290* Localizes to Photoreceptor Connecting Cilium and Interacts with Centrosomal-Cilia Proteins. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 1807.
2. Firat-Karalar, E.N. The Ciliopathy Gene Product *Cep290* Is Required for Primary Cilium Formation and Microtubule Network Organization. *Turk. J. Biol.* **2018**, *42*, 371–381. [CrossRef] [PubMed]
3. Papon, J.F.; Perrault, I.; Coste, A.; Louis, B.; Gerard, X.; Hanein, S.; Fares-Taie, L.; Gerber, S.; Defoort-Dhellemmes, S.; Vojtek, A.M.; et al. Abnormal Respiratory Cilia in Non-Syndromic Leber Congenital Amaurosis with *CEP290* Mutations. *J. Med. Genet.* **2010**, *47*, 829–834. [CrossRef] [PubMed]
4. Coppeters, F.; Lefever, S.; Leroy, B.P.; De Baere, E. *CEP290*, a Gene with Many Faces: Mutation Overview and Presentation of *CEP290*base. *Hum. Mutat.* **2010**, *31*, 1097–1108. [CrossRef] [PubMed]
5. Sahli, E. A Report on Children with *CEP290* Mutation, Vision Loss, and Developmental Delay. *Beyoglu Eye J.* **2023**, *8*, 226–232. [CrossRef]
6. Feldhaus, B.; Weisschuh, N.; Nasser, F.; den Hollander, A.I.; Cremers, F.P.M.; Zrenner, E.; Kohl, S.; Zobor, D. *CEP290* Mutation Spectrum and Delineation of the Associated Phenotype in a Large German Cohort: A Monocentric Study. *Am. J. Ophthalmol.* **2020**, *211*, 142–150. [CrossRef]
7. Binder, A.; Kohl, S.; Grasshoff, U.; Schäferhoff, K.; Stingl, K. An Early Onset Cone Dystrophy Due to *CEP290* Mutation: A Case Report. *Doc. Ophthalmol.* **2023**, *147*, 203–209. [CrossRef]
8. Xu, K.; Xie, Y.; Sun, T.; Zhang, X.; Chen, C.; Li, Y. Genetic and Clinical Findings in a Chinese Cohort with Leber Congenital Amaurosis and Early Onset Severe Retinal Dystrophy. *Br. J. Ophthalmol.* **2020**, *104*, 932–937. [CrossRef]

9. Leroy, B.P.; Birch, D.G.; Duncan, J.L.; Lam, B.L.; Koenekoop, R.K.; Porto, F.B.O.; Russell, S.R.; Girach, A. Leber Congenital Amaurosis Due to CEP290 Mutations-Severe Vision Impairment with High Unmet Medical Need. *Retina* **2021**, *41*, 898–907. [\[CrossRef\]](#)

10. Sheck, L.; Davies, W.I.L.; Moradi, P.; Robson, A.G.; Kumaran, N.; Liasis, A.C.; Webster, A.R.; Moore, A.T.; Michaelides, M. Leber Congenital Amaurosis Associated with Mutations in CEP290, Clinical Phenotype, and Natural History in Preparation for Trials of Novel Therapies. *Ophthalmology* **2018**, *125*, 894–903. [\[CrossRef\]](#)

11. Barny, I.; Perrault, I.; Michel, C.; Soussan, M.; Goudin, N.; Rio, M.; Thomas, S.; Attié-Bitach, T.; Hamel, C.; Dollfus, H.; et al. Basal Exon Skipping and Nonsense-Associated Altered Splicing Allows Bypassing Complete CEP290 Loss-of-Function in Individuals with Unusually Mild Retinal Disease. *Hum. Mol. Genet.* **2018**, *27*, 2689–2702. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

12. Testa, F.; Sodi, A.; Signorini, S.; Di Iorio, V.; Murro, V.; Brunetti-Pierri, R.; Valente, E.M.; Karali, M.; Melillo, P.; Banfi, S.; et al. Spectrum of Disease Severity in Nonsyndromic Patients With Mutations in the CEP290 Gene: A Multicentric Longitudinal Study. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2021**, *62*, 1. [\[CrossRef\]](#)

13. Vilaplana, F.; Ros, A.; Garcia, B.; Blanco, I.; Castellanos, E.; Edwards, N.J.; Valldeperas, X.; Ruiz-Bilbao, S.; Sabala, A. Clinical Characteristics, Imaging Findings, and Genetic Results of a Patient with CEP290-Related Cone-Rod Dystrophy. *Ophthalmic Genet.* **2021**, *42*, 474–479. [\[CrossRef\]](#)

14. Rafalska, A.; Tracewska, A.M.; Turno-Kręcicka, A.; Szafraniec, M.J.; Misiuk-Hojło, M. A Mild Phenotype Caused by Two Novel Compound Heterozygous Mutations in CEP290. *Genes* **2020**, *11*, 1240. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

15. Karczewski, K.J.; Francioli, L.C.; Tiao, G.; Cummings, B.B.; Alfoldi, J.; Wang, Q.; Collins, R.L.; Laricchia, K.M.; Ganna, A.; Birnbaum, D.P.; et al. The Mutational Constraint Spectrum Quantified from Variation in 141,456 Humans. *Nature* **2020**, *581*, 434–443. [\[CrossRef\]](#)

16. Ioannidis, N.M.; Rothstein, J.H.; Pejaver, V.; Middha, S.; McDonnell, S.K.; Baheti, S.; Musolf, A.; Li, Q.; Holzinger, E.; Karyadi, D.; et al. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am. J. Hum. Genet.* **2016**, *99*, 877–885. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

17. Jaganathan, K.; Kyriazopoulou Panagiotopoulou, S.; McRae, J.F.; Darbandi, S.F.; Knowles, D.; Li, Y.I.; Kosmicki, J.A.; Arbelaez, J.; Cui, W.; Schwartz, G.B.; et al. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell* **2019**, *176*, 535–548.e24. [\[CrossRef\]](#)

18. Szkarczyk, D.; Kirsch, R.; Koutrouli, M.; Nastou, K.; Mehryary, F.; Hachilif, R.; Gable, A.L.; Fang, T.; Doncheva, N.T.; Pyysalo, S.; et al. The STRING Database in 2023: Protein-Protein Association Networks and Functional Enrichment Analyses for Any Sequenced Genome of Interest. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, D638–D646. [\[CrossRef\]](#)

19. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **2015**, *17*, 405–424. [\[CrossRef\]](#)

20. Andersen, E.F.; Azzariti, D.R.; Babb, L.; Berg, J.S.; Biesecker, L.G.; Bly, Z.; Buchanan, A.H.; DiStefano, M.T.; Gong, L.; Harrison, S.M.; et al. The Clinical Genome Resource (ClinGen): Advancing Genomic Knowledge through Global Curation. *Genet. Med.* **2024**, 101228. [\[CrossRef\]](#)

21. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

22. Szymanska, K.; Berry, I.; Logan, C.V.; Cousins, S.R.; Lindsay, H.; Jafri, H.; Raashid, Y.; Malik-Sharif, S.; Castle, B.; Ahmed, M.; et al. Founder Mutations and Genotype-Phenotype Correlations in Meckel-Gruber Syndrome and Associated Ciliopathies. *Cilia* **2012**, *1*, 18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

23. Areblom, M.; Kjellström, S.; Andréasson, S.; Öhberg, A.; Gränse, L.; Kjellström, U. A Description of the Yield of Genetic Reinvestigation in Patients with Inherited Retinal Dystrophies and Previous Inconclusive Genetic Testing. *Genes* **2023**, *14*, 1413. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

24. Wiszniewski, W.; Lewis, R.A.; Stockton, D.W.; Peng, J.; Mardon, G.; Chen, R.; Lupski, J.R. Potential Involvement of More than One Locus in Trait Manifestation for Individuals with Leber Congenital Amaurosis. *Hum. Genet.* **2011**, *129*, 319–327. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

25. Littink, K.W.; Pott, J.-W.R.; Collin, R.W.J.; Kroes, H.Y.; Verheij, J.B.G.M.; Blokland, E.A.W.; de Castro Miró, M.; Hoyng, C.B.; Klaver, C.C.W.; Koenekoop, R.K.; et al. A Novel Nonsense Mutation in CEP290 Induces Exon Skipping and Leads to a Relatively Mild Retinal Phenotype. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2010**, *51*, 3646–3652. [\[CrossRef\]](#)

26. Vrabič, N.; Fakin, A.; Tekavčič Pompe, M. Spectrum and Frequencies of Extraocular Features Reported in CEP290-Associated Ciliopathy—A Systematic Review. *J. Fr. Ophthalmol.* **2024**, *47*, 104232. [\[CrossRef\]](#)

27. den Hollander, A.I.; Koenekoop, R.K.; Yzer, S.; Lopez, I.; Arends, M.L.; Voesenek, K.E.J.; Zonneveld, M.N.; Strom, T.M.; Meitinger, T.; Brunner, H.G.; et al. Mutations in the CEP290 (NPHP6) Gene Are a Frequent Cause of Leber Congenital Amaurosis. *Am. J. Hum. Genet.* **2006**, *79*, 556–561. [\[CrossRef\]](#)

28. Aísa-Marín, I.; García-Arroyo, R.; Mirra, S.; Marfany, G. The Alter Retina: Alternative Splicing of Retinal Genes in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1855. [\[CrossRef\]](#)

29. Perea-Romero, I.; Gordo, G.; Iancu, I.F.; Del Pozo-Valero, M.; Almoguera, B.; Blanco-Kelly, F.; Carreño, E.; Jimenez-Rolando, B.; Lopez-Rodriguez, R.; Lorda-Sanchez, I.; et al. Genetic Landscape of 6089 Inherited Retinal Dystrophies Affected Cases in Spain and Their Therapeutic and Extended Epidemiological Implications. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1526. [\[CrossRef\]](#)

30. Li, S.; Datta, S.; Brabbit, E.; Love, Z.; Woytowicz, V.; Flattery, K.; Capri, J.; Yao, K.; Wu, S.; Imboden, M.; et al. Nr2e3 Is a Genetic Modifier That Rescues Retinal Degeneration and Promotes Homeostasis in Multiple Models of Retinitis Pigmentosa. *Gene Ther.* **2021**, *28*, 223–241. [\[CrossRef\]](#)

31. Meyer, K.J.; Anderson, M.G. Genetic Modifiers as Relevant Biological Variables of Eye Disorders. *Hum. Mol. Genet.* **2017**, *26*, R58–R67. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

32. Lambert, J.-M.; Ashi, M.O.; Srour, N.; Delpy, L.; Saulière, J. Mechanisms and Regulation of Nonsense-Mediated mRNA Decay and Nonsense-Associated Altered Splicing in Lymphocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1335. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

33. Drivas, T.G.; Wojno, A.P.; Tucker, B.A.; Stone, E.M.; Bennett, J. Basal Exon Skipping and Genetic Pleiotropy: A Predictive Model of Disease Pathogenesis. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 291ra97. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

34. Meyer, K.J.; Whitmore, S.S.; Burnight, E.R.; Riker, M.; Mercer, H.E.; Ajose, A.; Howell, G.R.; Stone, E.M.; Mullins, R.F.; Tucker, B.A.; et al. Genetic Modifiers of CEP290-Mediated Retinal Degeneration. *bioRxiv* **2022**. [\[CrossRef\]](#)

35. Coppeters, F.; Casteels, I.; Meire, F.; De Jaegere, S.; Hooghe, S.; van Regemorter, N.; Van Esch, H.; Matuleviciene, A.; Nunes, L.; Meersschaut, V.; et al. Genetic Screening of LCA in Belgium: Predominance of CEP290 and Identification of Potential Modifier Alleles in AHI1 of CEP290-Related Phenotypes. *Hum. Mutat.* **2010**, *31*, E1709–E1766. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

36. Zhang, S.X.; Wang, J.J.; Starr, C.R.; Lee, E.-J.; Park, K.S.; Zhylkibayev, A.; Medina, A.; Lin, J.H.; Gorbatyuk, M. The Endoplasmic Reticulum: Homeostasis and Crosstalk in Retinal Health and Disease. *Prog. Retin. Eye Res.* **2024**, *98*, 101231. [\[CrossRef\]](#)

37. Chiang, W.-C.; Kroeger, H.; Sakami, S.; Messah, C.; Yasumura, D.; Matthes, M.T.; Coppinger, J.A.; Palczewski, K.; LaVail, M.M.; Lin, J.H. Robust Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation of Rhodopsin Precedes Retinal Degeneration. *Mol. Neurobiol.* **2015**, *52*, 679–695. [\[CrossRef\]](#)

38. Pierce, E.A.; Aleman, T.S.; Jayasundera, K.T.; Ashimatey, B.S.; Kim, K.; Rashid, A.; Jaskolka, M.C.; Myers, R.L.; Lam, B.L.; Bailey, S.T.; et al. Gene Editing for CEP290-Associated Retinal Degeneration. *N. Engl. J. Med.* **2024**, *390*, 1972–1984. [\[CrossRef\]](#)

39. Garanto, A.; Chung, D.C.; Duijkers, L.; Corral-Serrano, J.C.; Messchaert, M.; Xiao, R.; Bennett, J.; Vandenberghe, L.H.; Collin, R.W.J. In Vitro and in Vivo Rescue of Aberrant Splicing in CEP290-Associated LCA by Antisense Oligonucleotide Delivery. *Hum. Mol. Genet.* **2016**, *25*, 2552–2563. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

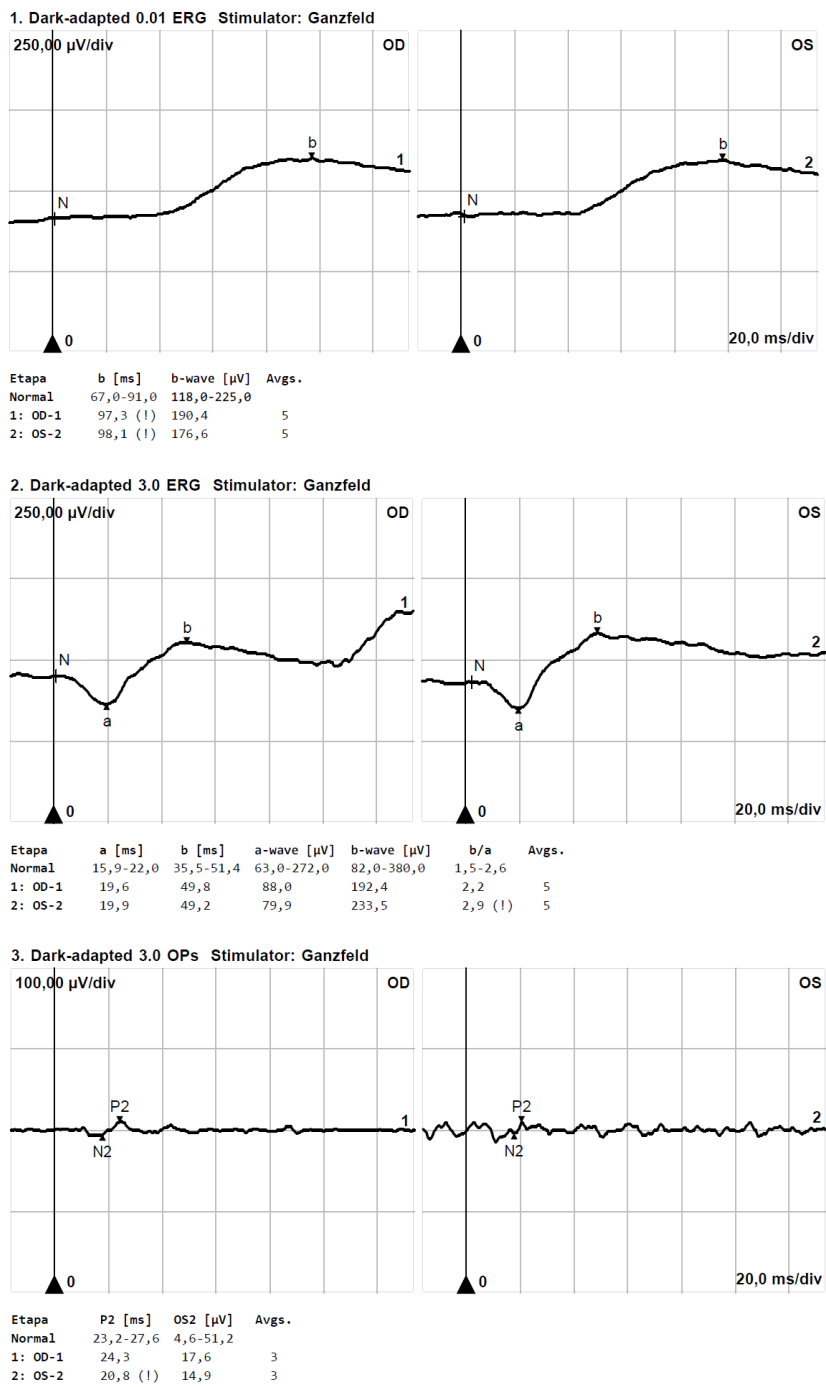
Supplementary Material

1 Supplementary Data

The list of 489 genes analyzed through whole exome sequencing (WES) in both siblings is as follows: *ABCA4*, *ABCC6*, *ABHD12*, *ACBD5*, *ACO2*, *ACOX1*, *ADAM9*, *ADAMTS18*, *ADAMTS9*, *ADGRA3*, *ADGRV1*, *ADIPOR1*, *AFG3L2*, *AGBL5*, *AHI1*, *AHR*, *AIPL1*, *ALG6*, *ALMS1*, *ALPK1*, *ANKS6*, *ANTXR1*, *AP3B1*, *AP3D1*, *APOB*, *APOE*, *ARHGAP31*, *ARHGEF18*, *ARL13B*, *ARL2*, *ARL2BP*, *ARL3*, *ARL6*, *ARMC9*, *ARMS2*, *ARSG*, *ARV1*, *ASRGL1*, *ATAD3A*, *ATF6*, *ATOH7*, *ATP1A3*, *ATXN2*, *ATXN7*, *B9D1*, *B9D2*, *BBIP1*, *BBS1*, *BBS10*, *BBS12*, *BBS2*, *BBS4*, *BBS5*, *BBS7*, *BBS9*, *BEST1*, *BLOC1S3*, *BLOC1S5*, *BLOC1S6*, *BMP4*, *BTBD*, *C12orf65*, *C19orf12*, *C1QTNF5*, *C2*, *C2CD3*, *C3*, *C8orf37*, *C9*, *CA4*, *CABP4*, *CACNA1F*, *CACNA2D4*, *CAPN5*, *CASK*, *CC2D2A*, *CCDC28B*, *CCDC51*, *CCT2*, *CDH16*, *CDH23*, *CDH3*, *CDHR1*, *CDK10*, *CEP104*, *CEP120*, *CEP164*, *CEP19*, *CEP250*, *CEP290*, *CEP41*, *CEP78*, *CEP83*, *CERKL*, *CFAP20*, *CFAP410*, *CFB*, *CFH*, *CFHR1*, *CFHR3*, *CFI*, *CHM*, *CIB2*, *CISD2*, *CLCC1*, *CLDN19*, *CLEC3B*, *CLN3*, *CLN5*, *CLN6*, *CLN8*, *CLRN1*, *CLUAP1*, *CNGA1*, *CNGA3*, *CNGB1*, *CNGB3*, *CNNM4*, *COL11A1*, *COL11A2*, *COL18A1*, *COL2A1*, *COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5*, *COL6A6*, *COL9A1*, *COL9A2*, *COL9A3*, *CPE*, *CPLANE1*, *CRB1*, *CRB2*, *CRX*, *CSPP1*, *CST3*, *CTC1*, *CTNNA1*, *CTNNB1*, *CTSD*, *CWC27*, *CX3CR1*, *CYP2U1*, *CYP4V2*, *DAG1*, *DCDC2*, *DCT*, *DHDDS*, *DHX38*, *DLG1*, *DNAJC17*, *DNAJC19*, *DNAJC21*, *DNM1L*, *DOCK6*, *DRAM2*, *DTHD1*, *DTNBP1*, *EDN3*, *EDNRB*, *EFEMP1*, *ELOVL4*, *EMC1*, *ENSA*, *ERCC6*, *ESPN*, *EXOSC2*, *EYS*, *FAM149B1*, *FAM161A*, *FAM57B*, *FBLN5*, *FBN3*, *FDX2*, *FDXR*, *FLVCR1*, *FRMD7*, *FSCN2*, *FZD4*, *GDF6*, *GDPD1*, *GLIS2*, *GNAT1*, *GNAT2*, *GNB3*, *GNPTG*, *GPR143*, *GPR179*, *GRK1*, *GRM6*, *GRN*, *GUCA1A*, *GUCA1B*, *GUCY2D*, *HACE1*, *HADHA*, *HARS*, *HGSNAT*, *HK1*, *HKDC1*, *HMCN1*, *HMX1*, *HPS1*, *HPS3*, *HPS4*, *HPS5*, *HPS6*, *HTRA1*, *IDH3A*, *IDH3B*, *IFT122*, *IFT140*, *IFT172*, *IFT27*, *IFT43*, *IFT52*, *IFT74*, *IFT80*, *IFT81*, *IMPDH1*, *IMPG1*, *IMPG2*, *INPP5E*, *INVS*, *IQCB1*, *IRX1*, *ITM2B*, *JAG1*, *KCNJ13*, *KCNV2*, *KIAA0556*, *KIAA0586*, *KIAA0753*, *KIAA1549*, *KIF11*, *KIF14*, *KIF3B*, *KIF7*, *KITLG*, *KIZ*, *KLHL7*, *LAMA1*, *LAMA5*, *LAMB2*, *LARGE2*, *LCA5*, *LOXL3*, *LRAT*, *LRIT3*, *LRMDA*, *LRP2*, *LRP5*, *LYST*, *LZTFL1*, *MAK*, *MANBA*, *MAPKAPK3*, *MAPKBP1*, *MC1R*, *MCAT*, *MCOLN1*, *MECR*, *MERTK*, *MFN2*, *MFRP*, *MFSD8*, *MITF*, *MKKS*, *MKS1*, *MLPH*, *MMACHC*, *MTPAP*, *MTTP*, *MVK*, *MYO5A*, *MYO7A*, *NBAS*, *NDP*, *NDUF51*, *NEK1*, *NEK2*, *NEK8*, *NEUROD1*, *NGLY1*, *NMNAT1*, *NPHP1*, *NPHP3*, *NPHP4*, *NR2E3*, *NR2F1*, *NRL*, *NUMB*, *NYX*, *OAT*, *OCA2*, *OFD1*, *OPA1*, *OPA3*, *OPN1LW*, *OPN1MW*, *OPN1SW*, *OR2W3*, *OTX2*, *P3H2*, *PANK2*, *PAX3*, *PAX6*, *PCARE*, *PCDH15*, *PCYT1A*, *PDE6A*, *PDE6B*, *PDE6C*, *PDE6D*, *PDE6G*, *PDE6H*, *PDXX*, *PDZD7*, *PEX1*, *PEX10*, *PEX11B*, *PEX12*, *PEX13*, *PEX14*, *PEX16*, *PEX19*, *PEX2*, *PEX26*, *PEX3*, *PEX5*, *PEX6*, *PEX7*, *PGK1*, *PHYH*, *PIBF1*, *PITPNM3*, *PLA2G5*, *PLK4*, *PMM2*, *PNPLA6*, *POC1B*, *POC5*, *POGZ*, *POLG*, *POLG2*, *POMGNT1*, *PPP2R3C*, *PPT1*, *PQLC2*, *PRCD*, *PRDM13*, *PROKR2*, *PROM1*, *PRPF3*, *PRPF31*, *PRPF4*, *PRPF6*, *PRPF8*, *PRPH2*, *PRPS1*, *RAB27A*, *RAB28*, *RAX2*, *RB1*, *RBP3*, *RBP4*, *RCBTB1*, *RD3*, *RDH11*, *RDH12*, *RDH5*, *REEP6*, *RGR*, *RGS9*, *RGS9BP*, *RHBDD2*, *RHO*, *RIMS1*, *RIMS2*, *RLBP1*, *ROM1*, *RP1*, *RP1L1*, *RP2*, *RP9*, *RPE65*, *RPGR*, *RPGRIP1*, *RPGRIP1L*, *RRM2B*, *RS1*, *RTN4IP1*, *SAG*, *SAMD11*, *SCAPER*, *SCLT1*, *SDCCAG8*, *SEMA4A*, *SEMA6B*, *SIX6*, *SLC24A1*, *SLC24A2*, *SLC24A5*, *SLC25A46*, *SLC37A3*, *SLC38A8*, *SLC39A12*, *SLC45A2*, *SLC4A3*, *SLC4A4*, *SLC4A7*, *SLC52A2*, *SLC6A6*, *SLC7A14*, *SMARCA4*, *SNAI2*, *SNRNP200*, *SNX10*, *SOX10*, *SOX3*, *SPATA7*, *SPG7*, *SPP2*, *SRD5A3*, *SSBP1*, *STX3*, *SUFU*, *TCTN1*, *TCTN2*, *TCTN3*, *TEAD1*, *TGFBR2*, *TIMM8A*, *TIMP1*, *TIMP3*, *TLR3*, *TLR4*, *TMEM107*, *TMEM126A*, *TMEM138*, *TMEM216*, *TMEM231*, *TMEM237*, *TMEM67*, *TOGARAM1*, *TOPORS*, *TPP1*, *TRAF3IP1*, *TREX1*, *TRIM32*, *TRNT1*, *TRPM1*, *TSM*, *TSPAN12*, *TTC21B*, *TTC8*, *TTL5*, *TTPA*, *TUB*, *TUBB3*, *TUBB4B*, *TUBGCP4*, *TUBGCP6*, *TULP1*, *TXNDC15*, *TYR*, *TYRP1*, *UCHL1*, *UNC119*, *USH1C*, *USH1G*, *USH2A*, *USP45*, *VCAN*, *VHL*, *VPS13B*, *WDPCP*, *WDR19*, *WDR34*, *WFS1*, *WHRN*, *XPNPEP3*, *YARS*, *YME1L1*, *YPEL2*, *ZNF408*, *ZNF423*, *ZNF513*, *ZNHIT3*.

Supplementary Material

2 Supplementary Figures



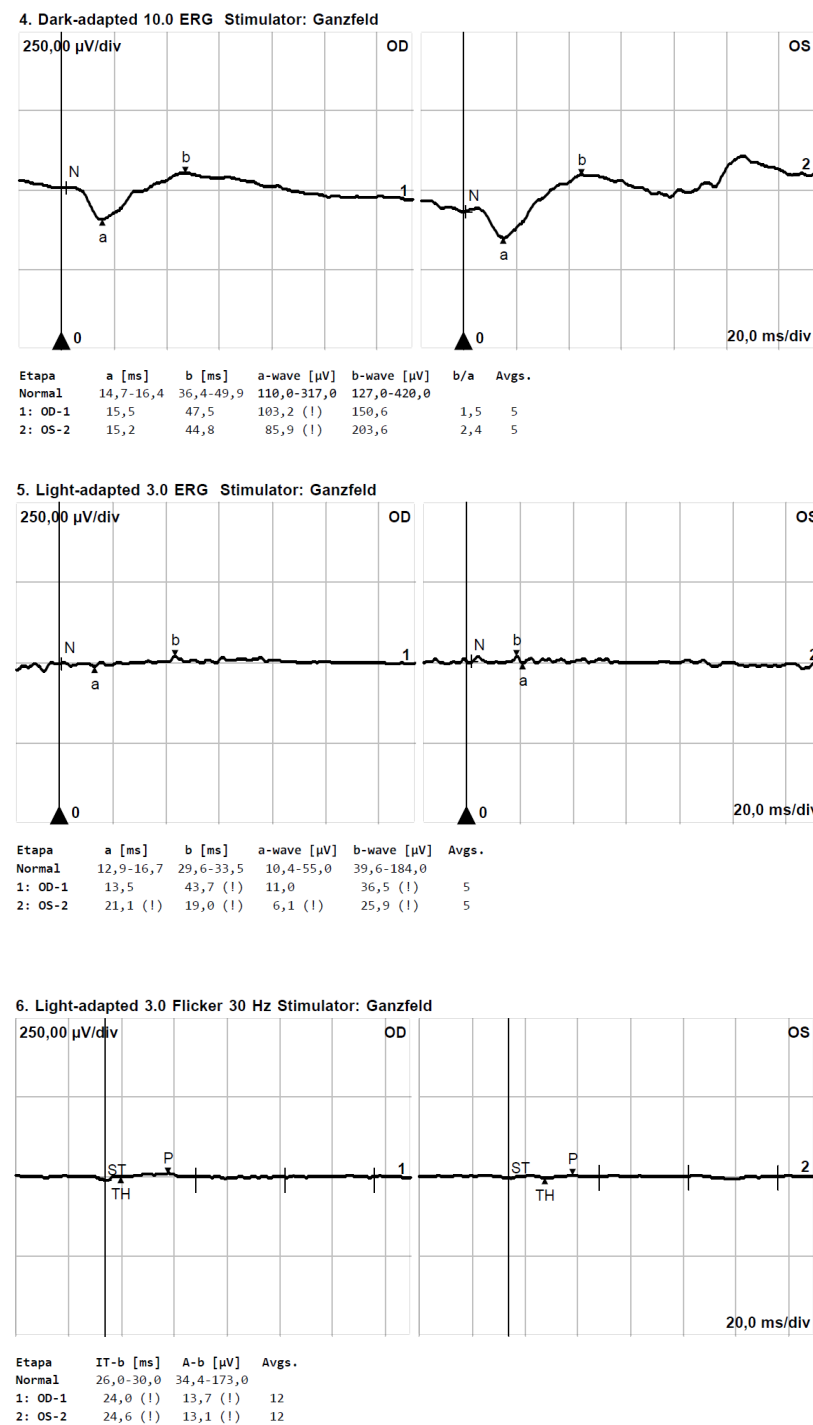


Figure S1: ffERG results for proband 2. Panels (1-4) represent the scotopic ERG responses, while panels (5-6) illustrate the photopic ERG responses.

Supplementary Material

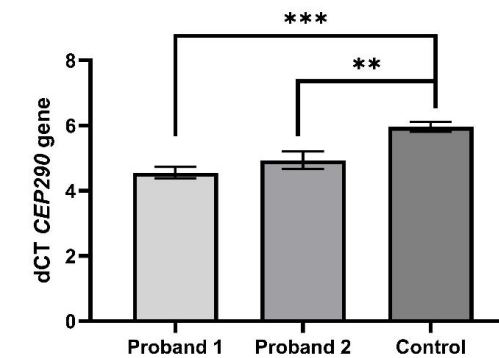
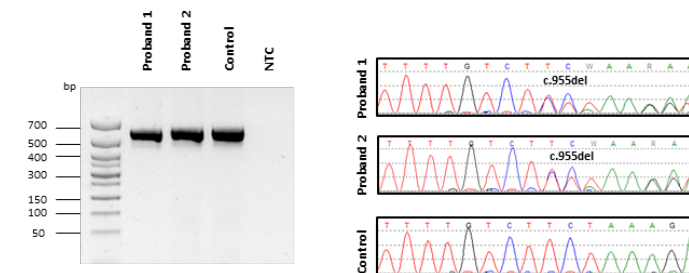


Figure S2: qPCR analysis of *CEP290* gene expression. The graph illustrates the relative expression levels of the *CEP290* gene in probands 1 and 2 compared to a control sample, normalized to *GAPDH* expression. A reduction in *CEP290* expression was observed in proband 1 ($p = 0.0004$) and proband 2 ($p = 0.004$). **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

A) Exons 10-14 *CEP290* gene



B) Exons 40-44 *CEP290* gene

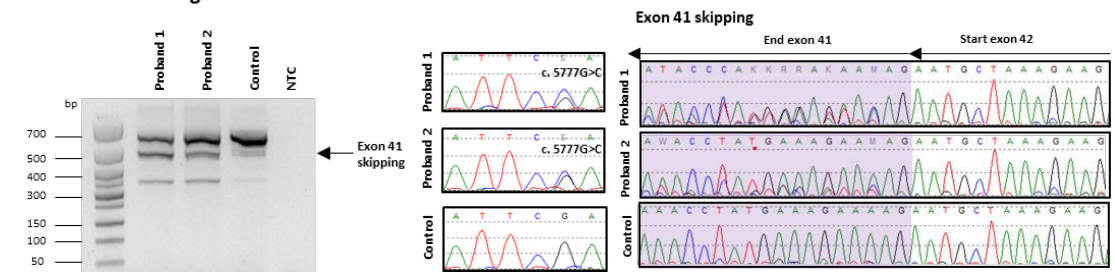


Figure S3: Impact of identified *CEP290* variants on splicing. **A)** Amplification of exons 10-14 of the *CEP290* gene shows that the c.955del variant does not affect splicing. **B)** Amplification of exons 40-44 reveals no skipping of exon 42, which contains the c.5777G>C variant. However, exon 41 skipping is observed. The agarose gel demonstrates that the band corresponding to exon 41 skipping is more prominent in the probands compared to the control sample. NTC, no template control.

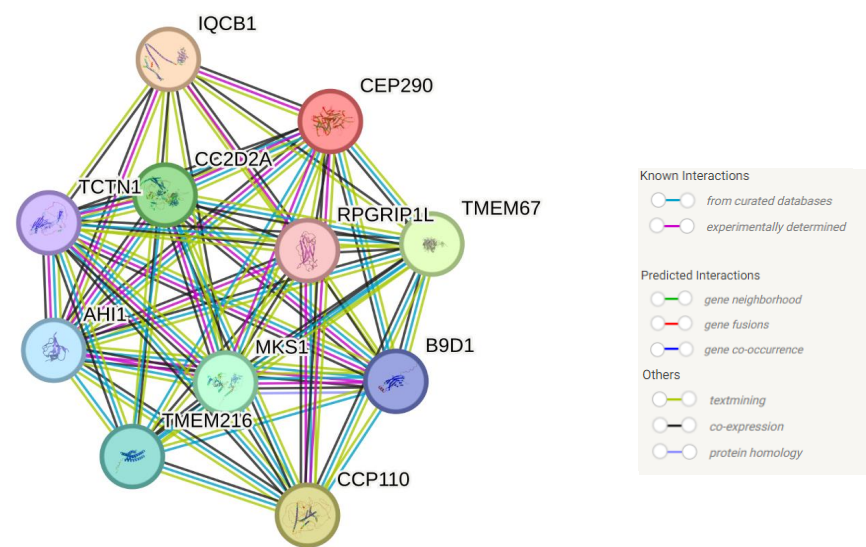


Figure S4: Protein-protein interaction network of CEP290. This figure illustrates the protein-protein interaction network of CEP290, including key interactors such as AHI1, CC2D2A, and RPGRIP1L. These proteins are well-established binding partners of CEP290 and have been implicated in modulating the phenotype of CEP290-related disorders.

3 Supplementary Tables

Table S1. Primers used to evaluate the effect on splicing of the variants identified.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Amplicon length
CEP290 10-14	TGTA AAAACGACGCCAGT GAATGAAAGCTATTGTGCATC CAGGAAACAGCTATGACC GTTCAGCTGTCTCTCAGC	546 pb
CEP290 40-44	TGTA AAAACGACGCCAGT GATCAAGAGAATGATGAACTG CAGGAAACAGCTATGACC CTTCTACAACAGAATCTCGAG	556 pb

The specific sequence is highlighted in bold, while the unmarked sequence corresponds to M13 forward and reverse, respectively.

Table S2. Variants in modifier genes (*AHI1*, *ARL13B*, *CC2D2A* and *RPGRIP1L*) identified in proband 1.

Proband 1								
Gene	Nucleotide change	Aminoacid change	Variant type	Zygosity	dbSNP	gnomAD	Revel	SpliceAI
ARL13B	c.1043C>G	p.(Thr348Ser)	missense	HOM_ALT	rs33944211	0.0964	0.067	0.01
CC2D2A	c.247+26A>G	-	intronic	HOM_ALT	rs10000250	0.8602	-	0
CC2D2A	c.1519A>G	p.(Lys507Glu)	missense	HET	rs144439937	0.00638	0.683	0
CC2D2A	c.1764+45T>G	-	intronic	HET	rs1558572	0.7535	-	0
CC2D2A	c.2003+19C>T	-	intronic	HET	rs17476642	0.1093	-	0
CC2D2A	c.2003+730A>G	-	intronic	HET	rs1125378	0.7563	-	0.03
CC2D2A	c.3183-8T>C	-	3'UTR	HOM_ALT	rs13121363	0.7061	-	0
CC2D2A	c.3288+41A>C	-	intronic	HOM_ALT	rs13116304	0.7073	-	0
CC2D2A	c.4065+28A>T	-	3'UTR	HOM_ALT	rs6832789	0.9856	-	0
CC2D2A	c.*21G>C	0.445	3'UTR	HET	rs1134634	0.5772	-	0
CC2D2A	c.*64T>G	0.556	3'UTR	HET	-	0.000002045	-	0
AHI1	c.3426+13G>A	-	3'UTR	HOM_ALT	rs6914831	0.5876	-	0
AHI1	c.3015A>G	p.(Ser1005Ser)	synonymous	HET	rs41287054	0.01752	-	0
AHI1	c.2961+7_2961+21delinsGACCTTTTAAAGTTTTAAA	-	Splice site	HET	rs786200964	-	-	0
AHI1	c.2961+17C>A	-	intronic	HET	rs201291897	-	-	0
AHI1	c.2961+16G>A	-	intronic	HET	rs199671265	-	-	0
AHI1	c.2961+14A>T	-	intronic	HET	rs200731111	-	-	0
AHI1	c.2961+9A>C	-	intronic	HET	rs201870233	-	-	0
AHI1	c.2961+8T>A	-	Splice site	HET	rs199887601	-	-	0
AHI1	c.2961+7T>G	-	Splice site	HET	rs200658320	-	-	0
AHI1	c.1780-14C>T	-	intronic	HOM_ALT	rs2757645	0.9044	-	0
RPGRIP1L	c.*55T>A	-	3'UTR	HET	rs4784319	0.3727	-	0.02
RPGRIP1L	c.2959-32G>A	-	intronic	HET	rs7203525	0.3441	-	0.12

*MANE transcripts NM_001174150.2 (*ARL13B*), NM_001378615.1 (*CC2D2A*), NM_001134831.2 (*AHI1*).

Table S3. Variants in modifier genes (*AHI1*, *ARL13B*, *CC2D2A* and *RPGRIP1L*) in proband 2.

Proband 2								
Gene	Nucleotide change	Aminoacid change	Variant type	Zygotity	dbSNP	gnomAD	Revel	SpliceAI
<i>ARL13B</i>	c.1043C>G	p.(Thr348Ser)	missense	HET	rs33944211	0.0964	0.067	0.01
<i>CC2D2A</i>	c.247+26A>G	-	intronic	HET	rs10000250	0.8602	-	0
<i>CC2D2A</i>	c.1765-24A>G	-	intronic	HET	rs1861044	0.5457	-	0
<i>CC2D2A</i>	c.1764+45T>G	-	intronic	HOM_ALT	rs1558572	0.7535	-	0
<i>CC2D2A</i>	c.2003+19C>T	-	intronic	HET	rs17476642	0.1093	-	0
<i>CC2D2A</i>	c.2003+730A>G	-	intronic	HOM_ALT	rs1125378	0.7563	-	0.03
<i>CC2D2A</i>	c.3183-8T>C	-	3'UTR	HOM_ALT	rs13121363	0.7061	-	0
<i>CC2D2A</i>	c.3288+41A>C	-	intronic	HOM_ALT	rs13116304	0.7073	-	0
<i>CC2D2A</i>	c.4065+28A>T	-	3'UTR	HOM_ALT	rs6832789	0.9856	-	0
<i>CC2D2A</i>	c.*21G>C	0.445	3'UTR	HET	rs1134634	0.5772	-	0
<i>CC2D2A</i>	c.*64T>G	0.556	3'UTR	HET	-	0.000002045	-	0
<i>AHI1</i>	c.3426+13G>A	-	3'UTR	HET	rs6914831	0.5876	-	0
<i>AHI1</i>	c.3015A>G	p.(Ser1005Ser)	synonymous	HET	rs41287054	0.01752	-	0
<i>AHI1</i>	c.1780-14C>T	-	intronic	HOM_ALT	rs2757645	0.9044	-	0
<i>RPGRIP1L</i>	c.*55T>A	-	3'UTR	HET	rs4784319	0.3727	-	0.02
<i>RPGRIP1L</i>	c.2959-32G>A	-	intronic	HET	rs7203525	0.3441	-	0.12

*MANE transcripts NM_001174150.2 (*ARL13B*), NM_001378615.1 (*CC2D2A*), NM_001134831.2 (*AHI1*).

Table S4: Clinical and genetic characteristics of individuals with biallelic pathogenic *CEP290* variants identified in our internal IRD cohort.

Case	Sex	AO	Age	FamHx	Clinical diagnosis	Alleles	Location
1	F	1	28	No	Joubert syndrome	c.5227-13G>A, p.(?) c.6271-8T>G, p.(?)	Intron 38 Intron 45
2	M	1	20	No	Leber Congenital Amaurosis	c.2991+1655A>G, p.(?) c.2991+1655A>G, p.(?)	Intron 26 Intron 26
3	M	1	14	No	Leber Congenital Amaurosis	c.2991+1655A>G, p.(?) c.2991+1655A>G, p.(?)	Intron 26 Intron 26
4	M	1	10	No	Leber Congenital Amaurosis	c.2991+1655A>G, p.(?) c.3400_3401del, p.(Asp1134Ter)	Intron 26 Exon 29
5	F	14	28	No	Retinitis Pigmentosa	c.5932C>T, p.(Arg1978Ter) c.7341dup, p.(Leu2448ThrfsTer8)	Exon 43 Exon 54
6	M	1	4	No	Leber Congenital Amaurosis	c.41A>G, p.(Asp14Gly) c.133_136del, p.(Gln45LysfsTer3)	Exon 2 Exon 3
7	M	1	5	No	Leber Congenital Amaurosis	c.2991+1655A>G, p.(?) c.2991+1655A>G, p.(?)	Intron 26 Intron 26
8	F	10	32	No	Senior-Loken syndrome	c.4813-1G>A, p.(?) c.5736G>A, p.(Trp1912Ter)	Intron 36 Exon 42
9	M	1	6	No	Leber Congenital Amaurosis	c.2991+1655A>G, p.(?) c.4661_4663del, p.(Glu1554del)	Intron 26 Exon 35

F: female, M: male, AO: Age of onset, FamHx: Family history

Resum **article 3**

Títol: Estratègies genòmiques personalitzades per millorar el diagnòstic de les distròfies hereditàries de la retina: un enfocament seqüencial centrat en el pacient (*Personalised genomic strategies improve diagnostic yield in inherited retinal dystrophies: a stepwise, patient-centred approach*).

Objectiu: Avaluar l'impacte d'un enfocament genòmic personalitzat — integrant reanàlisi d'exoma (WES), seqüenciació de genoma (WGS), panells personalitzats i assajos funcionals— en casos no resolts de distròfies hereditàries de la retina (DHR).

Mètodes: Cohort retrospectiva de 597 individus (525 casos índex i 72 familiars). Dels 221 casos no resolts, 101 es van reavaluar mitjançant WES actualitzat, WGS en casos seleccionats i seqüenciació de regions complexes. La interpretació de variants va incloure criteris revisats, anàlisi de segregació i assajos funcionals (ARNm, minigen/midigen).

Resultats: El rendiment inicial va ser del 59,6% (313/525). L'aplicació de l'enfocament personalitzat en 101 casos no resolts va permetre obtenir 49 diagnòstics nous (42 índex i 7 familiars), amb un rendiment del 48,5% en aquesta subcohort i una taxa global del 67,6% (355/525).

Conclusions: Un enfocament seqüencial i centrat en el pacient augmenta significativament el diagnòstic molecular de les DHR. La reanàlisi periòdica, l'ús selectiu de WGS, els panells personalitzats i els estudis funcionals són estratègies escalables i transferibles a la pràctica clínica, i constitueixen una base sòlida per avançar cap a la medicina de precisió.

ARTICLE OPEN

Personalised genomic strategies improve diagnostic yield in inherited retinal dystrophies: a stepwise, patient-centred approach

Anna Esteve-Garcia^{1,2}, Ariadna Padró-Miquel³, Jaume Català-Mora^{4,5}, Cristina Sau¹, Delia Yubero^{6,7}, Zelia Corradi⁸, Frans P. M. Cremers⁸, Pilar Barberán-Martínez⁹, José M. Millán^{6,9,10}, Gema García-García^{6,9}, Ilyana Ismael¹¹, Luis Arias¹¹, Estefania Cobos^{5,11}✉ and Cinthia Aguilera³✉

© The Author(s) 2025

BACKGROUND: Inherited retinal dystrophies (IRDs) are a genetically heterogeneous group of conditions, with approximately 40% of cases remaining unresolved after initial genetic testing. This study aimed to assess the impact of a personalised genomic approach integrating whole-exome sequencing (WES) reanalysis, whole-genome sequencing (WGS), customised gene panels and functional assays to improve diagnostic yield in unresolved cases.

SUBJECTS/METHODS: We retrospectively reviewed a cohort of 597 individuals with IRDs, including 525 probands and 72 affected relatives. Among the 221 genetically unresolved cases, a subset of 101 was selected for stepwise re-evaluation. This included WES reanalysis with updated virtual panels, WGS in selected cases and targeted sequencing of complex regions. Variant interpretation was refined using updated classification criteria, segregation analysis and functional assays such as mRNA and minigene/midigene studies.

RESULTS: An initial diagnostic yield of 59.6% (313/525) was achieved through first-tier genetic testing. Re-evaluation of the 101 prioritised cases resulted in 42 new diagnoses in probands and resolution of 7 more familial cases, yielding 49 additional diagnoses among previously unresolved patients (48.5%). This increased the overall diagnostic rate for probands to 67.6% (355/525). Functional assays confirmed pathogenicity of variants in *ABCA4*, *ATF6*, *REEP6*, and *TULP1*, while WGS enabled the detection of structural and deep intronic variants, further enhancing diagnostic accuracy.

CONCLUSIONS: A patient-centred, stepwise genomic approach significantly improved the molecular diagnosis of IRDs. This strategy supports the clinical utility of periodic WES reanalysis and targeted use of customised panels, WGS and functional assays. The proposed workflow is scalable and applicable to routine clinical practice, contributing to precision medicine in IRDs.

Eye; <https://doi.org/10.1038/s41433-025-03981-1>

INTRODUCTION

Inherited retinal dystrophies (IRDs) are a leading cause of blindness worldwide, characterised by extensive genetic heterogeneity that complicates molecular diagnosis [1–3]. To date, pathogenic variants in over 300 genes have been implicated in IRDs (RetNet, <https://web.sph.uth.edu/RetNet/>; accessed on 3 February 2025), affecting both coding and non-coding regions. These include deep intronic variants (e.g., *ABCA4*, *CEP290* and *USH2A*), GC-rich regions (*RPGR*-ORF15) and structural variants (SVs) such as large deletions and complex rearrangements [4–10].

Next-generation sequencing (NGS), particularly whole-exome sequencing (WES) and gene panels, has transformed IRD diagnostics by enabling simultaneous analysis of multiple genes [11–13]. However, despite these advancements, a significant proportion of cases remain unresolved, with diagnostic yields ranging from 49% to 75%, leaving nearly 40% of patients without a molecular diagnosis [3, 12–14]. This highlights key limitations of current NGS approaches: gene panels fail to capture non-targeted regions and WES has limited sensitivity for deep intronic variants [15]. Additionally, both methods struggle with SVs detection and

pathogenic variants in repetitive or homologous regions [15]. Whole-genome sequencing (WGS) provides a more comprehensive analysis, covering both coding and non-coding regions and allowing the identification of complex genomic rearrangements often missed by WES [16–20].

Beyond sequencing, variant interpretation remains a challenge, with many variants classified as variants of uncertain significance (VUS), complicating clinical decision-making [2, 21]. Emerging research continues to refine variant classification, revealing that synonymous and hypomorphic variants, previously considered benign, can contribute to IRD pathogenesis [22, 23]. This highlights the need for periodic WES reanalysis and refinements to American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology (ACMG-AMP) guidelines to improve diagnostic accuracy [24–26].

Functional validation is critical for confirming variant pathogenicity, particularly in non-coding regions. However, the inaccessibility of retinal tissue remains a key challenge [27]. In vitro assays, such as mRNA analysis and minigene/midigene assays, have emerged as powerful tools to elucidate IRD mechanisms and improve variant interpretation [28, 29].

This study focuses on a subset of 101 unresolved cases, selected from a larger diagnostic cohort, to assess the impact of a personalised, case-by-case re-evaluation strategy. By integrating WES reanalysis, customised gene panels, WGS, functional assays and updated classification frameworks, this approach aims to enhance the diagnostic yield for IRDs. Beyond improving molecular diagnosis, this strategy contributes to a better understanding of IRD pathogenesis, facilitates access to gene-targeted therapies and enables more accurate genetic counselling.

SUBJECTS AND METHODS

Cohort description

We retrospectively reviewed the clinical and genetic records of 597 adult patients with a confirmed clinical diagnosis of IRD, all monitored at the Hereditary Retinal Dystrophies Unit of Bellvitge University Hospital. This cohort included 525 probands from unrelated families and 72 affected relatives (familial cases). Clinical diagnoses were based on comprehensive ophthalmological assessments, including fundus examination, optical coherence tomography, autofluorescence imaging and electrophysiology when indicated. All individuals underwent genetic testing between 2021 and 2024, primarily through targeted gene panels or WES, both of which included copy number variant (CNV) analysis as part of standard diagnostic protocols.

Among the 525 probands, 221 remained without a conclusive molecular diagnosis after initial testing. Based on clinical presentation, family history and previous genetic findings, a subset of 101 unresolved cases were selected for further re-evaluation. This subgroup constitutes the primary study population in which the personalised genomic approach described in this study was applied.

Genetic testing workflow

Initially, cases were classified as resolved or unresolved based on prior genetic results. From the 221 unresolved cases, a subset of 101 cases was selected for stepwise, case-by-case genetic re-evaluation. This re-assessment involved one or more of the following approaches: variant reinterpretation and reclassification, WES reanalysis with updated virtual panels, WGS, customised gene panels or functional studies, depending on the specific characteristics of each case. This additional testing was performed between 6 months and 3 years after the initial analysis, depending on the clinical course, newly available evidence and the implementation of updated sequencing tools.

Case prioritisation was based on both clinical and genetic criteria, including reproductive planning, family history of IRDs, the presence of a single pathogenic variant in recessive genes with a consistent phenotype, and cases with no candidate variants in which the initial study had been performed over a year earlier—especially when the original panel might not have included recently associated IRD genes. Notably, timing alone was not the sole determinant; in several cases, prioritisation was driven more by the nature of preliminary findings than by the time elapsed since

the first analysis. Exclusion criteria included patient mortality, lack of clinical follow-up or reclassification of the phenotype as non-IRD.

WES REANALYSIS

Unresolved cases underwent WES reanalysis using an updated IRD gene panel for non-syndromic cases (Supplementary Data) and a phenotype-driven approach with Human Phenotype Ontology (HPO)-guided analysis for syndromic IRDs [30]. Updated annotation tools were applied in both analyses, with bioinformatics performed using Datagenomics software (versions 19.1 and 22.4.0) and CNV detection was carried out via the VarSeq platform (Golden Helix).

WHOLE-GENOME SEQUENCING ANALYSIS AND CUSTOMISED GENE PANEL SEQUENCING

WGS was performed using the KAPA HyperPrep Kit (Roche) and the xGen DNA Library Prep EZ Kit (Integrated DNA Technologies), with sequencing conducted on the Illumina NovaSeq 6000 platform. Bioinformatics analysis was carried out using the CNAG (Centro Nacional de Análisis Genómico) GPAP (Genome-Phenome Analysis Platform, hg19) and Emedgene (Illumina, hg19) platforms. Variants were filtered using an expanded IRD panel that also included candidate IRD genes (Supplementary Data) [17, 31]. A customised gene panel targeting *ABCA4* deep intronic regions and *RPGR*-ORF15 repetitive region was processed using the Agilent SureSelect XT HS2 and the Magnis NGS Prep system (Agilent Technologies, CA, USA), sequenced on the Illumina MiSeq platform and analysed using the Datagenomics software.

VARIANT FILTERING AND CLASSIFICATION

Variants with read depth >20x and an allele frequency ≥20% were considered, except for *RPGR*-ORF15, where all variants were retained. A minor allele frequency threshold of 0.05 in gnomAD v2.1.1 [32] was applied, prioritising deleterious variants, including nonsense, frameshift, splice site and missense variants. Pathogenicity was assessed using REVEL [33] for missense variants and SpliceAI [34] for splicing impact. Variants were classified according to the ACMG-AMP classifications standards [24], the latest recommendations from the Sequence Variant Interpretation Working Group (SVI-WG) [35] and gene-specific adaptations, such as those from Cornelis et al. (2023) for *ABCA4* gene [36].

VALIDATION OF VARIANTS AND SPLICE SITE ASSAYS

Variants were validated using Sanger sequencing, digital PCR, array-CGH or MLPA, depending on variant type, following standard protocols. Splicing impact was assessed through mRNA analysis and minigene/midigene assays.

To evaluate the impact of *REEP6* c.349-4G>T and c.349-1G>A variants, as well as the *ATF6* c.160-8A>G variant, RNA was extracted from nasal ciliary cells (*REEP6*) and whole blood (*ATF6*) using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and Maxwell® RSC SimplyRNA Blood Kit (Promega), respectively. cDNA synthesis was performed using the PrimeScript RT Reagent Kit (TaKaRa), followed by PCR amplification with primers listed in Supplementary Table S1. PCR products were purified (ExoSAP-IT, Applied Biosystems) and analysed by Sanger sequencing (BigDye Terminator v3.1, Applied Biosystems). Electropherograms were analysed using Mutation Surveyor v5.1.2 (for *ATF6*) and FinchTV (for *REEP6*) software. The potential protein impact of these variants was assessed using ExPASy translate tool [37].

The splicing effect of *ABCA4* c.859-442C>T variant was investigated using an in vitro splice assay based on a previously established wild-type midigene (BA7) containing *ABCA4* exons 7 to 11 [38]. The variant was introduced via site-directed mutagenesis

¹Clinical Genetics Unit, Metropolitan South Clinical Laboratory, Bellvitge University Hospital, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. ²PhD Program in Genetics, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ³Genetics Laboratory, Metropolitan South Clinical Laboratory, Bellvitge University Hospital, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. ⁴Department of Ophthalmology, SJD Barcelona Children's Hospital, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain. ⁵Hereditary Retinal Dystrophies Unit, Ophthalmology Departments, SJD Barcelona Children's Hospital and University Hospital of Bellvitge, Barcelona 08950, Spain. ⁶Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. ⁷Genetics Department, Hospital Sant Joan de Déu and Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. ⁸Department of Human Genetics, Radboud University Medical Center, Nijmegen, the Netherlands. ⁹Molecular, Cellular, and Genomic Biomedicine Group, IIS-La Fe, Valencia, Spain. ¹⁰University and Polytechnic La Fe Hospital of Valencia, Valencia, Spain. ¹¹Department of Ophthalmology, Bellvitge University Hospital, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. ✉email: ecobos@bellvitgehospital.cat; caguilera@bellvitgehospital.cat

Received: 10 March 2025 Revised: 30 July 2025 Accepted: 29 August 2025
Published online: 09 September 2025

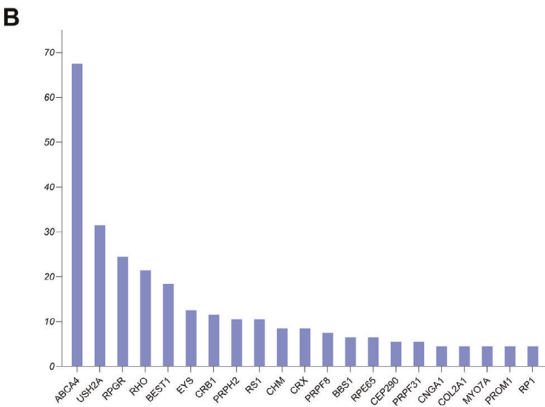
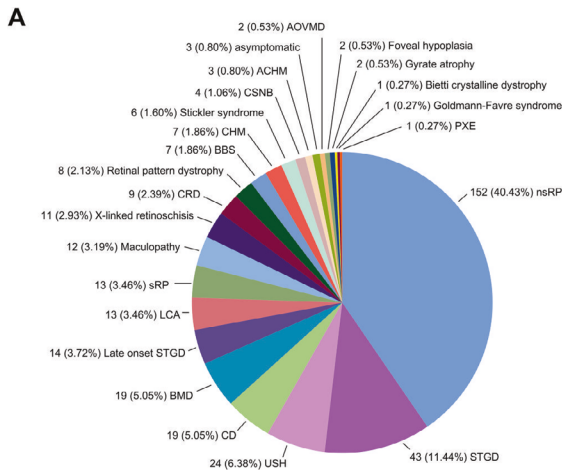


Fig. 1 Clinical and genetic distribution in resolved cases. **A** The most common clinical diagnoses in the genetically resolved cohort ($n = 376$) were non-syndromic retinitis pigmentosa (nsRP, 40.4%, 152/376), Stargardt disease (STGD, 11.4%, 43/376) and Usher syndrome (USH, 6.3%, 24/376). **B** Pathogenic variants were identified in 70 genes across 24 IRD subtypes. Only genes implicated in ≥ 5 cases are shown; the remaining 49 genes not shown were found in fewer than 5 cases. The most frequently affected genes were *ABCA4* (18.1%, 68/376), *USH2A* (8.5%, 32/376), and *RPGR* (6.7%, 25/376). CD cone dystrophy, BMD best macular dystrophy, LCA leber congenital amaurosis, sRP syndromic retinitis pigmentosa, CRD cone-rod dystrophy, BBS Bardet-Biedl syndrome, CHM choroideremia, CSNB congenital stationary night blindness, ACHM achromatopsia, AOVMD adult-onset vitelliform macular dystrophy, PXE pseudoxanthoma elasticum.

using oligonucleotides listed in Supplementary Table S2. Wild-type and mutant constructs were transfected into HEK293T cells, followed by RNA extraction (Nucleospin RNA, Machery-Nagel) and cDNA synthesis (iScript, Bio-Rad). RT-PCR was performed using *ACTB* and *RHO* exon 5 as controls. Splicing defects were analysed via electrophoresis, Sanger sequencing and semi-quantitative mRNA analysis using Fiji software. Further details on the midigene assay are provided in the Supplementary Material.

Additionally, a minigene splice assay for *TULP1* c.822G>T was conducted as previously described [39].

Ethical considerations

This study was approved by the Research Ethics Committee of Bellvitge University Hospital (reference number PR014/22) and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki [40]. Informed consent was obtained from all participants and biological samples were sourced from the Biobank HUB-ICO-IDIBELL, part of the ISCIII Biobanks and Biomodels Platform when needed.

RESULTS

Cohort characterisation

Of the 597 cases, 376 were classified as genetically resolved (P1-P376 in Supplementary Table S3), including 313 probands and 63 familial cases. This cohort exhibited a near-equal sex distribution (189 females and 187 males). The mean age of symptom onset was 23.3 years (range: 1 to 75 years), with 51.1% (192/376) of patients reporting a family history of IRD. Pathogenic variants were identified in 70 genes across 24 IRD subtypes (Fig. 1). Among the 525 probands tested, first-tier genetic testing achieved a diagnostic yield of 59.6% (313/525).

From the 221 unresolved cases, a subset of 101 was selected for personalised reanalysis based on clinical and genetic prioritisation criteria. This group constitutes the primary study population.

Diagnostic improvement

The 101 selected cases underwent further analysis through a stepwise, case-by-case strategy. Variant re-evaluation and

reclassification were conducted for 41 cases with VUS that matched the clinical phenotype (P377–P417, Table 1), resolving 18 cases through VUS reclassification to likely pathogenic or pathogenic (Fig. 2). WES reanalysis identified 16 additional diagnoses, while WGS and customised gene panels provided molecular diagnoses for 15 more cases from a subset of 60 patients (P418–P477, Table 2).

In total, 49 new molecular diagnoses were established, comprising 42 probands and 7 familial cases. This personalised approach achieved a diagnostic rate of 48.5% (49/101) in reassessed cases and increased the overall diagnostic rate for probands to 67.6% (355/525), reflecting a 13.4% relative improvement in diagnostic yield.

Reclassification of candidate variants

Family co-segregation and functional studies played crucial roles in reclassifying VUS. In patient P394, the *REEP6* c.349-4G>T variant, initially classified as a VUS, was upgraded to likely pathogenic following co-segregation and mRNA analysis, which revealed a 32 nt deletion in exon 4 resulting in a frameshift (Supplementary Fig. S1). Computational predictions (SpliceAI) predicted minimal splicing impact (acceptor loss: 0.07; cryptic acceptor activation: 0.16) (Supplementary Table S4), but cDNA sequencing demonstrated loss-of-function, supporting pathogenicity. Conversely, despite a strong genotype-phenotype correlation, the *AIPL1* c.767T>G variant identified in case P395 remained classified as a VUS due to insufficient functional evidence.

In addition to the 18 resolved cases, the reclassification of variants also contributed to the partial resolution of 23 additional cases, for which future evidence may provide further insights leading to conclusive classification.

Non-coding variants

Pathogenic non-coding variants were identified in *ABCA4*, *ATF6*, *NPHP4*, *RPGRIP1* and *USH2A* genes through WES reanalysis, a customised *ABCA4* panel and WGS (Table 2). Seven deep intronic variants in *ABCA4* were detected, including six previously reported [36] (c.4539+2064C>T in P420, P429 and P432; c.5196+1137G>A in P423 and P430; and c.4253+43G>A in

Table 1. Cases with VUS and phenotype correlation.

ID	Age	Gender	AO	FamHx	Clinical diagnosis	Proband case	Final result	Gene	Transcript	Inh. pattern	Allele 1 cDNA	protein	variant ACMG classification	Criteria applied for VUS reassessment and reclassification	Allele 2 cDNA	protein	variant ACMG classification	Criteria applied for VUS reassessment and reclassification	Allele Segreg.
P377	62	M	50	Yes	Best macular dystrophy	Yes	Resolved	<i>BEST1</i>	NM_004183.4	AD	c.35C>A	p.(Ala12Asp)	LP	PM2_sup, PP3_mod, PM1_mod, PP2_sup					-
P378	67	F	5	Yes	Usher syndrome	Yes	Resolved	<i>CDH23</i>	NM_022124.6	AR	c.7199C>T	p.(Pro2400Leu)	LP	PM2_sup, PM3_strong, PP3_sup	c.7221C>A	p.(Tyr2407*)	P	trans	trans
P379	25	F	21	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	Resolved	<i>CNGA1</i>	NM_001379270.1	AR	c.1448T>G	p.(Leu483Arg)	LP	PM2_sup, PP3_strong, PM3_mod	c.85C>T	p.(Arg287)	P	trans	trans
P380	71	F	10	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	Resolved	<i>CNGB1</i>	NM_001297.5	AR	c.1644-3C>G	p.(?)	LP	PM2_sup, PP3_sup, PM3_mod, PP1_strong	c.2868-2869insTA	p.(Val957*)	LP	trans	trans
P381	52	F	21	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	Resolved	<i>CNGB1</i>	NM_001297.5	AR	c.1644-3C>G	p.(?)	LP	PM3_sup, PP3_sup, PM3_mod, PP1_strong	c.2293C>T	p.(Arg765Cys)	LP	trans	trans
P382	73	F	30	Yes	Stargardt disease	Yes	Resolved	<i>CHB1</i>	NM_021253.3	AR	c.4154A>C	p.(Glu1385Ala)	LP	PM2_sup, PM3_mod, PP1_mod, PP3_sup	c.498-506del	p.(Ile167_Gly169del)	P	trans	trans
P383	70	F	35	Yes	Stargardt disease	No	Resolved	<i>CHB1</i>	NM_021253.3	AR	c.4154A>C	p.(Glu1385Ala)	LP	PM2_sup, PM3_mod, PP1_mod, PP3_sup	c.498-506del	p.(Ile167_Gly169del)	P	trans	trans
P384	49	F	43	No	Maculopathy	Yes	Resolved	<i>CHB1</i>	NM_021253.3	AR	c.1760G>A	p.Cys587Tyr	LP	PM2_sup, PP3_strong, PM3_strong	c.613-619del	p.(Ile205Aspfs*13)	P	trans	trans
P385	18	M	4	No	Cone-rod dystrophy	Yes	Resolved	<i>GUICY2D</i>	NM_000180.3	AD	c.54G>A	p.(Trp181*)	LP	PM2_sup, PP3_strong, PM3_strong				-	trans
P386	56	F	1	Yes	Leber congenital amaurosis	Yes	Resolved	<i>KCNV13</i>	NM_002242.4	AR	c.89T>C	p.(Ser287Pro)	LP	PM2_sup, PP1_mod, PP3_strong	c.89T>C	p.(Ser287Pro)	LP	trans	trans
P387	55	F	1	Yes	Leber congenital amaurosis	No	Resolved	<i>KCNV13</i>	NM_002242.4	AR	c.89T>C	p.(Ser287Pro)	LP	PM2_sup, PP1_mod, PP3_strong	c.89T>C	p.(Ser287Pro)	LP	trans	trans
P388	39	F	5	No	Albinism	Yes	Resolved	<i>OCA2/ITR</i>	NM_000752/ NM_000372.4	digenic	c.1327G>A	p.(Val43Ile)	P	PM3_very strong, PM4_mod, PP3_sup	c.1205G>A	p.(Arg402Gln)	Polymorphism	Not available	trans
P389	54	F	33	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	Resolved	<i>PCARE</i>	NM_001029883.3	AR	c.267T>C	p.(Pro893Ser)	LP	PM2_sup, PM3_strong, PP1_mod	c.2950C>T	p.(Arg984*)	P	trans	trans
P390	48	F	14	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	Resolved	<i>PCARE</i>	NM_001029883.3	AR	c.267T>C	p.(Pro893Ser)	LP	PM2_sup, PM3_strong, PP1_mod	c.2950C>T	p.(Arg984*)	P	trans	trans
P391	73	F	35	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	Resolved	<i>PDE6A</i>	NM_000440.2	AR	c.1085+1G>T	p.(?)	P	PM2_sup, PP3_mod, PM3_mod	c.1957C>T	p.(Arg653*)	P	trans	trans
P392	56	M	50	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	Resolved	<i>POMGNT1</i>	NM_017739.4	AR	c.629G>T	p.(Trp210Leu)	LP	PM2_sup, PP3_mod, PM3_mod, PP3_strong	c.860T>G	p.(Ile287Ser)	P	trans	trans
P393	59	M	55	Yes	Maculopathy	Yes	Resolved	<i>RDH5</i>	NM_002905.5	AD	c.592del	p.(Ile198Tyrfs*15)	LP	PM2_sup, PP3_strong				-	trans
P394	59	M	22	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	Resolved	<i>REEP6</i>	NM_138935.4	AR	c.349-4G>T	p.(Cys117Argfs*59)	LP	PM2_sup, PP3_strong	c.349-1G>A	p.(Cys117Argfs*59)	P	trans	trans
P395	52	F	1	No	Leber congenital amaurosis	Yes	Partially resolved	<i>AIPL1</i>	NM_014364.4	AR	c.767T>G	p.(Ile256Ser)	VUS	PM2_sup, PP3_sup, PM3_mod	c.767T>G	p.(Ile256Ser)	VUS	PM2_sup, PP3_sup, PM3_mod	trans
P396	59	M	50	No	Best macular dystrophy	Yes	Partially resolved	<i>BEST1</i>	NM_004183.4	AD	c.847T>C	p.(Phe283Leu)	VUS	PM2_sup, PP3_mod, PM1_mod				ND	trans
P397	32	M	5	No	Usher syndrome	Yes	Partially resolved	<i>CDH23</i>	NM_022124.6	AR	c.8699A>G	p.(Asp290Gly)	VUS	PM2_sup, BP4_sup, PM3_mod	c.289-1_304del	p.(?)	LP	trans	trans
P398	57	M	45	No	Cone-rod dystrophy	Yes	Partially resolved	<i>CDHR1</i>	NM_033100.4	AR	c.131G>A	p.(Gly21Ser)	VUS	PM2_sup, PP3_sup, PM3_mod	c.2522-2528del	p.(Ile841Serfs*119)	LP	trans	trans
P399	87	F	50	No	Cone-rod dystrophy	Yes	Partially resolved	<i>CDHR1</i>	NM_033100.4	AR	c.1367C>A	p.(Ala456Glu)	VUS	PM2_sup, PP3_strong	c.1485+2T>G	p.(?)	P	trans	trans
P400	52	F	10	No	Cone-rod dystrophy	Yes	Partially resolved	<i>CDHR1</i>	NM_033100.4	AR	c.1367C>A	p.(Ala456Glu)	VUS	PM2_sup, PP3_strong	c.1367C>A	p.(Ala456Glu)	VUS	PM2_sup, PP3_strong	trans
P401	77	F	40	No	Cone-rod dystrophy	Yes	Partially resolved	<i>CFAP410</i>	NM_004928.2	AR	c.140T>C	p.(Leu47Pro)	VUS	PM2_sup	c.140T>C	p.(Leu47Pro)	VUS	PM2_sup	trans

Table 1. continued

ID	Age	Gender	AO	FamHx	Clinical diagnosis	Proband case	Final result	Gene	Transcript	Inh. pattern	Allele 1 cDNA	protein	variant ACMG classification	Criteria applied for VUS reclassification and reclassification	Allele 2 cDNA	protein	variant ACMG classification	Criteria applied for VUS reclassification and reclassification	Allele Segreg.
P402	79	F	20	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	Partially resolved	CNGB1	NM_001297.5	AR	c.2095G>A	p.(Asp69Asn)	VUS	PM2_sup	c.2095G>A	p.(Asp69Asn)	VUS	PM2_sup	trans
P403	71	M	65	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	Partially resolved	EIF5	NM_001142800.2	AR	c.8627G>T	p.(Gly287Val)	VUS	PM2_sup	c.8143C>T	p.(Arg271Ser)	P	PM2_sup	trans
P404	84	M	50	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	Partially resolved	FSCN2	NM_001077182.3	AD	c.1444del	p.(Arg482Alafs)	VUS	PM2_sup, PM4_mod					-
P405	47	M	10	No	Leber congenital amaurosis	Yes	Partially resolved	GUCY2D	NM_000180.4	AR	c.736A>C	p.(Met246Leu)	VUS	PM2_sup, PM1_mod, PM3_sup	c.3025A>C	p.(Met100Leu)	P	PM2_sup	trans
P406	26	M	20	No	Familial exudative vitreoretinopathy	Yes	Partially resolved	LRP5	NM_002335.4	AD	c.3220G>T	p.(Val1074Phe)	VUS	PM2_sup, PP3_mod, PP1_sup					ND
P407	20	M	15	Yes	Familial exudative vitreoretinopathy	No	Partially resolved	LRP5	NM_002335.4	AD	c.3220G>T	p.(Val1074Phe)	VUS	PM2_sup, PP3_mod, PP1_sup					ND
P408	63	M	40	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	Partially resolved	MERTK	NM_006343.3	AR	c.950G>A	p.(Cys317Tyr)	VUS	PM2_sup	c.2215_2216del	p.(Val739Cysfs*7)	P	PM2_sup, PP3_sup	trans
P409	34	M	10	No	Usher syndrome	Yes	Partially resolved	MYO7A	NM_000260.4	AR	c.5537C>A	p.(Pro1846His)	VUS	PM2_sup, PP3_sup, PM3_mod	c.6025del	p.(Ala2009Profs*32)	P	PM2_sup	trans
P410	72	F	unknown	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	Partially resolved	PDE6B	NM_000283.4	AR	c.1148T>A	p.(Val383Glu)	VUS	PM2_sup, PP3_mod, PM3_sup	c.299G>A	p.(Arg100His)	LP	PM2_sup	trans
P411	50	F	4	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	Partially resolved	PDE6B	NM_000283.4	AR	c.2176T>G	p.(Trp726Gly)	VUS	PM2_sup, PP3_sup	c.1879C>G	p.(Arg627Gly)	VUS	PM2_sup, PP3_sup	trans
P412	25	M	3	No	Achromatopsia	Yes	Partially resolved	PDE6C	NM_006204.4	AR	c.1950C>A	p.(Phe650Leu)	VUS	PM2_sup, PP3_sup	c.712C>T	p.(Arg238*)	P	PM2_sup	trans
P413	46	F	16	No	Fundus albipunctatus	Yes	Partially resolved	RDH5	NM_002905.5	AD/AR	c.463C>T	p.(Arg155Trp)	VUS	PM2_sup, PP4_sup	c.779A>C	p.(Asp260Ala)	VUS	PM1_sup, PM2_sup, PP3_sup, PM4_sup	ND
P414	40	F	17	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	Partially resolved	USH2A	NM_206933.4	AR	c.12403T>C	p.(Cys4135Arg)	VUS	PM2_sup, PM3_sup	c.2276G>T	p.(Cys759Phe)	P	PM2_sup	ND
P415	88	F	70	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	Partially resolved	USH2A	NM_206933.4	AR	c.7951A>G	p.(Asn2651Asp)	VUS	PM2_sup, BP4_sup, PM3_mod	c.2276G>T	p.(Cys759Phe)	P	PM2_sup	trans
P416	67	F	35	Yes	Usher syndrome	Yes	Partially resolved	USH2A	NM_206933.4	AR	c.1106T>A	p.(Val389Glu)	VUS	PM2_sup, PP3_sup, PS4_sup, PM3_sup	c.13575G>A	p.(Arg4192His)	LP	PM2_sup	trans
P417	62	M	58	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	Partially resolved	ZNF408	NM_024741.3	AR	c.1342C>T	p.(Arg48Cys)	VUS	PM2_sup, BP4_mod, PM3_mod	c.1342C>T	p.(Arg48Cys)	VUS	PM2_sup, BP4_mod, PM3_mod	ND

AD autosomal dominant, AO age of onset, AR autosomal recessive, FamHx family history of IRDs, F female, LP likely pathogenic, M male, mod moderate, ND not determined, P pathogenic, sup supporting, VUS variant of uncertain significance.

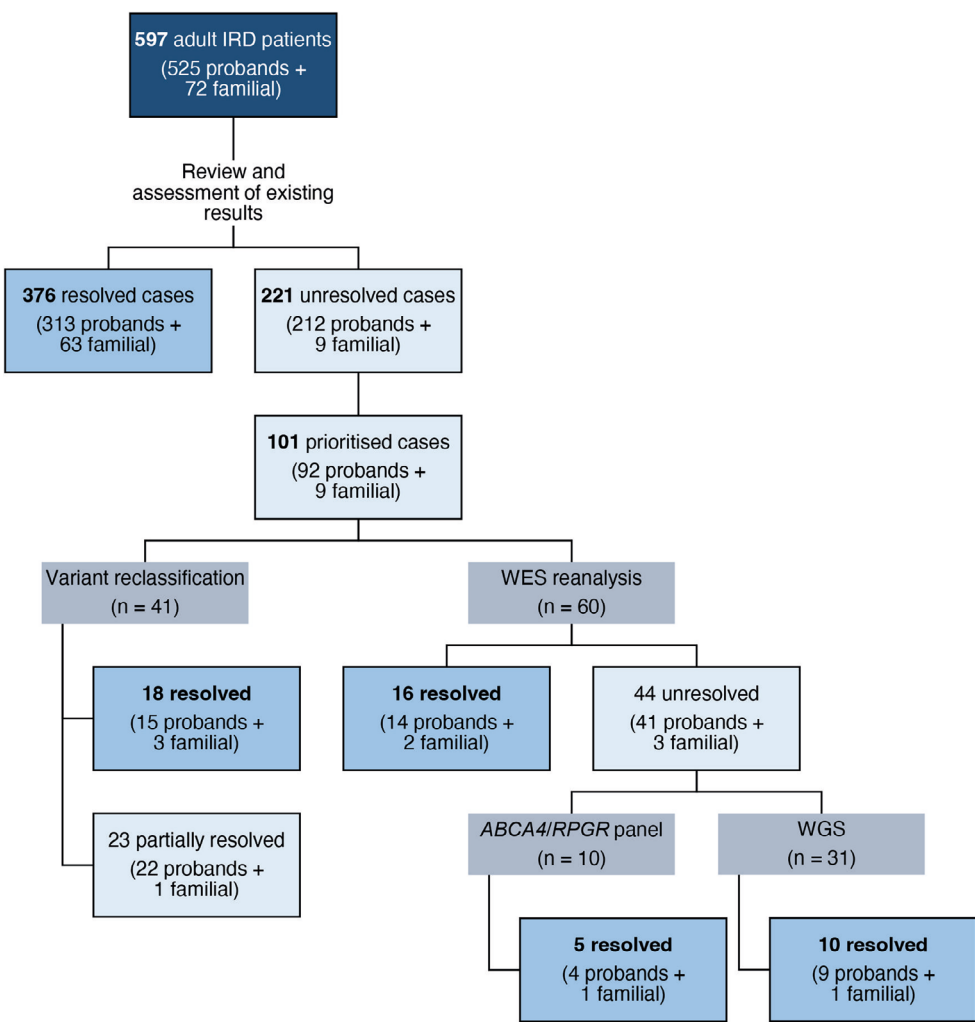


Fig. 2 Diagnostic yield improvement through stepwise testing. Among the 101 unresolved cases prioritised for further assessment, 41 cases (37 probands and 4 familial) with phenotype-associated VUS underwent reclassification, leading to 18 new diagnoses (15 probands and 3 familial). The remaining 23 cases were considered partially resolved due to phenotype-matching VUS. WES reanalysis identified 16 additional diagnoses (14 probands and 2 familial), while targeted *ABCA4/RPGR* panel testing and WGS contributed to 5 and 10 new diagnoses, respectively. However, 29 cases (28 probands and 1 familial) remained inconclusive due to insufficient evidence of pathogenicity or genotype-phenotype discordance.

P428) and a novel c.859-442C>T variant in patient P434. Segregation analysis clarified cases initially classified as resolved. For example, in patients P423 and P430, it confirmed that *ABCA4* variants were in *cis*, leading to the identification of deep intronic variants in *trans*, which resolved both cases. WGS identified the novel *ABCA4* c.859-442C>T variant in P434. SpliceAI predictions indicated acceptor and donor gain (acceptor gain: 0.28; donor gain: 0.23) (Supplementary Table S4). In vitro splice assays revealed three splicing alterations: inclusion of a 238 nt pseudoexon (37%), exons 8–10 skipping (35%) and exon 8 skipping (7%) (Supplementary Table S5), which resulted in frameshifts and premature stop codons, likely disrupting *ABCA4* function (Fig. 3). Consequently, the c.859-442C>T variant was classified as moderately-severe in line with previous severity *ABCA4* variants classifications [28, 38, 41]. In patient P448, diagnosed with non-progressive cone-rod dystrophy at age 10, WES reanalysis identified a homozygous

ATF6 c.160-8A>G variant with a strong genotype-phenotype correlation. SpliceAI predicted a highly impactful acceptor gain (score: 0.99) and a minor acceptor loss (score 0.11) (Supplementary Table S4). mRNA analysis confirmed the inclusion of 7 nt of intron 2 into the coding sequence, leading to a frameshift and introducing a premature stop codon (Supplementary Fig. S2). This led to the reclassification of the variant as likely pathogenic. In siblings P435 and P436, biallelic splice-site *NPHP4* variants (c.2485+2T>C and c.2611+1G>A) were identified, which had been missed due to the absence of *NPHP4* from the original virtual panel. This finding confirmed the diagnosis of Senior-Loken syndrome and revealed previously unrecognised kidney involvement in one sibling. WES reanalysis also identified a second *RPGRIP1* c.2367+23del variant in *trans* with a previously detected c.1111C>T pathogenic variant in patient P445, confirming the molecular diagnosis. Additionally, WGS identified a novel deep intronic *USH2A* c.11048-

Table 2. Additional genomic analyses and results in unresolved cases.

ID	Age	Gender	AO	FamHx	Clinical diagnosis	Proband case	Approach	Final result	Gene	Transcript	Inh. pattern	Allele 1	Allele 2	Phenotypic match?	Segregation
P418	54	M	20	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + Digital PCR	Resolved	AR5G	NM_001267727.2	AR	Chr17:66246319-66303862del	c.983-2_983-1del p.(?)	Yes	trans
P419	51	F	48	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	Sanger Sequencing + Digital PCR	Resolved	AR5G	NM_001267727.2	AR	Chr17:66246319-66303862del	c.983-2_983-1del p.(?)	Yes	trans
P420	24	F	12	No	Stargardt disease	Yes	WES reanalysis + ABC44 panel	Resolved	ABC44	NM_000350.3	AR	c.634C>T	c.4539-2064C>T p.(Arg12Cys)	Yes	trans
P421	52	M	41	No	Stargardt disease	Yes	WES reanalysis	Resolved	ABC44	NM_000350.3	AR	c.3210_3211dup:5603A>T p.(Gln201Glu)	c.5603A>T p.(Asn1868Ile)	Yes	trans
P422	40	F	25	No	Stargardt disease	Yes	WES reanalysis	Resolved	ABC44	NM_000350.3	AR	c.6058A>T	c.1166C>A p.(Ala389Glu)	Yes	trans
P423	51	M	48	No	Late onset Stargardt disease	Yes	WES reanalysis + ABC44 panel	Resolved	ABC44	NM_000350.3	AR	c.5044_5038del:4926C>G p.(Val1682_Val1686del:Ser1642Arg)	c.5196-1137G>A p.(=Met1733Glu6*78)	Yes	trans
P424	27	F	14	No	Stargardt disease	Yes	WES reanalysis	Resolved	ABC44	NM_000350.3	AR	c.388G>A	c.4877C>A p.(Gly196Glu)	Yes	trans
P425	79	F	56	No	Late onset Stargardt disease	Yes	WES reanalysis	Resolved	ABC44	NM_000350.3	AR	c.3386G>T	c.1244A>G p.(Asn415Ser)	Yes	trans
P426	53	F	50	No	Late onset Stargardt disease	Yes	WES reanalysis	Resolved	ABC44	NM_000350.3	AR	c.6272T>G	c.5603A>T p.(Asn1868Ile)	Yes	trans
P427	30	M	27	Yes	Stargardt disease	Yes	WES reanalysis	Resolved	ABC44	NM_000350.3	AR	c.3386G>T	c.532C>T p.(Arg181Trp)	Yes	trans
P428	55	M	50	No	Late onset Stargardt disease	Yes	WES reanalysis + WGS	Resolved	ABC44	NM_000350.3	AR	c.3056C>T	c.4253+43G>A p.(Thr1019Met)	Yes	trans
P429	70	F	55	No	Late onset Stargardt disease	Yes	WES reanalysis + WGS	Resolved	ABC44	NM_000350.3	AR	c.3386G>T	c.4539-2064C>T p.(=Arg1514Leufs*36)	Yes	trans
P430	58	F	40	No	Stargardt disease	Yes	WES reanalysis + WGS	Resolved	ABC44	NM_000350.3	AR	c.5196-1137G>A	c.15461-101>C:5033A>T p.(Thr1821Aspfs*6;Thr1821Valfs*13;Asn1868Ile)	Yes	trans
P431	44	M	35	No	Stargardt disease	Yes	WES reanalysis	Resolved	ABC44	NM_000350.3	AR	c.33617de(5603A>T)	c.5603A>T p.(Asn1868Ile)	Yes	trans
P432	59	M	40	No	Stargardt disease	Yes	WES reanalysis + WGS	Resolved	ABC44	NM_000350.3	AR	c.3386G>T	c.4539-2064C>T p.(=Arg1514Leufs*36)	Yes	trans
P433	59	M	54	No	Late onset Stargardt disease	Yes	WES reanalysis + WGS + MLPA	Resolved	ABC44	NM_000350.3	AR	c.699_768-341del	c.5603A>T p.(Asn1868Ile)	Yes	trans
P434	30	F	5	No	Stargardt disease	Yes	WES reanalysis + ABC44 panel + WGS + Midgene	Resolved	ABC44	NM_000350.3	AR	c.634C>T	c.859-442C>T p.(Phe287Tyrfs*33;Phe287_Glu181del(=,Phe287Hisfs*7))	Yes	trans
P435	55	M	15	Yes	Syndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis	Resolved	NPHP4	NM_015102.5	AR	c.2485-2T>C	c.2611+1G>A p.(?)	Yes	trans
P436	51	M	36	Yes	Syndromic retinitis pigmentosa	No	Sanger Sequencing	Resolved	NPHP4	NM_015102.5	AR	c.2485-2T>C	c.2611+1G>A p.(?)	Yes	trans
P437	54	M	20	No	Cone-rod dystrophy	Yes	WES reanalysis + Minigen	Resolved	TULP1	NM_003322.6	AR	c.822G>T	c.1376T>C p.(Ile459Thr)	Yes	trans
P438	60	M	31	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + RPGR panel	Resolved	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.3116dup	c.2367+23delG p.(?)	Yes	inherited
P439	46	M	28	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	Sanger Sequencing	Resolved	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.3116dup	c.2367+23delG p.(?)	Yes	inherited
P440	51	F	30	No	Syndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + WGS + aCGH	Resolved	NPHP1	NM_001128178.3	AR	chr2:110853694-110985405del	chr2:110853694-110985405del p.(?)	Yes	trans
P441	33	F	25	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + WGS	Resolved	CERKL	NM_201548.5	AR	c.769C>T	c.769C>T p.(Arg257*)	Yes	trans
P442	24	M	6	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + RPGR panel	Resolved	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.2527del	c.859-442C>T p.(Glu443Lysfs*246)	Yes	inherited
P443	37	F	10	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + MLPA	Resolved	PDE6B	NM_00283.4	AR	c.(2-53)_((711+1_712)-1)del	c.(2-53)_((711+1_712)-1)del p.(?)	Yes	trans
P444	22	M	4	No	Syndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis	Resolved	HK1	NM_033500.2	AD	c.1334C>G	c.1111C>T p.(Thr445Arg)	Yes	de novo
P445	19	M	5	No	Cone-rod dystrophy	Yes	WES reanalysis	Resolved	RPGRIP1	NM_030366.3	AR	c.1111C>T	c.2367+23delG p.(?)	Yes	trans

Table 2. continued

ID	Age	Gender	AO	FamHx	Clinical diagnosis	Proband case	Approach	Final result	Gene	Transcript	Inh. pattern	Allele 1	Allele 2	Phenotypic match?	Segregation
P446	27	F	2	Yes	Usher syndrome	Yes	WES reanalysis + WGS	Resolved	USH2A	NM_206933.4	AR	c.2299del	c.11048-1055A>G p.(Glu767Serfs*21)	Yes	trans
P447	30	M	16	Yes	Usher syndrome	No	Sanger Sequencing	Resolved	USH2A	NM_206933.4	AR	c.2299del	c.11048-1055A>G p.(Glu767Serfs*21)	Yes	trans
P448	21	F	10	No	Cone dystrophy	Yes	WES reanalysis + mRNA	Resolved	ATF6	NM_007348.4	AR	c.160-8A>G	c.160-8A>G p.(Glu54Phefs*7)	Yes	trans
P449	46	M	20	Yes	Syndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + ABC44 panel	Inconclusive	ABC44	NM_000350.3	AR	c.642A>G	c.5603A>T p.(Ile2142Val)	Yes	trans
P450	59	M	56	Yes	Retinal pattern dystrophy	Yes	WES reanalysis + ABC44 panel	Inconclusive	ABC44	NM_000350.3	AR	c.5908C>T	c.2744-9del p.(Leu1970Phe)	Yes	trans
P451	78	F	50	Yes	Late onset Stargardt disease	Yes	WES reanalysis + WGS	Inconclusive	ABC44	NM_000350.3	AR	c.588G>A	c.2744-9del p.(Gly1961Glu)	Yes	ND
P452	59	F	50	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + ABC44 panel	Inconclusive	ABC44	NM_000350.3	AR	c.3113C>T	c.588G>A p.(Ala1038Val)	Yes	ND
P453	39	M	20	No	Maculopathy	Yes	WES reanalysis + ABC44 panel	Inconclusive	ABC44	NM_000350.3	AR	c.4457C>T	c.588G>A p.(Pro1486Leu)	Yes	ND
P454	78	F	30	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis	Inconclusive	AHI1	NM_017651.5	AR	c.1205del	c.5603A>T p.(Pro402Leufs*3)	No	ND
P455	59	M	40	Yes	Cone-rod dystrophy	Yes	WES reanalysis + WGS	Inconclusive	AIP1	NM_014336.5	AD	c.112C>T	c.5908C>T p.(Arg38Cys)	Yes	ND
P456	63	M	38	Yes	Cone-rod dystrophy	No	Sanger Sequencing	Inconclusive	AIP1	NM_014336.5	AD	c.112C>T	c.5908C>T p.(Arg38Cys)	Yes	ND
P457	56	F	17	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + WGS	Inconclusive						N/A	ND
P458	67	M	47	No	Cone-rod dystrophy	Yes	WES reanalysis + WGS	Inconclusive	SPC7	NM_003119.4	AR	c.1529C>T	c.5603A>T p.(Ala510Val)	No	ND
P459	70	M	12	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + WGS	Inconclusive	ABC44	NM_000350.3	AR	c.5603A>T	c.5603A>T p.(Asn1868Ile)	Yes	ND
P460	62	M	55	Yes	Late onset Stargardt disease	Yes	WES reanalysis + WGS	Inconclusive						No	ND
P461	36	F	27	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + WGS	Inconclusive	MYO3A	NM_017433.5	AR	c.4590C>G	p.(Ser1517*)	No	ND
P462	33	F	20	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + WGS	Inconclusive	RDH12	NM_152443.3	AD/AR	c.464C>T	p.(Thr155Ile)	Yes	inherited
P463	57	M	52	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + WGS	Inconclusive	CNGA1	NM_001379270.1	AR	c.349G>T	p.(Glu117*)	Yes	ND
P464	47	M	35	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + WGS	Inconclusive	ABC44	NM_000350.3	AR	c.5848C>T	p.(Pro1948Leu)	Yes	ND
P465	56	F	24	Yes	Central areolar choroidal dystrophy	Yes	WES reanalysis + ABC44 panel + WGS	Inconclusive	ABC44	NM_000350.3	AR	c.15603A>T:2701A>G	p.(Asn1868Ile:Thr901Ala)	Yes	ND
P466	60	M	52	No	Maculopathy	Yes	WES reanalysis + WGS	Inconclusive	ABC44	NM_000350.3	AR	c.6148G>C	p.(Val2050Leu)	Yes	ND
P467	27	F	23	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + WGS	Inconclusive	ABC44	NM_000350.3	AR	c.6148G>C	p.(Val2050Leu)	N/A	ND
P468	65	F	55	No	Retinal pattern dystrophy	Yes	WES reanalysis + ABC44 panel	Inconclusive	ABC44	NM_000350.3	AR	c.4919G>A	p.(Arg1640Gln)	Yes	ND
P469	70	F	55	Yes	Late onset Stargardt disease	Yes	WES reanalysis + ABC44 panel + WGS	Inconclusive	ABC44	NM_000350.3	AR	c.(5549T>C:5603A>T)	p.(Leu1850Pro:Asn1868Ile)	Yes	ND
P470	50	F	2	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + WGS	Inconclusive	WFS1	NM_017777.4	AR	c.190+2T>C	p.(?)	No	ND
P471	71	F	67	No	Retinal pattern dystrophy	Yes	WES reanalysis	Inconclusive	NRL	NM_001354768.3	AD/AR	c.654del	p.(Cys219Valfs*4)	No	ND

1055A>G variant in siblings P446 and P447, reinforcing their clinical diagnosis.

Structural and copy number variants

WGS detected previously overlooked SVs (Table 2), including a partial exon 6 deletion in *ABCA4* in patient P433 and a homozygous deletion affecting three genes, including *NPHP1*, in patient P440, who presented with retinitis pigmentosa and renal disease. WES reanalysis identified a homozygous intragenic *PDE6B* deletion in P443 and a likely pathogenic deletion involving *ARSG* exon 2 in P418, which had been missed due to limitations in the original analysis pipeline for detecting CNVs.

Coding variants and emerging gene associations

WES reanalysis identified previously overlooked coding variants in *ABCA4*, *CERKL*, *HK1*, *RPGR*, and *TULP1* (Table 2). Emerging functional evidence, newly reported gene-disease associations, and advances in bioinformatics facilitated the detection and reclassification of variants. For example, biallelic *ABCA4* variants, including the c.5603A>T hypomorphic variant, were identified in several cases (P421, P422, P424, P425, P426, P427 and P431). Additionally, a pathogenic homozygous *CERKL* c.769C>T variant was detected in patient P441, previously missed due to outdated transcript annotation.

In patient P444, a de novo pathogenic *HK1* c.1334C>G variant was identified through WES reanalysis, guided by HPO terms. In patients P438, P439 and P442, variants in *RPGR*-ORF15 were detected using a customised *RPGR* panel, which facilitated the detection of variants in low-coverage regions. Finally, a novel splice-site *TULP1* c.822G>T variant was identified in patient P437, with its pathogenicity validated through a minigene assay previously reported by our group [39].

DISCUSSION

This study demonstrates a significant improvement in the molecular diagnostic yield for IRDs through a patient-centred, multi-step genomic approach. By integrating variant reclassification, WES reanalysis, WGS, customised gene panels and functional assays, we resolved previously undiagnosed cases, providing deeper insights into IRD pathogenesis. These findings highlight the diagnostic challenges posed by the genetic heterogeneity of IRDs, particularly the presence of SVs and variants in GC-rich and non-coding regions, which are often missed by conventional methods [42].

The initial WES diagnostic yield in our cohort was 59.6%, aligning with previously reported rates for IRDs [3, 12–14]. However, incorporating variant reclassification, additional sequencing and functional validation increased the yield to 48.5% among the prioritised cases that were re-evaluated. This surpasses diagnostic rates reported in large cohort studies where WGS alone was used as a second-tier method (33.3% [19], 24% [27] and 13% [18]), emphasising the value of a personalised approach.

While WES and WGS significantly contributed to variant identification, the interpretation of VUS remains challenging. Cases P394 and P448 exemplify how segregation analysis and functional assays can refine variant classification and resolve previously inconclusive cases. In contrast, patient P395 remained unresolved despite a strong genotype-phenotype correlation, underscoring the need for periodic reassessment and functional validation beyond in silico predictions.

The *ABCA4* c.5603A>T hypomorphic variant, now recognised as pathogenic [22], was initially not reported due to limited evidence of pathogenicity. This variant is estimated to account for approximately 50% of unresolved cases in individuals carrying only one *ABCA4* pathogenic variant [43], reinforcing the need for WES reanalysis as new evidence emerges [44]. However, its

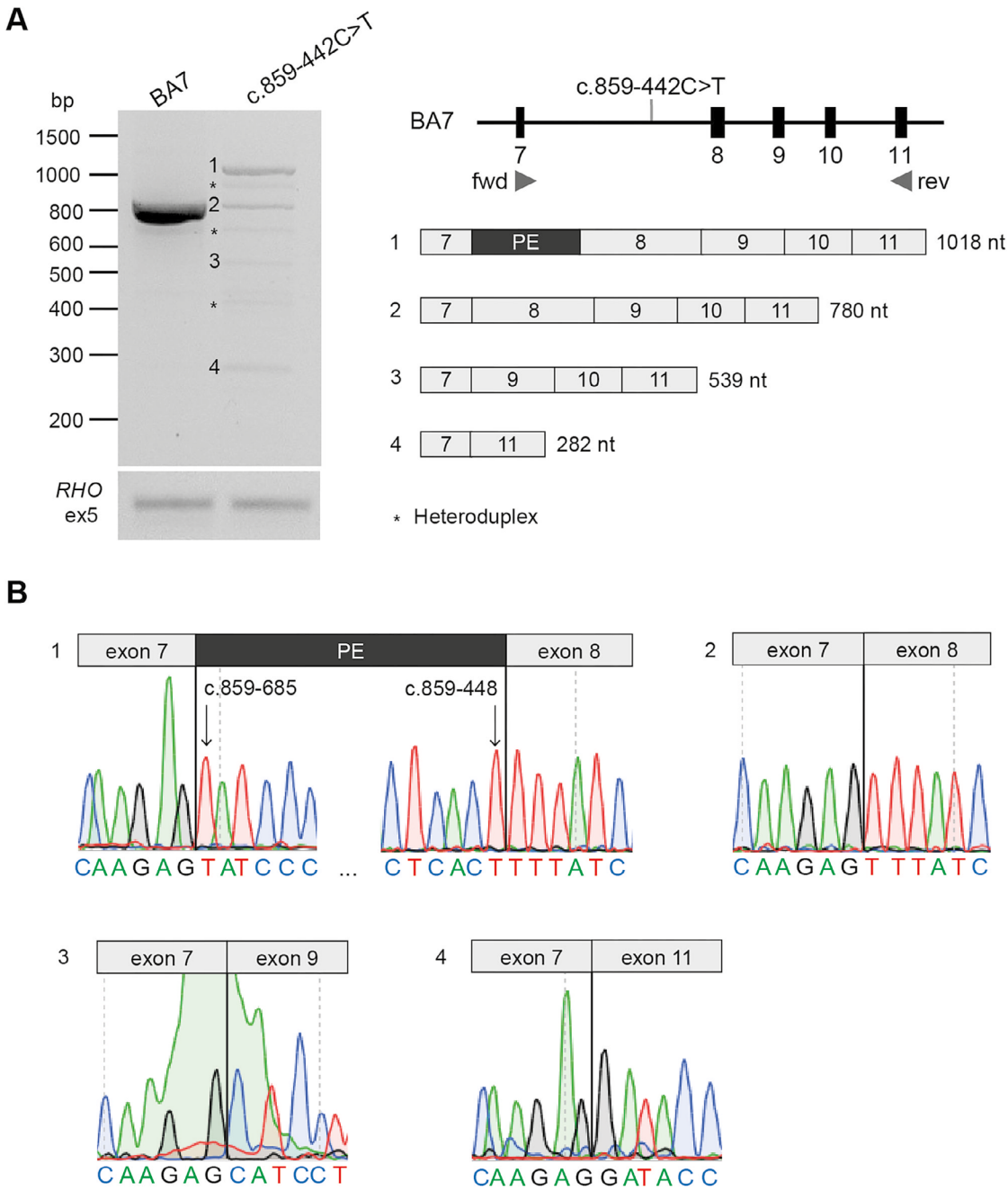


Fig. 3 Overview of splice defects caused by *ABCA4* c.859-442C>T variant in HEK293T cells. **A** Wild-type and mutant midgenes assay results. *Rhodopsin* exon 5 (*RHO* ex5) RT-PCR was used as a control for transfection efficiency. To the right, schematic representation of WT midgene (BA7_WT), in which the position of the variant is indicated with an arrow and the forward (fwd) and reverse (rev) primers used for PCR amplification are depicted as triangles. Beneath, schematic representation of the four RT-PCR products identified in panel, heteroduplex bands are labelled with an asterisk. *ABCA4* c.859-442C>T variant leads to the inclusion of a 238 nt long pseudoexon (PE) in intron 7 (Fragment 1), exon 8 skipping (Fragment 3), exon 8 to 10 skipping (Fragment 4) and WT product (Fragment 2). **B** The chromatograms show the exact exonic and intronic breakpoints in the four fragments as confirmed by Sanger sequencing.

Table 2. continued

ID	Age	Gender	AO	FamHx	Clinical diagnosis	Proband case	Approach	Final result	Gene	Transcript	Inh. pattern	Allele 1	Allele 2	Phenotypic match	Segregation
P472	67	F	42	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + WGS	Inconclusive	<i>ABCA4</i>	NM_000350.3	AR	c.5603A>T	c.4539+859C>T	Yes	ND
P473	48	M	11	No	Maculopathy	Yes	WES reanalysis + WGS	Inconclusive						N/A	ND
P474	51	F	46	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + WGS + digital PCR	Inconclusive	<i>ARHGFB18</i>	NM_001367823.1	AR	Chr19:7434598-7442499-del		Yes	ND
P475	50	F	43	Yes	Retinal pattern dystrophy	Yes	WES reanalysis + WGS	Inconclusive						N/A	ND
P476	41	F	28	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	WES reanalysis + WGS	Inconclusive						N/A	ND
P477	38	F	15	No	Cone-rod dystrophy	Yes	WES reanalysis	Inconclusive	<i>VPS13B</i>	NM_017890.5	AR	c.11598del	p.(Glu3867Lysfs*11)	Yes	ND

AD autosomal dominant, AO age of onset, AR autosomal recessive, FamHx family history of IRDs, F female, M male, ND not determined, XL X-linked inheritance. Variants identified through the re-evaluation are highlighted in bold.

interpretation requires caution, as it is only considered pathogenic when in *trans* with severe variants. For instance, in cases P449, P459 and P472, c.5603A>T was found in *trans* with non-loss-of-function variants, limiting resolution of these cases.

Additionally, updates to transcript annotation were crucial, as demonstrated by case P441, where a *CERKL* variant was initially undetected. Similarly, in other cases, the detection of causative variants was hindered by the absence of certain genes in the applied virtual panels, highlighting the need for continuous updates to gene lists, transcript-aware analysis and periodic WES reanalysis using updated bioinformatics pipelines [44, 45].

One case was resolved through HPO-driven reanalysis, demonstrating its utility in syndromic cases, though its impact on non-syndromic IRDs remains limited [46]. Furthermore, the use of a customised *RPGR* panel enriched for low-coverage regions proved particularly effective in detecting variants within the ORF15 region, providing a cost-effective alternative to WGS and long-read sequencing technologies for sequencing this hotspot [47, 5].

Our findings reinforce the role of non-coding variants in IRD pathogenesis [18]. The identification of pathogenic intronic variants in *ABCA4*, *ATF6*, *NPHP4*, *RPGRIP1* and *USH2A* further validate their significance in disease development [4, 25, 48]. Notable examples include the novel deep intronic variants *ABCA4* c.859-442C>T and *USH2A* c.11048-1055A>G, both classified as pathogenic following segregation and/or functional analyses. The acceptor gain position at *ABCA4* c.859-685 (243 nt upstream of -442) appears to be recurrently activated, as shown in Khan et al. (2020) and Corradi et al. (2022) [49, 50], where it coincided with pseudo-exon inclusion and the largest exon elongation for the -25A>G variant of intron 7. Another variant using this splice acceptor site has also been reported [22], reinforcing its functional relevance. These findings highlight the need for routine non-coding region screening, particularly in *ABCA4* and *USH2A*. Cases P423 and P430 further emphasise the importance of segregation analysis to prevent misinterpretation when pathogenic variants are inherited in *cis*.

The identification of SVs—including a previously overlooked homozygous intragenic *PDE6B* deletion, a partial exon 6 deletion in *ABCA4*, which represents the second most frequently reported SV in *ABCA4*, particularly prevalent in the Spanish population [51] and a large deletion involving *NPHP1*—, reinforces the need to integrate WGS as a second-tier test in unresolved cases. These findings highlight the limitations of WES in detecting complex genomic rearrangements and emphasise the need for complementary approaches to improve diagnostic accuracy [18, 19].

Beyond diagnostics, these findings have direct clinical implications. Establishing a molecular diagnosis enables tailored genetic counselling, informed clinical decision-making and eligibility for emerging gene-specific therapies [52]. In addition to the 49 new diagnoses, segregation analysis in asymptomatic individuals identified carriers, facilitating reproductive counselling in at-risk couples, some of whom opted for preimplantation genetic diagnosis, directly impacting the next generation. Moreover, the identification of previously undetected variants enhances our understanding of disease mechanisms, which is crucial for developing more precise molecular diagnostic protocols for IRDs [41, 53].

Based on our findings, we propose a flexible and scalable diagnostic workflow for IRDs that integrates reanalysis, WGS and functional assays as complementary tools. Targeted gene panels and WES remain cost-effective and reliable first-line options in many healthcare settings, especially when their design is periodically updated to include newly associated IRD genes. However, clinicians must be aware of their limitations in detecting non-coding, structural and complex variants. Current literature supports systematic reanalysis of WES data every 18 to 24 months, due to ongoing advances in gene discovery and variant interpretation [54]. Nonetheless, timing should remain flexible

and adapted to individual clinical contexts, particularly when preliminary findings suggest the presence of deep intronic or SVs, or when reproductive planning is a priority [16]. In selected cases with strong genotype–phenotype correlation, such as individuals carrying a single pathogenic variant in *ABCA4* or *USH2A*, re-evaluation should not be delayed, even if the initial study was recent, as deep intronic or SVs may have been missed. In this context, the increasing implementation of genome sequencing as a first-tier test in certain countries may further accelerate and streamline the diagnostic process [55]. Overall, this patient-centred, stepwise approach proved effective and can be adapted to routine clinical practice to optimise IRD diagnostics.

In conclusion, our case-by-case genomic approach significantly improved the diagnostic yield for IRDs. These findings support the routine integration of advanced sequencing methodologies, variant reclassification and functional validation in IRD diagnostics to optimise patient outcomes and expand the role of precision medicine in ophthalmic genetics. Future efforts should prioritise refining diagnostic workflows, identifying novel candidate genes, improving variant classification systems and incorporating emerging technologies such as long-read sequencing to further enhance diagnostic accuracy and patient care [47, 56].

SUMMARY

What was known before:

- Whole-exome sequencing (WES) is the primary diagnostic tool for inherited retinal dystrophies (IRDs), yet approximately 40% of cases remain unresolved.
- Whole-genome sequencing (WGS) and functional assays have demonstrated potential to improve the diagnostic yield.
- Variants of uncertain significance (VUS) complicate clinical interpretation and limit patient access to gene therapies.

What this study adds:

- A personalised genomic approach integrating WES reanalysis, WGS and customised gene panels improves IRD diagnosis.
- Deep intronic, non-coding and structural variants were identified, broadening the spectrum of IRD-related variants.
- Functional assays and systematic variant reclassification resolved previously undiagnosed cases.

DATA AVAILABILITY

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

REFERENCES

1. García Bohórquez B, Aller E, Rodríguez Muñoz A, Jaijo T, García García G, Millán JM. Updating the genetic landscape of inherited retinal dystrophies. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:695435.

2. Murro V, Banfi S, Testa F, Iarossi G, Falsini B, Sodi A, et al. A multidisciplinary approach to inherited retinal dystrophies from diagnosis to initial care: a narrative review with inputs from clinical practice. *Orphanet J Rare Dis.* 2023;18:223.

3. Perea-Romero I, Gordo G, Iancu IF, Del Pozo-Valero M, Almoguera B, Blanco-Kelly F, et al. Genetic landscape of 6089 inherited retinal dystrophies affected cases in Spain and their therapeutic and extended epidemiological implications. *Sci Rep.* 2021;11:1526.

4. González-del Pozo M, Martín-Sánchez M, Bravo-Gil N, Méndez-Vidal C, Chimenea Á, Rodríguez-de la Rúa E, et al. Searching the second hit in patients with inherited retinal dystrophies and monoallelic variants in *ABCA4*, *USH2A* and *CEP290* by whole-gene targeted sequencing. *Sci Rep.* 2018;8:13312.

5. Li J, Tang J, Feng Y, Xu M, Chen R, Zou X, et al. Improved diagnosis of inherited retinal dystrophies by high-fidelity PCR of ORF15 followed by next-generation sequencing. *J Mol Diagn.* 2016;18:817–24.

6. Lin S, Vermeirsch S, Pontikos N, Martin-Gutierrez MP, Daich Varela M, Malka S, et al. Spectrum of genetic variants in the most common genes causing inherited retinal disease in a large molecularly characterized United Kingdom cohort. *Ophthalmol Retina* 2024;8:699–709.

7. Broadgate S, Yu J, Downes SM, Halford S. Unravelling the genetics of inherited retinal dystrophies: past, present and future. *Prog Retin Eye Res.* 2017;59:53–96.

8. Karali M, Testa F, Di Iorio V, Torella A, Zeuli R, Scarpato M, et al. Genetic epidemiology of inherited retinal diseases in a large patient cohort followed at a single center in Italy. *Sci Rep.* 2022;12:20815.

9. Rodríguez-Muñoz A, Aller E, Jaijo T, González-García E, Cabrera-Peset A, Gallego-Pinazo R, et al. Expanding the clinical and molecular heterogeneity of non-syndromic inherited retinal dystrophies. *J Mol Diagn.* 2020;22:532–43.

10. Zampaglione E, Kinde B, Place EM, Navarro-Gomez D, Maher M, Jamshidi F, et al. Copy-number variation contributes 9% of pathogenicity in the inherited retinal degenerations. *Genet Med.* 2020;22:1079–87.

11. Ganapathi M, Thomas-Wilson A, Buchovecky C, Dharmadhikari A, Barua S, Lee W, et al. Clinical exome sequencing for inherited retinal degenerations at a tertiary care center. *Sci Rep.* 2022;12:9358.

12. Matczyńska E, Bec-Gajowniczek M, Sivitskaya L, Gregorczyk E, Łyszkiewicz P, Szymańczak R, et al. Optimised, broad NGS panel for inherited eye diseases to diagnose 1000 patients in Poland. *Biomedicines* 2024;12:1355.

13. Mihalich A, Cammarata G, Tremolada G, Manfredini E, Bianchi Marzoli S, Di Blasio AM. Genetic characterization of 191 probands with inherited retinal dystrophy by targeted NGS analysis. *Genes (Basel).* 2024;15:766.

14. Britten-Jones AC, Gocuk SA, Goh KL, Huq A, Edwards TL, Ayton LN. The diagnostic yield of next generation sequencing in inherited retinal diseases: a systematic review and meta-analysis. *Am J Ophthalmol.* 2023;249:57–73.

15. Burdick KJ, Cogan JD, Rives LC, Robertson AK, Koziura ME, Brokamp E, et al. Limitations of exome sequencing in detecting rare and undiagnosed diseases. *Am J Med Genet A* 2020;182:1400–6.

16. Daich Varela M, Bellingham J, Motta F, Jurkute N, Ellingford JM, Quinodoz M, et al. Multidisciplinary team directed analysis of whole genome sequencing reveals pathogenic non-coding variants in molecularly undiagnosed inherited retinal dystrophies. *Hum Mol Genet.* 2023;32:595–607.

17. González-del Pozo M, Fernández-Suárez E, Bravo-Gil N, Méndez-Vidal C, Martín-Sánchez M, Rodríguez-de la Rúa E, et al. A comprehensive WGS-based pipeline for the identification of new candidate genes in inherited retinal dystrophies. *NPJ Genom Med.* 2022;7:17.

18. Liu X, Hu F, Zhang D, Li Z, He J, Zhang S, et al. Whole genome sequencing enables new genetic diagnosis for inherited retinal diseases by identifying pathogenic variants. *NPJ Genom Med.* 2024;9:6.

19. Zeuli R, Karali M, de Bruijn SE, Rodenburg K, Scarpato M, Capasso D, et al. Whole genome sequencing identifies elusive variants in genetically unsolved Italian inherited retinal disease patients. *Hum Genet Genomics Adv.* 2024;5:100314.

20. Wojcik MH, Lemire G, Berger E, Zaki MS, Wissmann M, Win W, et al. Genome sequencing for diagnosing rare diseases. *N Engl J Med.* 2024;390:1985–97.

21. Walsh N, Cooper A, Dockery A, O’Byrne JJ. Variant reclassification and clinical implications. *J Med Genet.* 2024;61:207–11.

22. Bauwens M, Garanto A, Sangermano R, Naessens S, Weisschuh N, De Zaeytjij J, et al. *ABCA4*-associated disease as a model for missing heritability in autosomal recessive disorders: novel noncoding splice, cis-regulatory, structural, and recurrent hypomorphic variants. *Genet Med.* 2019;21:1761–71.

23. Kaltak M, Corradi Z, Collin RWJ, Swildens J, Cremers FPM. Stargardt disease-associated missense and synonymous *ABCA4* variants result in aberrant splicing. *Hum Mol Genet.* 2023;32:3078–89.

24. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17:405–24.

25. Runhart EH, Valkenburg D, Cornelis SS, Khan M, Sangermano R, Albert S, et al. Late-onset Stargardt disease due to mild, deep-intronic *ABCA4* alleles. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2019;60:4249.

26. Schulz HL, Grassmann F, Kellner U, Spital G, Rütther K, Jägle H, et al. Mutation spectrum of the *ABCA4* Gene in 335 Stargardt disease patients from a multi-center german cohort—impact of selected deep intronic variants and common SNPs. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58:394.

27. Fadaie Z, Whelan L, Ben-Yosef T, Dockery A, Corradi Z, Gilissen C, et al. Whole genome sequencing and in vitro splice assays reveal genetic causes for inherited retinal diseases. *NPJ Genom Med.* 2021;6:97.

28. Corradi Z, Khan M, Hitti-Malin R, Mishra K, Whelan L, Cornelis SS, et al. Targeted sequencing and in vitro splice assays shed light on *ABCA4*-associated retinopathies missing heritability. *Hum Genet Genomics Adv.* 2023;4:100237.

29. Rodríguez-Muñoz A, Liquori A, García-Bohorquez B, Jaijo T, Aller E, Millán JM, et al. Functional assays of non-canonical splice-site variants in inherited retinal dystrophies genes. *Sci Rep.* 2022;12:68.

30. Robinson PN, Köhler S, Bauer S, Seelow D, Horn D, Mundlos S. The human phenotype ontology: a tool for annotating and analyzing human hereditary disease. *Am J Hum Genet.* 2008;83:610–5.

31. Carrs KJ, Arno G, Erwood M, Stephens J, Sanchis-Juan A, Hull S, et al. Comprehensive rare variant analysis via whole-genome sequencing to determine the molecular pathology of inherited retinal disease. *Am J Hum Genet.* 2017;100:75–90.

32. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 2020;581:434–43.

33. Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, et al. REVEL: an ensemble method for predicting the pathogenicity of rare missense variants. *Am J Hum Genet.* 2016;99:877–85.

34. Jaganathan K, Kyriazopoulou Panagiotopoulou S, McRae JF, Darbandi SF, Knowles D, Li Yi, et al. Predicting splicing from primary sequence with deep learning. *Cell* 2019;176:535–48.e24.

35. Walker LC, Hoya M, de la, Wiggins GAR, Lindy A, Vincent LM, Parsons MT, et al. Using the ACMG/AMP framework to capture evidence related to predicted and observed impact on splicing: Recommendations from the ClinGen SVI Splicing Subgroup. *Am J Hum Genet.* 2023;110:1046–67.

36. Cornelis SS, Bauwens M, Haer-Wigman L, De Bruyne M, Pantrangi M, De Baere E, et al. Compendium of clinical variant classification for 2,246 unique *ABCA4* variants to clarify variant pathogenicity in stargardt disease using a modified ACMG/AMP framework. *Hum Mutat.* 2023;2023:1–12.

37. Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:3784–8.

38. Sangermano R, Khan M, Cornelis SS, Richelle V, Albert S, Garanto A, et al. *ABCA4* midigenes reveal the full splice spectrum of all reported noncanonical splice site variants in Stargardt disease. *Genome Res.* 2018;28:100–10.

39. Esteve-García A, Cobos E, Sau C, Padró-Miquel A, Català-Mora J, Barberán-Martínez P, et al. Deciphering complexity: TULP1 variants linked to an atypical retinal dystrophy phenotype. *Front Genet.* 2024;15:1378105.

40. World Medical Association Declaration of Helsinki. *JAMA.* 2013;310:2191.

41. Cremers FPM, Lee W, Collin RWJ, Allikmets R. Clinical spectrum, genetic complexity and therapeutic approaches for retinal disease caused by *ABCA4* mutations. *Prog Retin Eye Res.* 2020;79:100861.

42. Wen S, Wang M, Qian X, Li Y, Wang K, Choi J, et al. Systematic assessment of the contribution of structural variants to inherited retinal diseases. *bioRxiv.* 2023.

43. Zernant J, Lee W, Collison FT, Fishman GA, Sergeev YV, Schuerch K, et al. Frequent hypomorphic alleles account for a significant fraction of *ABCA4* disease and distinguish it from age-related macular degeneration. *J Med Genet.* 2017;54:404–12.

44. Surl D, Won D, Lee ST, Lee CS, Lee J, Lim HT, et al. Clinician-driven reanalysis of exome sequencing data from patients with inherited retinal diseases. *JAMA Netw Open.* 2024;7:e2414198.

45. Romero R, de la Fuente L, Del Pozo-Valero M, Riveiro-Álvarez R, Trujillo-Tiebas MJ, Martín-Mérida I, et al. An evaluation of pipelines for DNA variant detection can guide a reanalysis protocol to increase the diagnostic ratio of genetic diseases. *NPJ Genom Med.* 2022;7:7.

46. Perea-Romero I, Blanco-Kelly F, Sanchez-Navarro I, Lorda-Sanchez I, Tahsin-Swafiri S, Avila-Fernandez A, et al. NGS and phenotypic ontology-based approaches increase the diagnostic yield in syndromic retinal diseases. *Hum Genet.* 2021;140:1665–78.

47. Bonetti G, Cozza W, Bernini A, Kaftalli J, Mareso C, Cristofoli F, et al. Towards a long-read sequencing approach for the molecular diagnosis of RPGRORF15 genetic variants. *Int J Mol Sci.* 2023;24:16881.

48. Nassisi M, Mohand-Said S, Andrieu C, Antonio A, Condroyer C, Méjécase C, et al. Prevalence of *ABCA4* deep-intronic variants and related phenotype in an unsolved “One-Hit” Cohort with Stargardt disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20:5053.

49. Khan M, Cornelis SS, De Pozo-Valero ML, Whelan L, Runhart EH, Mishra K, et al. Resolving the dark matter of *ABCA4* for 1054 Stargardt disease probands through integrated genomics and transcriptomics. *Genet Med.* 2020;22:1235–46.

50. Corradi Z, Salameh M, Khan M, Héon E, Mishra K, Hitti-Malin RJ, et al. *ABCA4* c.859-25 A > G, a frequent palestinian founder mutation affecting the intron 7 branchpoint, is associated with early-onset Stargardt disease. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2022;63:20.

51. Corradi Z, Dhaenens CM, Grunewald O, Kocabaş İS, Meunier I, Banfi S, et al. Novel and recurrent copy number variants in *ABCA4*-associated retinopathy. *Int J Mol Sci.* 2024;25:5940.

52. Georgiou M, Fujinami K, Michaelides M. Inherited retinal diseases: therapeutics, clinical trials and end points-A review. *Clin Exp Ophthalmol.* 2021;49:270–88.

53. Brar AS, Parameswarappa DC, Takkar B, Narayanan R, Jalali S, Mandal S, et al. Gene therapy for inherited retinal diseases: from laboratory bench to patient bedside and beyond. *Ophthalmol Ther.* 2024;13:21–50.

54. Areblom M, Kjellström S, Andréasson S, Öhberg A, Gränse L, Kjellström U. A description of the yield of genetic reinvestigation in patients with inherited retinal dystrophies and previous inconclusive genetic testing. *Genes (Basel).* 2023;14:1413.

55. Nisar H, Wajid B, Shahid S, Anwar F, Wajid I, Khatoon A, et al. Whole-genome sequencing as a first-tier diagnostic framework for rare genetic diseases. *Exp Biol Med.* 2021;246:2610–7.

56. Gupta P, Nakamichi K, Bonnell AC, Yanagihara R, Radulovich N, Hisama FM, et al. Familial co-segregation and the emerging role of long-read sequencing to re-classify variants of uncertain significance in inherited retinal diseases. *NPJ Genom Med.* 2023;8:20.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the patients and their families for their participation in this study. This work was supported by Bellvitge University Hospital (Grant No. PUB22015) and the Macula Society with the International Retinal Research Foundation Award (DON23020). We also acknowledge the valuable contributions of Health in Code and the Biobank HUB-ICO-IDIBELL (PT20/00171), which is integrated in the ISCIII Biobanks and Biomodels Platform. Additionally, we thank CERCA Programme/ Generalitat de Catalunya for their institutional support.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AE-G designed the study, performed the genetic analyses and drafted the manuscript. CA contributed to data analysis and interpretation and conducted mRNA analysis. JC-M, II, LA and EC reviewed the clinical diagnoses. DY reanalysed WES data. CS and AP-M provided critical feedback on the manuscript. ZC and FC designed the *ABCA4* midigene assay. PB-M, JM and GG-G performed the *REEP6* mRNA analysis. EC and CA supervised the study. All authors reviewed and approved the final manuscript.

FUNDING

LA was supported by the Macula Society (grant number: DON23020). EC received funding from Bellvitge University Hospital (grant number: PUB22015). ZC was supported by the Stichting tot Verbetering van het Lot der Blinden, Stichting voor

A. Esteve-Garcia et al.

Ooglijders and the Stichting Blindenhulp. GG-G acknowledges two grants from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), CP22/00028 and PI22/01371, co-funded by the European Union. PB-M had a grant from Ministerio de Universidades FPU20/04736. JM has a grant from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), PI22/00213, co-funded by the European Union.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41433-025-03981-1>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Estefania Cobos or Cinthia Aguilera.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2025

Supplementary Material

1 Supplementary Data

List of 302 IRD genes analysed and corresponding transcripts used

ABCA4 (NM_000350.3), *ABCC6* (NM_001171.6), *ABHD12* (NM_001042472.3), *ACBD5* (NM_145698.5), *ACO2* (NM_001098.3), *ADAM9* (NM_003816.3), *ADAMTS18* (NM_199355.4), *ADGRV1* (NM_032119.4), *AFG3L2* (NM_006796.3), *AGBL5* (NM_021831.6), *AHI1* (NM_001134831.2), *AIPL1* (NM_014336.5), *AIRE* (NM_000383.4), *ALDH3A2* (NM_000382.3), *ALMS1* (NM_001378454.1), *ALPK1* (NM_025144.4), *AMACR* (NM_014324.6), *ARHGEF18* (NM_001367823.1), *ARL13B* (NM_001174150.2), *ARL2BP* (NM_012106.4), *ARL3* (NM_004311.4), *ARL6* (NM_001278293.3), *ARSG* (NM_001267727.2), *ATF6* (NM_007348.4), *ATOH7* (NM_145178.4), *BBIP1* (NM_001195305.3), *BBS1* (NM_024649.5), *BBS10* (NM_024685.4), *BBS12* (NM_152618.3), *BBS2* (NM_031885.5), *BBS4* (NM_033028.5), *BBS5* (NM_152384.3), *BBS7* (NM_176824.3), *BBS9* (NM_198428.3), *BCOR* (NM_001123385.2), *BEST1* (NM_004183.4), *C1QTNF5* (NM_001278431.2), *C21orf2* (NM_004928.3), *C2orf71* (NM_001029883.3), *C8orf37* (NM_177965.4), *CABP4* (NM_145200.5), *CACNA1F* (NM_001256789.3), *CACNA2D4* (NM_172364.5), *CAPN5* (NM_004055.5), *CC2D2A* (NM_001378615.1), *CDH23* (NM_022124.6), *CDH3* (NM_001793.6), *CDHR1* (NM_033100.4), *CEP164* (NM_014956.5), *CEP250* (NM_007186.6), *CEP290* (NM_025114.4), *CEP41* (NM_018718.3), *CEP78* (NM_001330691.3), *CERKL* (NM_201548.5), *CFAP20* (NM_013242.3), *CFH* (NM_000186.4), *CHM* (NM_000390.4), *CIB2* (NM_006383.4), *CLCC1* (NM_001377458.1), *CLN3* (NM_001042432.2), *CLN5* (NM_006493.4), *CLN6* (NM_017882.3), *CLN8* (NM_018941.4), *CLRN1* (NM_174878.3), *CNGA1* (NM_001379270.1), *CNGA3* (NM_001298.3), *CNGB1* (NM_001297.5), *CNGB3* (NM_019098.5), *CNNM4* (NM_020184.4), *COL11A1* (NM_001854.4), *COL18A1* (NM_001379500.1), *COL2A1* (NM_001844.5), *COL4A1* (NM_001845.6), *COL9A1* (NM_001851.6), *COL9A2* (NM_001852.4), *COL9A3* (NM_001853.4), *COQ2* (NM_001358921.2), *COQ8B* (NM_024876.4), *CRB1* (NM_201253.3), *CRX* (NM_000554.6), *CSPP1* (NM_001382391.1), *CTC1* (NM_025099.6), *CTNNA1* (NM_001903.5), *CTNNB1* (NM_001904.4), *CTNND1* (NM_001085458.2), *CTSD* (NM_001909.5), *CWC27* (NM_005869.4), *CYP4V2* (NM_207352.4), *DHDDS* (NM_205861.3), *DHX38* (NM_014003.4), *DRAM2* (NM_001349884.2), *DYNC2H1* (NM_001377.3, NM_001080463.2), *EFEMP1* (NM_001039348.3), *ELOVL4* (NM_022726.4), *ERCC6* (NM_001277058.2, NM_000124.4), *ERCC8* (NM_000082.4), *EXOSC2* (NM_014285.7), *EYS* (NM_001142800.2), *FAM161A* (NM_001201543.2), *FAM57B* (NM_031478.6), *FBLN5* (NM_006329.4), *FLVCR1* (NM_014053.4), *FRMD7* (NM_194277.3), *FSCN2* (NM_012418.4), *FZD4* (NM_012193.4), *GDF6* (NM_001001557.4), *GNAT1* (NM_144499.3), *GNAT2* (NM_001377295.2), *GNB3* (NM_002075.4), *GNPTG* (NM_032520.5), *GPR143* (NM_000273.3), *GPR179* (NM_001004334.4), *GRK1* (NM_002929.3), *GRM6* (NM_000843.4), *GRN* (NM_002087.4), *GUCA1A* (NM_001384910.1), *GUCA1B* (NM_002098.6), *GUCY2D*

(NM_000180.4), *HARS* (NM_002109.6), *HCCS* (NM_005333.5), *HGSNAT* (NM_152419.3), *HK1* (NM_000188.3, NM_001358263.1), *HKDC1* (NM_025130.4), *HMCN1* (NM_031935.3), *HMX1* (NM_018942.3), *IDH3A* (NM_005530.3), *IDH3B* (NM_006899.5), *IFT140* (NM_014714.4), *IFT172* (NM_015662.3), *IFT27* (NM_001177701.3), *IFT43* (NM_001102564.3), *IFT74* (NM_025103.4), *IKBKG* (NM_001099857.5), *IMPDH1* (NM_000883.4), *IMPG1* (NM_001563.4), *IMPG2* (NM_016247.4), *INPP5E* (NM_019892.6), *IQCB1* (NM_001023570.4), *KCNJ13* (NM_002242.4), *KCNV2* (NM_133497.4), *KIAA1549* (NM_001164665.2), *KIF11* (NM_004523.4), *KIF3B* (NM_004798.4), *KIZ* (NM_018474.6), *KLHL7* (NM_001031710.3), *LAMA1* (NM_005559.4), *LAMP2* (NM_002294.3), *LCA5* (NM_001122769.3), *LRAT* (NM_004744.5), *LRIT3* (NM_198506.5), *LRP2* (NM_004525.3), *LRP5* (NM_002335.4), *LZTFL1* (NM_020347.4), *MAK* (NM_001242957.3), *MCOLN1* (NM_020533.3), *MED12* (NM_005120.3), *MERTK* (NM_006343.3), *MFRP* (NM_031433.4), *MFSD8* (NM_001371596.2), *MKKS* (NM_170784.3), *MKS1* (NM_017777.4), *MMACHC* (NM_015506.3), *MPDZ* (NM_001378778.1), *MSTO1* (NM_018116.4), *MTTP* (NM_001386140.1), *MVK* (NM_000431.4), *MYO7A* (NM_000260.4), *NBAS* (NM_015909.4), *NDP* (NM_000266.4), *NEUROD1* (NM_002500.5), *NMNAT1* (NM_022787.4), *NPHP1* (NM_001128178.3), *NPHP3* (NM_153240.5), *NPHP4* (NM_015102.5), *NR2E3* (NM_014249.4), *NR2F1* (NM_005654.6), *NRL* (NM_001354768.3), *NYX* (NM_001378477.1, NM_001378477.3), *OAT* (NM_000274.4), *OFD1* (NM_003611.3), *OPA1* (NM_130837.3), *OPA3* (NM_025136.4), *OPN1LW* (NM_020061.6), *OPN1MW* (NM_000513.2), *OTX2* (NM_021728.4), *P3H2* (NM_018192.4), *PANK2* (NM_001386393.1), *PAX2* (NM_000278.5), *PCDH15* (NM_001384140.1, NM_033056.4), *PCYT1A* (NM_001312673.2), *PDE6A* (NM_000440.3), *PDE6B* (NM_000283.4), *PDE6C* (NM_006204.4), *PDE6G* (NM_002602.4), *PDE6H* (NM_006205.3), *PDSS1* (NM_014317.5), *PDZD7* (NM_001195263.2), *PEX1* (NM_000466.3), *PEX2* (NM_000318.3), *PEX6* (NM_000287.4), *PEX7* (NM_000288.4), *PHYH* (NM_006214.4), *PITPNM3* (NM_031220.4), *PLA2G5* (NM_000929.3), *PLK4* (NM_014264.5), *PNPLA6* (NM_001166114.2), *POC1B* (NM_172240.3), *POMGNT1* (NM_017739.4), *POMGNT2* (NM_032806.6), *POMT1* (NM_001077365.2), *PPT1* (NM_000310.4), *PRCD* (NM_001077620.3), *PRDM13* (NM_021620.4), *PROM1* (NM_006017.3), *PRPF3* (NM_004698.4), *PRPF31* (NM_015629.4), *PRPF4* (NM_001244926.2), *PRPF6* (NM_012469.4), *PRPF8* (NM_006445.4), *PRPH2* (NM_000322.5), *PRPS1* (NM_002764.4), *PYGM* (NM_005609.4), *RAB28* (NM_001017979.3, NM_004249.4), *RAX2* (NM_001319074.4), *RBP3* (NM_002900.3), *RBP4* (NM_006744.4), *RCBTB1* (NM_018191.4), *RD3* (NM_001164688.2), *RDH12* (NM_152443.3), *RDH5* (NM_002905.5), *REEP6* (NM_138393.4, NM_001329556.3), *RGR* (NM_001012720.2), *RGS9* (NM_003835.4), *RHO* (NM_000539.3), *RIMS1* (NM_014989.7), *RIMS2* (NM_001348484.3), *RLBP1* (NM_000326.5), *ROM1* (NM_000327.4), *RP1* (NM_006269.2), *RP1L1* (NM_178857.6), *RP2* (NM_006915.3), *RP9* (NM_203288.2), *RPE65* (NM_000329.3), *RPGR* (NM_001034853.2), *RPGRIP1* (NM_020366.4), *RPGRIP1L* (NM_015272.5), *RS1* (NM_000330.4), *RTN4IP1* (NM_032730.5), *SAG* (NM_000541.5), *SAMD7* (NM_001304366.2), *SCAPER* (NM_020843.4), *SDCCAG8* (NM_006642.5), *SEMA4A* (NM_022367.4), *SGSH* (NM_000199.5), *SLC24A1* (NM_004727.3), *SLC38A8* (NM_001080442.3), *SLC6A6* (NM_003043.6), *SLC7A14* (NM_020949.3), *SNRNP200* (NM_014014.5),

SPATA7 (NM_018418.5), *SRD5A3* (NM_024592.5), *SSBP1* (NM_003143.3), *STN1* (NM_024928.5), *TEAD1* (NM_021961.6), *TIMM8A* (NM_004085.4), *TIMP3* (NM_000362.5), *TINF2* (NM_001099274.3), *TMEM216* (NM_001173990.3), *TMEM218* (NM_001258244.2), *TMEM231* (NM_001077418.3), *TMEM237* (NM_001044385.3), *TMEM67* (NM_153704.6), *TOPORS* (NM_005802.5), *TPP1* (NM_000391.4), *TRAF3IP1* (NM_015650.4), *TREX1* (NM_033629.6), *TRIM32* (NM_012210.4), *TRNT1* (NM_182916.3), *TRPM1* (NM_001252024.2), *TSPAN12* (NM_012338.4), *TTC8* (NM_144596.4), *TTLL5* (NM_015072.5), *TTPA* (NM_000370.3), *TUB* (NM_177972.3), *TUBB4B* (NM_006088.6), *TUBGCP4* (NM_014444.5), *TUBGCP6* (NM_020461.4), *TULP1* (NM_003322.6), *UNC119* (NM_005148.4), *USH1C* (NM_153676.4, NM_005709.4), *USH1G* (NM_173477.5), *USH2A* (NM_206933.4), *USP45* (NM_001346022.3), *VCAN* (NM_004385.5), *VPS13B* (NM_152564.5, NM_017890.5), *VWA8* (NM_015058.2), *WDPCP* (NM_015910.7), *WDR19* (NM_025132.4), *WHRN* (NM_015404.4), *ZFYVE26* (NM_015346.4), *ZNF408* (NM_024741.3), *ZNF423* (NM_001379286.1).

Candidate genes analysed and corresponding transcripts used

CCZ1B (NM_198097.5), *CROCC* (NM_014675.5), *FOXI2* (NM_207426.3), *FUT5* (NM_002034.2), *GARIN4* (NM_153606.4), *IRX5* (NM_005853.6), *ITIH2* (NM_002216.3), *NAALADL1* (NM_005468.3), *NUMB* (NM_001005743.2), *NUMBL* (NM_004756.5), *OR2M7* (NM_001004691.1), *OXR1* (NM_001198533.2), *PLD4* (NM_138790.5), *PODNL1* (NM_001370095.3), *POMZP3* (NM_012230.5), *PRDX6* (NM_004905.3), *PRTFDC1* (NM_020200.7), *SLC37A3* (NM_207113.3), *TLCD3B* (NM_031478.6), *UBAP1L* (NM_001163692.2), *WASF3* (NM_006646.6).

2 Supplementary Methods

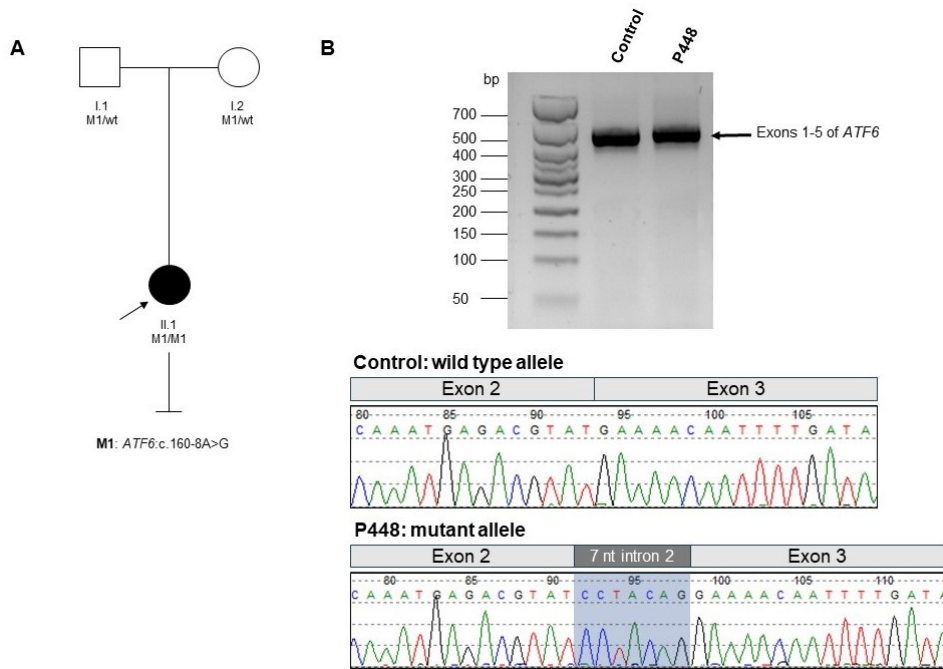
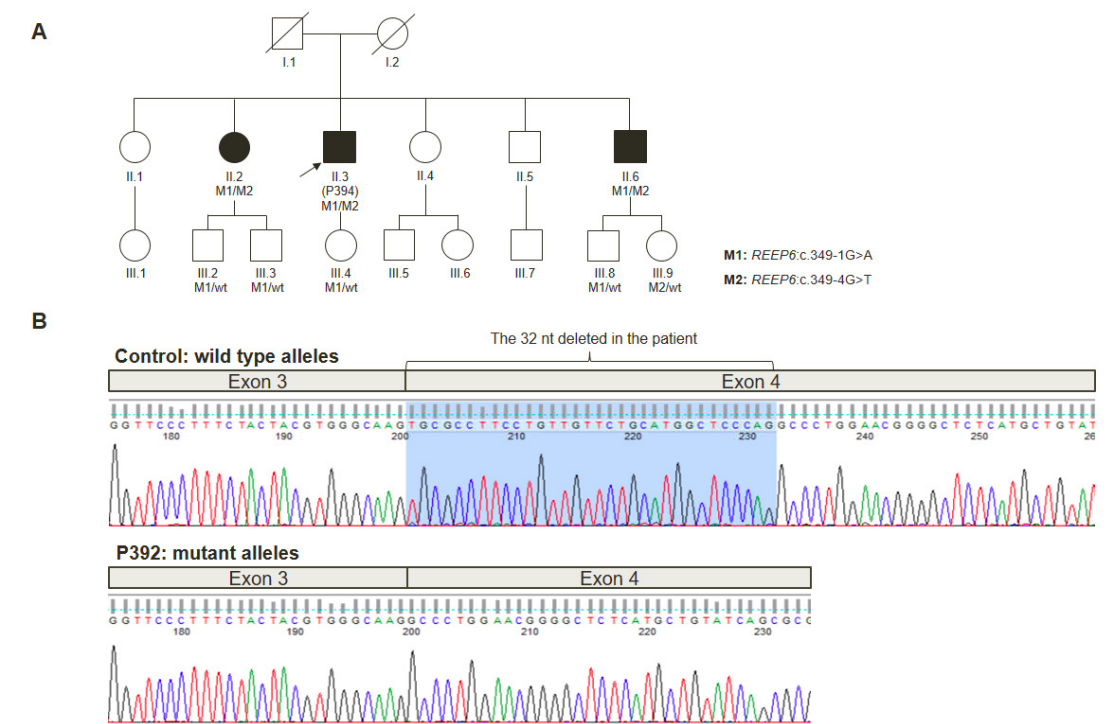
ABCA4 midigene-based splice assay

The splicing effect of *ABCA4* c.859-442C>T was assessed using an *in vitro* splice assay, based on a previously established wild-type (WT) midigene (BA7) containing *ABCA4* exons 7 to 11 (1). The variant of interest was introduced into the WT construct via site-directed mutagenesis, followed by Gateway Cloning. Both constructs were transfected separately into Human Embryonic Kidney (HEK293T, ATCC# CRL-3216) cells, cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin and 1% sodium pyruvate at 37°C and 5% CO₂. Cells were seeded in a six-well plate and transfected at 70% confluency with 600 ng of plasmid DNA using FuGENE HD reagent (Promega, Madison, WI, USA), as per the manufacturer's protocol. Transfection of the mutant construct was performed in duplicate. After 48 hours, total RNA was extracted using the Nucleospin RNA kit (Machery-Nagel, Düren, Germany) and cDNA was synthesised from 1000 ng of RNA using the iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to

evaluate splicing. RT-PCR conditions for the *ABCA4* RNA were as follows: initial denaturation at 94°C for two minutes, followed by 30 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 58°C, and five minutes at 72°C, with a final extension step of two minutes at 72°C. *ACTB* (actin beta) was selected as housekeeping gene control and exon 5 of *RHO* served as a transfection control. RT-PCR conditions for these controls were: initial denaturation at 94°C for two minutes, followed by 35 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 58°C, and thirty seconds at 72°C and a final extension step of two minutes at 72°C.

Details on the primers used for mutagenesis, PCR, and Sanger sequencing are provided in Supplementary Table S2. Following PCR amplification, agarose gel analysis and Sanger sequencing were performed to assess the nature of splicing defects. Ratios between different RNA products were assessed by semi-quantification using Fiji software after agarose gel electrophoresis (Supplementary Table S5).

3 Supplementary Figures



4 **Supplementary Tables**

Table S1. Primers used for mRNA analysis of the variants identified in *ATF6* and *REEP6*.

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Product size (bp)
REEP6	CACTCTGCTAAGCCTGTATC	CACTTGTCCTTCGGCTGC	432
ATF6	CACAGGCTGGATGAAGATTG	AGTCTTGTTCTAGGACCAG	424

Table S2. Oligonucleotides used in the splicing assay. **(A)** Primers for reverse transcription-PCR analysis and Sanger sequencing. **(B)** Oligonucleotides designed to introduce mutations into wild-type entry clones.

A

BA_ID	Primer sequences (5'-3')	Product size (bp)
BA7_forward	ACACTCCTAGACAGCCGTTTC	780
BA7_reverse	CTCCAGGTATTGATTGACCAG	
RHO_exon5_forward	ATCTGCTGCGGCAAGAAC	140
RHO_exon5_reverse	AGGTGTAGGGGATGGGAGAC	
ACTB_mouse_exon3	ACTGGGACGACATGGAGAAG	383
ACTB_mouse_exon4	TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG	

B

WT fragment	DNA variant_primer orientation	Mutagenesis primer sequences (5' - 3')
BA7	c.859-442C>T_Fwd	CGATGTCTACTCACTGTAAGTTCTGCCCCCAGG
	c.859-442C>T_Rev	CCTGGGGGGCAGAACTTACAGTGAGTAGACATCG

Table S4. In silico splicing predictions for candidate variants in *REEP6*, *ATF6* and *ABCA4*.

Gene	Variant	Splice AI score Acceptor loss (position)	Splice AI score Acceptor gain (position)	Splice AI score Donor loss (position)	Splice AI score Donor gain (position)
REEP6	c.349-1G>A	0.99 (1 bp)	0.17 (33 bp)	-	0.01 (212 bp)
REEP6	c.349-4G>T	0.07 (4 bp)	0.16 (36 bp)	-	-
ATF6	c.160-8A>G	0.11 (8 bp)	0.99 (1 bp)	-	-
ABCA4	c.859-442C>T	0.01 (-304 bp)	0.28 (243 bp)	-	0.23 (6 bp)

Table S5. Semi-quantification of RT-PCR fragments based on densitometry analysis of the gel electrophoresis results. Semi-quantification was performed on gel electrophoresis images using ImageJ software for two independent transfection experiments (biological replicates) and in technical replicates (1) and (2). PCR fragments are numbered as in Fig. 3. The average values were considered to determine the order of splice defects in the protein notation.

	Mutant Fragment	Raw intensity (1)	Raw intensity (2)	Fragment size (nt)	Size correction factor	Corrected intensity (1)	Corrected intensity (2)	Percentage	Average (%)
1st biological replicate	1	765,3	795,9	1.018	1,0	765,3	795,9	36,5%	79,7% (MUT)
	3	75,1	89,9	539	0,5	141,8	169,8	7,3%	
	4	212,3	213,3	282	0,3	766,3	769,86	35,9%	
	2	340,0	326,3	780	0,8	443,77	425,9	20,3%	20,3% (WT)
2nd biological replicate	1	2543,9	2588,0	1.018	1,0	2543,9	2588,0	36,9%	79% (MUT)
	3	273,7	280,1	282	0,3	516,9	529,1	7,5%	
	4	669,4	663,9	539	0,5	2416,4	2396,9	34,6%	
	2	1106,6	1130,9	780	0,8	1444,3	1475,9	21%	21% (WT)

References

1. Sangermano R, Khan M, Cornelis SS, Richelle V, Albert S, Garanto A, et al. ABCA4 midigenes reveal the full splice spectrum of all reported noncanonical splice site variants in Stargardt disease. *Genome Res.* 2018 Jan;28(1):100–10.

Table S3. Resolved IRD cases with a definitive genetic diagnosis. AD, Autosomal Dominant; AO, Age of Onset; AR, Autosomal Recessive; F, Female; FamHx, Family History; Inh, Pattern, Inheritance Pattern; M, Male; mt, Mitochondrial; XL, X-linked.

ID	Age	Gender	AO	FamHx	Clinical diagnosis	Proband case	Gene	Transcript	Inh. pattern	cDNA	protein change	Allele 1	cDNA	protein change	Allele 2	protein change
P1	35	F	11	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.6112C>T	p.(Arg602Trp)		c.1804C>T	p.(Arg602Trp)		p.(Thr1821Valfs*13;Am1868Ile)
P2	63	M	59	No	Late onset Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.3386G>A	p.(Arg1129Leu)		c.5461-10T>C;5603A>T	p.(Arg1129Leu)		p.(Val1573*)
P3	21	M	6	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.5917del	p.(Val1573*)		c.5917del	p.(Val1573*)		p.(Ala1357Thr)
P4	21	F	9	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.4352+1G>A	p.(?)		c.4069G>A	p.(Ala1357Thr)		p.(Arg1129Leu)
P5	20	M	16	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.[3322C>T;6071A>G]	p.(Arg1108Cys;Asp2024Gln)		c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)		p.(Gly317Alafs*57)
P6	79	M	69	No	Late onset Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.6148G>C	p.(Val2050Leu)		c.950del	p.(Arg1129Leu)		p.(Arg1129Leu)
P7	73	F	62	No	Late onset Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.735T>G	p.(Tyr245*)		c.6089G>A	p.(Arg1129Leu)		p.(Arg1129Leu)
P8	53	F	50	No	Late onset Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.5603A>T	p.(Asn1868Ile)		c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)		p.(Arg1129Leu)
P9	45	F	40	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.5655del	p.(Val1887Trpfs*6)		c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)		p.(Arg1129Leu)
P10	45	F	42	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.3210_3211dup	p.(Ser1077Cysfs*14)		c.5603A>T	p.(Arg1129Leu)		p.(Arg1129Leu)
P11	51	M	30	Yes	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.735T>G	p.(Tyr245*)		c.5714+5G>A	p.(Arg1129Leu)		p.(Arg1129Leu)
P12	33	F	unknown	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.4773+1G>T	p.(?)		c.4773+1G>T	p.(?)		p.(Glu1863Leufs*33)
P13	24	M	11	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.2041C>T	p.(Arg681*)		c.2041C>T	p.(Arg681*)		p.(Arg681*)
P14	40	M	22	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.6118C>T	p.(Arg6040*)		c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)		p.(Gly1961Glu)
P15	68	F	40	Yes	Cone dystrophy	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.[5882G>A;5603A>T]	p.(Gly1961Glu;Asn1868Ile)		c.3210_3211dup	p.(Ser1077Cysfs*14)		p.(Ser1077Cysfs*14)
P16	34	M	20	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.4253+4C>T	p.(Ile1377Hisfs*3)		c.4457C>T	p.(Pro1786Leu)		p.(Pro1786Leu)
P17	31	F	22	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)		c.5327C>T	p.(Pro1786Leu)		p.(Pro1786Leu)
P18	30	F	5	Yes	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)		c.306C>T	p.(Thr1019Met)		p.(Thr1019Met)
P19	21	F	12	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.2922_2949del	p.(Ile975Leufs*47)		c.1356+4dup	p.(?)		p.(?)
P20	24	M	8	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.634C>T	p.(Arg212Cys)		c.4337del	p.(Gln1513Argfs*13)		p.(Gln1513Argfs*13)
P21	30	F	12	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.93G>A	p.(Tyr61*)		c.758T>A	p.(Leu253His)		p.(Leu253His)
P22	25	F	18	No	Cone dystrophy	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.3988G>T	p.(Glu1330*)		c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)		p.(Arg1129Leu)
P23	55	F	40	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)		c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)		p.(Arg1129Leu)
P24	77	M	18	Yes	Cone-rod dystrophy	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.5549T>C	p.(Leu1850Pro)		c.1832T>C	p.(Leu611Pro)		p.(Leu611Pro)
P25	58	F	19	Yes	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)		c.1804C>T	p.(Arg602Trp)		p.(Arg602Trp)
P26	46	F	7	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.6449G>A	p.(Cys2150Tyr)		c.634C>T	p.(Arg212Cys)		p.(Arg212Cys)
P27	41	M	27	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)		c.3210_3211dup	p.(Ser1077Cysfs*14)		p.(Ser1077Cysfs*14)
P28	72	M	30	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.1755del	p.(Asp586Thrfs*63)		c.4793C>A	p.(Pro62Ala)		p.(Pro62Ala)
P29	60	F	35	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.6089G>A	p.(Arg2030Gln)		c.184C>G	p.(Arg120Cys)		p.(Arg120Cys)
P30	32	M	6	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.4537dup	p.(Gln1513Profs*42)		c.634C>T	p.(Thr1821Aspfs*6;Thr1821Valfs*13)		p.(Thr1821Aspfs*6;Thr1821Valfs*13)
P31	24	F	14	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)		c.5461-10T>C	p.(Arg1108Cys)		p.(Arg1108Cys)
P32	46	F	25	Yes	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.[1627T>C;3113C>T]	p.(Ala1038Val;Leu541Pro)		c.332C>T	p.(Arg1108Cys)		p.(Arg1108Cys)
P33	61	M	10	Yes	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.[1627T>C;3113C>T]	p.(Ala1038Val;Leu541Pro)		c.332C>T	p.(Arg1108Cys)		p.(Arg1108Cys)
P34	61	F	47	No	Late onset Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.6089G>A	p.(Arg2030Gln)		c.1025_1038del	p.(Arg1129Leu)		p.(Arg1129Leu)
P35	29	M	20	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.3292C>T	p.(Arg1098Cys)		c.1766G>A	p.(Asp3420Gfs*6)		p.(Asp3420Gfs*6)
P36	48	M	28	Yes	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)		c.332C>T	p.(Trp589*)		p.(Trp589*)
P37	38	M	20	Yes	Cone dystrophy	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)		c.1356+4A>G	p.(Arg1108Cys)		p.(Arg1108Cys)
P38	30	F	20	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)		c.327C>C	p.(Leu11Pro)		p.(Leu11Pro)
P39	35	M	20	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.5714+5G>A	p.(Glu1863Leufs*33)		c.4947del	p.(Glu150Arg)		p.(Glu150Arg)
P40	48	F	25	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.3287C>T	p.(Ser1096Leu)		c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)		p.(Arg1129Leu)
P41	24	M	18	No	Cone dystrophy	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.6410G>A	p.(Cys213Tyr)		c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)		p.(Arg1129Leu)
P42	55	M	51	No	Late onset Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.5836-1G>C	p.(?)		c.6088C>T	p.(Am1868Ile)		p.(Am1868Ile)
P43	78	F	74	No	Late onset Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.3113C>T	p.(Ala1038Val)		c.1804C>T	p.(Arg602Trp)		p.(Arg602Trp)
P44	52	M	48	No	Late onset Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)		c.1086T>A	p.(Tyr362*)		p.(Tyr362*)
P45	78	F	74	No	Late onset Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.4519G>A	p.(Gly1507Arg)		c.5714+5G>A	p.(Glu1863Leufs*33)		p.(Glu1863Leufs*33)
P46	27	M	12	Yes	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)		c.52C>T	p.(Arg1129Leu)		p.(Arg1129Leu)
P47	60	F	10	Yes	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.6088C>T	p.(Arg2030*)		c.6088C>T	p.(Arg2030*)		p.(Arg2030*)
P48	68	M	18	Yes	Cone dystrophy	No	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.6088C>T	p.(Arg2030*)		c.634C>T	p.(Arg1129Leu)		p.(Arg1129Leu)
P49	58	F	9	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.3210_3211dup	p.(Ser1077Cysfs*14)		c.634C>T	p.(Arg1129Leu)		p.(Arg1129Leu)
P50	39	F	28	Yes	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.1958G>A	p.(Arg653His)		c.5714+1G>A	p.(?)		p.(?)
P51	35	M	31	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)		c.1715G>C	p.(Arg572Pro)		p.(Arg572Pro)
P52	40	F	18	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)		c.454C>T	p.(Arg152*)		p.(Arg152*)

ID	Age	Gender	AO	FamHx	Clinical diagnosis	Proband case	Gene	Transcript	Inh. pattern	cDNA	protein change	Allele 1	cDNA	protein change	Allele 2	protein change
P53	62	M	55	No	Late onset Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.4457C>T	p.(Pro1486Leu)		c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)		p.(Arg1129Leu)
P54	50	F	9	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.1715G>C	p.(Arg572Pro)		c.4918C>T	p.(Arg1540Trp)		p.(Arg1540Trp)
P55	55	F	47	No	Late onset Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.5461-1G>T	p.(?)		c.3113C>T	p.(Ala1038Val)		p.(Ala1038Val)
P56	61	M	5	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.634C>T	p.(Arg212Cys)		c.[3322C>T;6320G>A]	p.(Arg1108Cys;Arg2107His)		p.(Arg1108Cys;Arg2107His)
P57	19	M	16	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.5529G>A	p.(Gln1977Ser)		c.5882G>C	p.(Gly863Ala;Gly863del)		p.(Gly863Ala;Gly863del)
P58	40	F	16	Yes	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.6658C>T	p.(Gln2220*)		c.2582G>C	p.(Gly1961Glu)		p.(Gly1961Glu)
P59	80	F	30	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)		c.[3210_3211dup;5603A>T]	p.(Ser1077Cysfs*14;Am1868Ile)		p.(Ser1077Cysfs*14;Am1868Ile)
P60	57	F	45	Yes	Late onset Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.5461-10T>C	p.(Thr1821Aspfs*6;Thr1821Valfs*13)		c.5603A>T	p.(Thr1821Aspfs*6;Thr1821Valfs*13)		p.(Thr1821Aspfs*6;Thr1821Valfs*13)
P61	74	F	2	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.5461-10T>C	p.(Thr1821Aspfs*6;Thr1821Valfs*13)		c.5461-10T>C	p.(Thr1821Aspfs*6;Thr1821Valfs*13)		p.(Thr1821Aspfs*6;Thr1821Valfs*13)
P62	51	M	11	Yes	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.1391T>A	p.(Leu464*)		c.3277G>A	p.(Asp1059Asn)		p.(Asp1059Asn)
P63	61	F	27	Yes	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.1025_1038del	p.(Asp3420Gfs*6)		c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)		p.(Gly1961Glu)
P64	63	F	27	Yes	Late onset Stargardt disease	No	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.1025_1038del	p.(Asp3420Gfs*6)		c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)		p.(Gly1961Glu)
P65	68	F	60	Yes	Late onset Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.4457C>T	p.(Pro1486Leu)		c.4457C>T	p.(Pro1486Leu)		p.(Pro1486Leu)
P66	21	F	9	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.4352+1G>A	p.(?)		c.4069G>A	p.(Ala1357Thr)		p.(Ala1357Thr)
P67	19	M	16	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)		c.306C>T	p.(Thr1019Met)		p.(Thr1019Met)
P68	19	M	10	No	Stargardt disease	Yes	ABCA4	NM_000350.3	AR	c.1391T>A	p.(Leu464*)		c.286A>G	p.(Asn964up)		p.(Asn964up)
P69	63	F	61	No	Pseudoxanthoma elasticum	Yes	ABCC6	NM_001171.5	AR	c.[998+1_999-1](1176+1_1177)-1del	p.(?)		c.[2995+1_2996-1](4208+1_4209-1)del	p.(?)		p.(?)
P70	40	M	32	No	Syndromic retinitis pigmentosa	Yes	ABHD12	NM_001042472.3	AR	c.211_223del	p.(Arg71Tyrfs*26)		c.211_223del	p.(Arg71Tyrfs*26)		p.(Arg71Tyrfs*26)
P71	30	M	3	No	Usher syndrome	Yes	ADGRV1	NM_032119.4	AR	c.17688_17689delCT	p.(Met5890Valfs*10)		c.[22+1_c.23-1]_10550-1del	p.(Met5890Valfs*10)		p.(Met5890Valfs*10)
P72	35	M	2	No	Usher syndrome	Yes	ADGRV1	NM_032119.4	AR	c.7988_7989delCT	p.(Ser2663*)		c.[22+1_c.23-1]_10550-1del	p.(Met5890Valfs*10)		p.(Met5890Valfs*10)
P73	51	M	5	No	Usher syndrome	Yes	ADGRV1	NM_032119.4	AR	c.17933A>G	p.(His978Arg)		c.[17973+1_17974-1]_18153-1del	p.(?)		p.(?)
P74	60	M	10	Yes	Usher syndrome	Yes	ADGRV1	NM_032119.4	AR	c.3323_3324dup	p.(Val1006Glnfs*2)		c.9367G>T	p.(Glu3123*)		p.(Glu3123*)
P75	30	M	1	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	AHL1	NM_00113483.2	AR	c.786del	p.(Glu462Aspfs*21)		c.786del	p.(Glu462Aspfs*21)		p.(Glu462Aspfs*21)

ID	Age	Gender	AO	FamHx	Clinical diagnosis	Proband case	Gene	Transcript	Inh. pattern	cDNA	protein change	Allele 1	cDNA	protein change	Allele 2
P106	45	F	15	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	CDHR1	NM_031000.4	AR	c.1554-2A>C	p.(?)		c.186dup	p.(Arg623Lys*53)	
P107	49	M	10	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	CDHR1	NM_031000.4	AR	c.1554-2A>C	p.(?)		c.186dup	p.(Arg623Lys*53)	
P108	89	F	15	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	CDHR1	NM_031000.4	AR	c.27>A	p.(Met17)			p.(Met17)	
P109	28	F	14	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	CEP290	NM_025114.4	AR	c.7341dup	p.(Leu2448Tris*8)			p.(Met17)	
P110	32	F	10	No	Syndromic retinitis pigmentosa	Yes	CEP290	NM_025114.4	AR	c.4813-1G>A	p.(?)			p.(Trp1912*)	
P111	6	M	3	No	Leber congenital amaurosis	Yes	CEP290	NM_025114.4	AR	c.2981+1655A>G	p.(?)			p.(Glu1554del)	
P112	52	M	3	Yes	Cone-rod dystrophy	Yes	CEP290	NM_025114.4	AR	c.5776>C	p.(Arg1926Pro)			p.(Ser318Lufs*16)	
P113	56	F	10	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	CEP290	NM_025114.4	AR	c.5776>C	p.(Arg1926Pro)			p.(Ser318Lufs*16)	
P114	28	F	1	No	Syndromic retinitis pigmentosa	Yes	CEP290	NM_025114.4	AR	c.6271-8T>G	p.(?)			p.(?)	
P115	84	F	unknown	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	CEP78	NM_001098002.3	AR	c.440C>A	p.(Arg435*)			p.(Cys147*)	
P116	54	M	49	No	Cone dystrophy	Yes	CFKL8	NM_004928.3	AR	c.1381C>T	p.(Leu86Arg)			p.(Leu86Arg)	
P117	31	F	15	Yes	Leber congenital amaurosis	Yes	19410 (C21or)	NM_004928.3	AR	c.2577>G	p.(Leu86Arg)			p.(Leu86Arg)	
P118	28	F	20	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	19410 (C21or)	NM_004928.3	AR	c.2577>G	p.(Leu86Arg)			p.(Leu86Arg)	
P119	44	M	30	Yes	Cone-rod dystrophy	No	19410 (C21or)	NM_004928.3	AR	c.2577>G	p.(Leu86Arg)			p.(Leu86Arg)	
P120	37	F	13	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	CHM	NM_177965.4	AR	c.317_318insTT	p.(Val107Trp*28)			p.(Val107Trp*28)	
P121	69	M	10	Yes	Choroideremia	Yes	CHM	NC_000023.10	XL	g.(?_85119606)_ (85304153_?)	p.(?)			p.(?)	
P122	38	F	NA	Yes	Asymptomatic	No	CHM	NC_000023.10	XL	g.(?_85119606)_ (85304153_?)	p.(?)			p.(?)	
P123	50	M	5	Yes	Choroideremia	Yes	CHM	NM_000390.4	XL	c.(?_26)_ (1510+1_1511-1)del	p.(?)			p.(?)	
P124	33	M	30	Yes	Choroideremia	No	CHM	NM_000390.4	XL	c.(?_26)_ (1510+1_1511-1)del	p.(?)			p.(?)	
P125	25	M	21	Yes	Choroideremia	No	CHM	NM_000390.4	XL	c.(?_26)_ (1510+1_1511-1)del	p.(?)			p.(?)	
P126	28	M	25	Yes	Choroideremia	No	CHM	NM_000390.4	XL	c.(?_26)_ (1510+1_1511-1)del	p.(?)			p.(?)	
P127	44	F	NA	Yes	Asymptomatic	No	CHM	NM_000390.4	XL	c.(?_26)_ (1510+1_1511-1)del	p.(?)			p.(?)	
P128	19	M	7	Yes	Choroideremia	Yes	CHM	NM_000390.4	XL	c.525_526del	p.(Glu171Lys*6)			p.(Leu267Phe*10)	
P129	63	M	40	Yes	Choroideremia	Yes	CHM	NM_000390.4	XL	c.808C>T	p.(Arg270*)			p.(?)	
P130	24	F	5	No	Syndromic retinitis pigmentosa	Yes	CIN3	NM_001042432.2	AR	c.(374+1_375-1)_ (533+1_534-1)del	p.(?)			p.(Arg405Trp)	
P131	51	M	unknown	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	CIN3	NM_001042432.2	AR	c.1213C>T	p.(Arg405Trp)			p.(Arg214*)	
P132	72	M	55	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	CNGA1	NM_000087.3	AR	c.640C>T	p.(Arg405Trp)			p.(Arg214*)	
P133	73	M	64	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	CNGA1	NM_000087.3	AR	c.947C>T	p.(Ser316Phe)			p.(Ser316Phe)	
P134	82	F	70	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	CNGA1	NM_000087.3	AR	c.82C>T	p.(Arg28*)			p.(Arg28*)	
P135	42	F	20	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	CNGA1	NM_000087.3	AR	c.1540C>T	p.(Arg514*)			p.(Arg218*)	
P136	23	M	16	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	CNGA1	NM_00179270.1	AR	c.1528C>T	p.(Arg510*)			p.(Arg510*)	
P137	20	F	3	No	Achromatopsia	Yes	CNGA3	NM_001298.3	AR	c.940_942del	p.(Ile314del)			p.(Ile314del)	
P138	23	F	12	Yes	Achromatopsia	Yes	CNGA3	NM_001298.3	AR	c.829C>T	p.(Arg277Cys)			p.(Arg277Cys)	
P139	89	M	unknown	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	CNGB1	NM_001297.5	AR	c.2957A>T	p.(Asn986Ile)			p.(Asn986Ile)	
P140	57	M	50	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	CNGB1	NM_001297.5	AR	c.2957A>T	p.(Asn986Ile)			p.(Leu267Phe*10)	
P141	50	F	40	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	CNGB1	NM_001297.5	AR	c.3150del	p.(Phe1051Leufs*12)			p.(?)	
P142	28	M	5	No	Achromatopsia	Yes	CNGB3	NM_001909.8	AR	c.1148del	p.(Thr383Ilefs*13)			p.(?)	
P143	69	M	unknown	No	Cone dystrophy	Yes	COL11A1	NM_001854.4	AD	c.442_446delinsGAAAT	p.(Lys1480Ilefs*31)			p.(Lys1480Ilefs*31)	
P144	19	F	10	Yes	Sickler syndrome	Yes	COL11A1	NM_001854.4	AD	c.1630-2A>C	p.(?)			p.(?)	
P145	15	F	6	Yes	Sickler syndrome	Yes	COL2A1	NM_001844.5	AD	c.2794C>T	p.(Arg932*)			p.(Arg932*)	
P146	42	F	10	Yes	Sickler syndrome	Yes	COL2A1	NM_001844.5	AD	c.3451+1G>A	p.(?)			p.(?)	
P147	19	M	7	No	Sickler syndrome	Yes	COL2A1	NM_001844.5	AD	c.2678dupC	p.(Asn955Serfs*49)			p.(?)	
P148	16	M	5	Yes	Sickler syndrome	No	COL2A1	NM_001844.5	AD	c.1942-1G>A	p.(?)			p.(?)	
P149	41	F	36	Yes	Sickler syndrome	No	COL2A1	NM_001844.5	AD	c.1942-1G>A	p.(?)			p.(?)	
P150	46	F	6	No	Cone-rod dystrophy	Yes	CRB1	NM_201253.3	AR	c.498_506del	p.(Ile167_Gly169del)			p.(Gly103Arg)	
P151	41	F	3	No	Leber congenital amaurosis	Yes	CRB1	NM_201253.3	AR	c.2843G>A	p.(Cys948Trp)			p.(Cys948Trp)	
P152	79	M	67	No	Maculopathy	Yes	CRB1	NM_201253.3	AR	c.3307>G	p.(Phe144Val)			p.(Ile205Asfs*13)	
P153	61	M	7	Yes	Maculopathy	Yes	CRB1	NM_201253.3	AR	c.2496G>A	p.(Gly633Asp)			p.(Ile167_Gly169del)	
P154	46	F	40	Yes	Cone dystrophy	Yes	CRB1	NM_201253.3	AR	c.2549G>T	p.(Gly850Val)			p.(Ile167_Gly169del)	
P155	21	M	17	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	CRB1	NM_201253.3	AR	c.2843G>A	p.(Cys948Trp)			p.(Ile167_Gly169del)	
P156	49	M	20	No	Cone dystrophy	Yes	CRB1	NM_201253.3	AR	c.613_619del	p.(Ile205Asfs*13)			p.(Ile167_Gly169del)	
P157	20	F	3	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	CRB1	NM_201253.3	AR	c.2506C>A	p.(Pro836Thr)			p.(Gln362*)	
P158	54	F	9	No	Cone dystrophy	Yes	CRB1	NM_201253.3	AR	c.613_619del	p.(Ile205Asfs*13)			p.(Ile167_Gly169del)	

ID	Age	Gender	AO	FamHx	Clinical diagnosis	Proband case	Gene	Transcript	Inh.	cDNA	protein change	Allele 1	cDNA	protein change	Allele 2
P159	20	M	4	No	Leber congenital amaurosis	Yes	CRB1	NM_201253.3	AR	c.1360G>A	p.(Gly454Arg)				p.(Gly454Arg)
P160	22	F	6	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	CRB1	NM_201253.3	AR	c.2843G>A	p.(Cys948Trp)		c.1498_506del	p.(Ile167_Gly169del,Gly454Arg)	
P161	22	M	8	No	Cone-rod dystrophy	Yes	CRB1	NM_201253.3	AR	c.1360G>A	p.(Gly454Arg)		c.2290C>T	p.(Arg764Cys)	
P162	72	M	24	No	Maculopathy	Yes	CRX	NM_000554.6	AD	c.269G>A	p.(Arg90Gln)				
P163	38	F	49	Yes	Maculopathy	Yes	CRX	NM_000554.6	AD	c.100+1_101-1_13363_2)del	p.(?)				
P164	45	F	14	Yes	Cone dystrophy	No	CRX	NM_000554.6	AD	c.100+1_101-1_13363_2)del	p.(?)				
P165	72	F	20	Yes	Cone-rod dystrophy	No	CRX	NM_000554.6	AD	c.100+1_101-1_13363_2)del	p.(?)				
P166	24	M	4	No	Leber congenital amaurosis	Yes	CRX	NM_000554.6	AD	c.124G>A	p.(Glu42Lys)				
P167	63	F	53	No	Retinal pattern dystrophy	Yes	CRX	NM_000554.6	AD	c.100+1_101-1_13363_2)del	p.(?)				
P168	68	F	60	Yes	Maculopathy	Yes	CRX	NM_000554.6	AD	c.365del	p.(Gly122Alafs*65)				
P169	66	F	28	Yes	Maculopathy	No	CRX	NM_000554.6	AD	c.365del	p.(Gly122Alafs*65)				
P170	42	F	17	Yes	Maculopathy	No	CRX	NM_000554.6	AD	c.365del	p.(Gly122Alafs*65)				
P171	70	F	30	No	Maculopathy	Yes	CRY4V2	NM_207352.4	AR	c.283G>A	p.(Gly454Arg)		c.1393A>G	p.(Arg455Gly)	
P172	47	M	10	Yes	Bietti crystalline dystrophy	Yes	EYS	NM_001142800.2	AR	c.5928-2A>G	p.(?)		c.5928-2A>G	p.(?)	
P173	40	M	30	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	EYS	NM_001142800.2	AR	c.5928-2A>G	p.(?)		c.5928-2A>G	p.(?)	
P174	30	F	19	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	EYS	NM_001142800.2	AR	c.2137+1G>A	p.(?)		c.(333+1_332-1_1766+1_1767-1)dup	p.(?)	
P175	80	F	57	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	EYS	NM_001142800.2	AR	c.4045C>T	p.(Arg1349*)		c.5296_2827del	p.(P19194Glyfs*9)	
P176	34	M	34	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	EYS	NM_001142800.2	AR	c.6794del	p.(Pro2265Glnfs*46)		c.8834G>A	p.(Ile1764Asnfs*6)	
P177	66	F	40	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	EYS	NM_001142800.2	AR	c.8834G>A	p.(Gly294Glu)		c.8834G>A	p.(Gly294Glu)	
P178	52	F	47	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	EYS	NM_001142800.2	AR	c.5928-2A>G	p.(?)		c.1211dup	p.(P19294Glyfs*3)	
P179	22	M	20	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	EYS	NM_001142800.2	AR	c.8982_8985del	p.(Ile2995Tyrfs*5)		c.8982_8985del	p.(Ile2995Tyrfs*5)	
P180	47	F	41	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	EYS	NM_001142800.2	AR	c.3567del	p.(Gly190Aspfs*39)		c.3567del	p.(Gly190Aspfs*39)	
P181	57	F	40	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	EYS	NM_001142800.2	AR	c.7055+1G>A	p.(?)		c.(2023+1_2024-1_3443+1_3444-1)del	p.(?)	
P182	52	F	48	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	EYS	NM_001142800.2	AR	c.2380C>T	p.(Arg794*)		c.7919G>A	p.(Trp2640*)	
P183	56	F	48	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	EYS	NM_001142800.2	AR	c.6794del	p.(Pro2265Glnfs*46)		c.7810C>T	p.(Arg2604Cys)	
P184	42	F	38	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	EYS	NM_001142800.2	AR	c.3164+1G>A	p.(?)		c.2826_2827del	p.(V94Argfs*9)	
P185	29	M	17	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	FAM161A	NM_001201543.2	AR	c.685C>T	p.(Arg229*)		c.685C>T	p.(Arg229*)	
P186	25	F	20	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	FAM161A	NM_001201543.2	AR	c.685C>T	p.(Arg229*)		c.1335_1356del	p.(Arg229*)	
P187	64	M	30	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	FAM161A	NM_001201543.2	AR	c.1355_1356del	p.(Thr452Serfs*3)		c.1335_1356del	p.(Thr452Serfs*3)	
P188	59	M	20	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	FAM161A	NM_001201543.2	AR	c.1355_1356del	p.(Thr452Serfs*3)		c.1335_1356del	p.(Thr452Serfs*3)	
P189	50	M	10	No	Congenital stationary night blindness	Yes	GNAT1	NM_144499.3	AR	c.339C>A	p.(Ser120*)		c.359C>A	p.(Ser120*)	

ID	Age	Gender	AO	FamHx	Clinical diagnosis	Proband case	Gene	Transcript	Inh. pattern	cDNA	protein change	cDNA	protein change	Allele 1	Allele 2
P212	44	M	30	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	NR2E3	NM_014249.4	AR	c.932G>A	p.(Arg311Gln)	c.932G>A	p.(Arg311Gln)		
P213	63	F	unknown	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	NR2E3	NM_014249.4	AR	c.227G>A	p.(Arg766Gln)	c.227G>A	p.(Arg766Gln)		
P214	48	M	5	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	NR2E3	NM_014249.4	AR	c.227G>A	p.(Arg766Gln)	c.227G>A	p.(Arg766Gln)		
P215	24	M	5	Yes	Congenital stationary night blindness	Yes	NYX	NM_001378477.3	XL	c.220G>T	p.(Glu74*)				
P216	30	M	2	Yes	Congenital stationary night blindness	No	NYX	NM_001378477.3	XL	c.220G>T	p.(Glu74*)				
P217	25	M	2	Yes	Gyrate atrophy	Yes	OAT	NM_000274.3	AR	c.253T>G	p.(Tyr85Asp)	c.253T>G	p.(Tyr85Asp)		
P218	22	M	8	Yes	Gyrate atrophy	No	OAT	NM_000274.3	AR	c.253T>G	p.(Tyr85Asp)	c.253T>G	p.(Tyr85Asp)		
P219	20	M	2	Yes	Cone-rod dystrophy	Yes	OPN1LW/O	NM_020616.6/	XL	c.[457C>A; 511A>G; 521C>T; 532A>G; 538T>G]	p.[Leu153Met; Ile171Val; Ala174Val; Ser180Ala]				
P220	34	M	12	Yes	Cone-rod dystrophy	Yes	OPN1LW/O	NM_020616.6/	XL	c.[457C>A; 511A>G; 521C>T; 532A>G; 538T>G]	p.[Leu153Met; Ile171Val; Ala174Val; Ser180Ala]				
P221	24	M	5	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	PD6EA	NM_000440.3	AR	c.195T>C	p.(Arg653*)	c.195T>C	p.(Arg653*)		
P222	30	F	21	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	PD6EA	NM_000440.3	AR	c.1705C>A	p.(Gln569Iys)	c.1749C>G	p.(Tyr583*)		
P223	58	M	40	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	PD6EA	NM_000440.3	AR	c.1286del	p.(Gln423*)	c.305G>A	p.(Arg100His)		
P224	36	F	24	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	PD6EB	NM_000283.4	AR	c.1832+1G>C	p.(?)	c.270dup	p.(Ile70His* 96)		
P225	38	F	5	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	PD6EB	NM_000283.4	AR	c.293G>C	p.(Arg98Pro)	c.239G>C	p.(Arg98Pro)		
P226	18	F	10	No	Cone dystrophy	Yes	PD6EC	NM_006204.4	AR	c.1805A>C	p.(His602Pro)	c.2159C>T	p.(Thr720Met)		
P227	53	M	30	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	PRCD	NM_001077620.3	AR	c.70C>T	p.(Gln24*)	c.70C>T	p.(Gln24*)		
P228	79	F	36	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	PRCD	NM_001077620.3	AR	c.70C>T	p.(Gln24*)	c.70C>T	p.(Gln24*)		
P229	69	F	35	No	Retinal pattern dystrophy	Yes	PROM1	NM_006017.3	AD	c.1117C>T	p.(Arg373Gly)				
P230	51	M	50	No	Retinal pattern dystrophy	Yes	PROM1	NM_006017.3	AD	c.1255dup	p.(Tyr419Leufs*13)				
P231	59	F	55	Yes	Retinal pattern dystrophy	Yes	PROM1	NM_006017.3	AD	c.303+1G>A	p.(?)				
P232	36	F	-	Yes	Maculopathy	No	PROM1	NM_006017.3	AD	c.303+1G>A	p.(?)				
P233	53	M	45	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	PRPF31	NM_015629.4	AD	c.303+1G>A	p.(?)				
P234	21	F	3	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	PRPF31	NM_015629.4	AD	c.118C>T	p.(Gln49*)				
P235	52	M	40	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	PRPF31	NM_015629.4	AD	c.39dup	p.(Gly314Argfs*10)				
P236	47	M	40	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	PRPF31	NM_015629.4	AD	c.93dup	p.(Gly314Argfs*10)				
P237	20	M	6	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	PRPF31	NM_015629.4	AD	c.541G>T	p.(Glu181*)				
P238	17	F	10	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	PRPF31	NM_015629.4	AD	g.[?_54632422][54634873_?]del	p.(?)				
P239	40	M	8	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	PRPF8	NM_006445.4	AD	c.6837G>C	p.(Trp2279Cys)				
P240	48	M	14	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	PRPF8	NM_006445.4	AD	c.6837G>C	p.(Trp2279Cys)				
P241	75	F	20	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	PRPF8	NM_006445.4	AD	c.6837G>C	p.(Trp2279Cys)				
P242	58	F	11	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	PRPF8	NM_006445.4	AD	c.6837G>C	p.(Trp2279Cys)				
P243	55	F	15	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	PRPF8	NM_006445.4	AD	c.6837G>C	p.(Trp2279Cys)				
P244	44	F	10	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	PRPF8	NM_006445.4	AD	c.6837G>C	p.(Trp2279Cys)				
P245	60	M	20	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	PRPF8	NM_006445.4	AD	c.6837G>C	p.(Trp2279Cys)				
P246	31	F	7	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	PRPF8	NM_006445.4	AD	c.6837G>C	p.(Trp2279Cys)				
P247	26	M	23	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	PRPF8	NM_006445.4	AD	c.6929G>A	p.(Arg2310Iys)				
P248	46	F	42	Yes	Adult-onset vitelliform macular dystrophy	Yes	PRPH2	NM_000322.5	AD	c.659G>A	p.(Arg220Gln)				
P249	75	F	70	Yes	Retinal pattern dystrophy	No	PRPH2	NM_000322.5	AD	c.659G>A	p.(Arg220Gln)				
P250	61	F	40	Yes	Retinal pattern dystrophy	Yes	PRPH2	NM_000322.5	AD	c.676C>T	p.(Gln226*)				
P251	61	M	50	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	PRPH2	NM_000322.5	AD	c.389T>C	p.(Leu130Pro)				
P252	74	M	28	Yes	Maculopathy	Yes	PRPH2	NM_000322.5	AD	c.828+2T>C	p.(?)				
P253	46	M	41	Yes	Maculopathy	No	PRPH2	NM_000322.5	AD	c.828+2T>C	p.(?)				
P254	46	M	37	Yes	Maculopathy	Yes	PRPH2	NM_000322.5	AD	c.537G>A	p.(Trp179*)				
P255	53	F	45	Yes	Maculopathy	No	PRPH2	NM_000322.5	AD	c.537G>A	p.(Trp179*)				
P256	54	F	30	Yes	Adult-onset vitelliform macular dystrophy	Yes	PRPH2	NM_000322.5	AD	c.649_650insTACTGTCGCAATCTCTA	p.(Ser271Ilefs 48)				
P257	51	F	39	Yes	Retinal pattern dystrophy	Yes	PRPH2	NM_000322.5	AD	c.515G>A	p.(Arg172Gln)				
P258	55	M	40	Yes	Retinal pattern dystrophy	Yes	PRPH2	NM_000322.5	AD	c.499G>A	p.(Gly167Ser)	c.295C>A	p.(Leu99Ile)		
P259	62	M	5	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RDH12	NM_152443.3	AR	c.295C>A	p.(Ser175Leu)	c.883C>T	p.(Trp89*)		
P260	19	F	3	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RDH12	NM_152443.3	AR	c.524C>T	p.(Trp89*)				
P261	25	F	14	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	REEP6	NM_001329556.3	AR	c.267G>A	p.(Pro347Leu)				
P262	45	M	20	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RHO	NM_000539.3	AD	c.1040C>T	p.(Pro347Leu)				
P263	22	M	5	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RHO	NM_000539.3	AD	c.1040C>T	p.(Pro347Leu)				

ID	Age	Gender	AO	FamHx	Clinical diagnosis	Proband case	Gene	Transcript	Inh. pattern	cDNA	protein change	cDNA	protein change	Allele 1	Allele 2
P264	67	F	30	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RHO	NM_000539.3	AD	c.1034T>G	p.(Val345Gly)				
P265	61	F	20	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RHO	NM_000539.3	AD	c.1034T>G	p.(Val345Gly)				
P266	39	F	18	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RHO	NM_000539.3	AD	c.1034T>G	p.(Val345Gly)				
P267	29	M	10	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RHO	NM_000539.3	AD	c.1034T>G	p.(Val345Gly)				
P268	34	F	20	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RHO	NM_000539.3	AD	c.1034T>G	p.(Val345Gly)				
P269	65	F	32	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RHO	NM_000539.3	AD	c.1034T>G	p.(Val345Gly)				
P270	70	F	40	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RHO	NM_000539.3	AD	c.316G>A	p.(Gly106Arg)				
P271	42	M	40	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RHO	NM_000539.3	AD	c.316G>A	p.(Gly106Arg)				
P272	82	F	70	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RHO	NM_000539.3	AD	c.316G>A	p.(Gly106Arg)				
P273	74	M	50	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RHO	NM_000539.3	AD	c.546G>A	p.(Gly182Ser)				
P274	34	M	30	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RHO	NM_000539.3	AD	c.546G>A	p.(Gly182Ser)				
P275	49	M	40	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RHO	NM_000539.3	AD	c.546G>A	p.(Gly182Ser)				
P276	49	F	45	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RHO	NM_000539.3	AD	c.546G>A	p.(Gly182Ser)				
P277	69	F	50	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RHO	NM_000539.3	AD	c.546G>A	p.(Gly182Ser)				
P278	24	F	20	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RHO	NM_000539.3	AD	c.546G>A	p.(Gly182Ser)				
P279	73	M	40	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RHO	NM_000539.3	AD	c.546G>A	p.(Gly182Ser)				
P280	73	F	25	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RHO	NM_000539.3	AD	c.546G>A	p.(Gly182Ser)				
P281	52	F	50	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RHO	NM_000539.3	AD	c.546G>A	p.(Gly182Ser)				
P282	49	M	3	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RHO	NM_000539.3	AD	c.568G>T	p.(Asp190Tyr)				
P283	78	F	70	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RHO	NM_000539.3	AD	c.408C>A	p.(Tyr136*)				
P284	23	M	16	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RLBP1	NC_000015.9	AR	g.[?_89753516]_897535126_?del	p.[?]				
P285	22	F	15	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RP1	NM_006269.2	AR	c.1625C>G	p.(Ser542*)				
P286	50	M	44	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RP1	NM_006269.2	AR	c.2042delTTinsAA	p.(Ile6811Yfs*17)				
P287	27	F	20	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RP1	NM_006269.2	AR	c.922C>T	p.(Gln308*)				
P288	82	F	75	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RP1	NM_006269.2	AD	c.2288del	p.(Asn763Ilefs*12)				
P289	60	M	54	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RP1	NM_006269.2	AD	c.2029C>T	p.(Arg677*)				
P290	50	F	42	No	Syndromic retinitis pigmentosa	Yes	RP1L1	NM_178857.6	AD	c.1107G>A	p.(Trp369*)				
P291	55	F	47	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RP2	NM_006915.3	XL	c.632del	p.(Arg211Leufs*27)				
P292	25	F	1	Yes	Leber congenital amaurosis	Yes	RP6E5	NM_000329.3	AR	c.143G>A	p.(Gly48Glu)				
P293	33	M	1	Yes	Leber congenital amaurosis	No	RP6E5	NM_000329.3	AR	c.143G>A	p.(Gly48Glu)				
P294	42	F	1	Yes	Leber congenital amaurosis	No	RP6E5	NM_000329.3	AR	c.143G>A	p.(Gly48Glu)				
P295	26	F	1	No	Leber congenital amaurosis	Yes	RP6E5	NM_000329.3	AR	c.700C>T	p.(Arg234*)				
P296	35	M	9	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RP6E5	NM_000329.3	AR	c.1067del	p.(Asn356Metfs*17)				
P297	49	M	10	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RP6E5	NM_000329.3	AR	c.917C>T	p.(Thr30Ile)				
P298	24	M	4	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RP6E5	NM_000329.3	AR	c.131G>A	p.(Arg44Gln)				
P299	24	M	5	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.920C>A	p.(Thr307Iys)				
P300	22	F	20	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.920C>A	p.(Thr307Iys)				
P301	51	F	40	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.920C>A	p.(Thr307Iys)				
P302	23	M	5	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.897T>A	p.(Tyr299*)				
P303	53	F	39	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.897T>A	p.(Tyr299*)				
P304	20	M	14	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.2236_2237del	p.(Glu746Argfs*23)				
P305	52	F	39	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.2236_2237del	p.(Glu746Argfs*23)				
P306	79	M	18	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.3444C>G	p.(Tyr1148*)				
P307	42	M	30	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.818A>C	p.(Gln273Pro)				
P308	40	M	9	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.2274_2277del	p.(Gly759Iysfs*55)				
P309	46	F	40	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.2405_2406del	p.(Glu802Glyfs*32)				
P310	60	F	35	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.934A>T>C	p.[?]				
P311	22	M	18	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.2790_2791del	p.(Glu931Glyfs*147)				
P312	64	F	60	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.2790_2791del	p.(Glu931Glyfs*147)				
P313	36	F	30	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.2790_2791del	p.(Glu931Glyfs*147)				
P314	49	M	12	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.2501_2502del	p.(Glu834Glyfs*244)				
P315	46	M	10	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.2501_2502del	p.(Glu834Glyfs*244)				
P316	46	M	8	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RPGR	NM_001034853.2	XL	c.2501_2502del	p.(Glu834Glyfs*244)				

				Allele 1			Allele 2		
ID	Age	Gender	AO	Famihx	Clinical diagnosis	Proband case	Gene	Transcript	Inh. pattern
				cDNA			protein change		
				cDNA			protein change		
P317	60	M	35	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RGR	NM_001034853.2	XL
P318	71	M	10	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RGR	NM_001034853.2	XL
P319	31	M	25	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RGR	NM_001034853.2	XL
P320	50	F	43	Yes	Cone dystrophy	Yes	RGR	NM_001034853.2	XL
P321	31	M	5	Yes	Cone dystrophy	Yes	RGR	NM_001034853.2	XL
P322	29	M	12	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	RGR	NM_001034853.2	XL
P323	71	F	10	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	RGR	NM_001034853.2	XL
P324	51	F	4	No	Leber congenital amaurosis	Yes	RGRP1	NM_020366.4	AR
P325	20	M	1	No	X-linked congenital retinoschisis	Yes	RS1	NM_000330.4	XL
P326	27	M	5	No	X-linked congenital retinoschisis	Yes	RS1	NM_000330.4	XL
P327	25	M	8	Yes	X-linked congenital retinoschisis	Yes	RS1	NM_000330.4	XL
P328	21	M	4	No	X-linked congenital retinoschisis	Yes	RS1	NM_000330.4	XL
P329	49	M	40	No	X-linked congenital retinoschisis	Yes	RS1	NM_000330.4	XL
P330	27	M	20	No	X-linked congenital retinoschisis	Yes	RS1	NM_000330.4	XL
P331	77	M	70	Yes	X-linked congenital retinoschisis	Yes	RS1	NM_000330.4	XL
P332	56	M	12	Yes	X-linked congenital retinoschisis	No	RS1	NM_000330.4	XL
P333	54	M	9	Yes	X-linked congenital retinoschisis	Yes	RS1	NM_000330.4	XL
P334	21	M	5	No	X-linked congenital retinoschisis	Yes	RS1	NM_000330.4	XL
P335	54	M	50	Yes	X-linked congenital retinoschisis	Yes	RS1	NM_000330.4	XL
P336	49	F	20	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	SRNP200	NM_014014.4	AD
P337	45	F	45	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	SRNP200	NM_014014.4	AD
P338	20	M	10	Yes	Leber congenital amaurosis	Yes	SPATA7	NM_008418.5	AR
P339	55	F	45	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	TOPOB5	NM_005802.5	AD
P340	53	M	20	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	TOPOB5	NM_005802.5	AD
P341	24	F	11	No	Bardet-Biedl syndrome	Yes	TTCS	NM_144596.4	AR
P342	21	F	5	Yes	Leber congenital amaurosis	Yes	TTCS	NM_144596.4	AR
P343	70	F	35	No	Foveal hypoplasia	Yes	TYR	NM_000372.5	AR
P344	19	M	17	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P345	50	F	47	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P346	57	F	40	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P347	74	F	45	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P348	54	F	5	Yes	Usher syndrome	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P349	34	F	10	No	Usher syndrome	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P350	63	M	10	No	Usher syndrome	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P351	53	M	30	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P352	65	F	20	No	Usher syndrome	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P353	53	M	48	No	Usher syndrome	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P354	69	F	20	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P355	26	M	15	No	Usher syndrome	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P356	26	F	5	No	Usher syndrome	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P357	60	M	50	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P358	49	M	1	Yes	Usher syndrome	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P359	52	M	18	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P360	60	M	25	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P361	71	F	20	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	No	USH2A	NM_206933.4	AR
P362	42	M	1	No	Usher syndrome	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P363	49	F	45	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P364	48	M	25	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P365	60	F	10	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P366	36	F	34	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P367	70	F	52	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P368	54	M	30	No	Usher syndrome	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P369	71	M	14	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR

				Allele 1			Allele 2		
ID	Age	Gender	AO	Famihx	Clinical diagnosis	Proband case	Gene	Transcript	Inh. pattern
				cDNA			protein change		
				cDNA			protein change		
P370	73	F	25	Yes	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P371	34	M	2	No	Usher syndrome	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P372	30	F	29	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P373	48	F	2	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P374	51	M	46	No	Nonsyndromic retinitis pigmentosa	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P375	20	F	7	No	Usher syndrome	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR
P376	16	M	5	No	Usher syndrome	Yes	USH2A	NM_206933.4	AR



DISCUSSIÓ 10

10.1. Context i importància del diagnòstic genètic en les DHR

Les DHR són malalties minoritàries, progressives i altament heterogènies que provoquen una pèrdua visual greu amb un impacte funcional i psicosocial considerable (27). Malgrat l'aprovació d'una primera teràpia gènica i el desenvolupament d'assajos clínics prometedors, la majoria dels pacients encara no disposen d'opcions curatives. A més, les estratègies terapèutiques existents o en curs depenen sobretot del gen causal implicat (18).

En aquest context, el diagnòstic genètic esdevé l'eix central de la medicina de precisió. L'alteració molecular responsable permet completar el diagnòstic clínic, afinar el pronòstic, orientar l'assessorament familiar i reproductiu, i garantir l'accés tant a estudis clínics com a teràpies dirigides (20,82,101). Així, la informació genètica es consolida com un pilar fonamental en la presa de decisions assistencials, reproductives i terapèutiques (3).

Tanmateix, assolir un diagnòstic molecular continua sent un repte en un percentatge significatiu de casos. L'elevat nombre de gens implicats, la varietat de mecanismes patogènics i les correlacions genotip-fenotip encara incompletes s'afegeixen a limitacions tècniques i a un coneixement parcial de la fisiopatologia de les DHR (27). Davant d'aquesta complexitat, calen estratègies diagnòstiques dinàmiques, que superin els enfocaments lineals i estandarditzats.

Aquesta tesi proposa i valida un model integrador que combina coneixement clínic, anàlisi genòmica avançada i estudis funcionals amb

l'objectiu d'assolir diagnòstics moleculars de valor real en la pràctica mèdica. El model posa l'accent en l'eficiència i la contextualització clínica, i defineix un marc escalable i transferible a altres entorns especialitzats.

10.2. Implementació d'un nou algoritme i resultats globals

L'aplicació d'un algoritme seqüencial, flexible i centrat en el pacient ha demostrat ser altament eficaç per millorar el rendiment diagnòstic en casos no resolts després d'una primera anàlisi amb WES. A diferència d'enfocaments que opten per repetir estudis amb tecnologies més costoses —com el WGS— sense una estratificació prèvia, aquest model aposta per reaprofitar les dades genòmiques disponibles amb una mirada crítica i actualitzada, integrant informació genètica, fenotípica i funcional (89).

L'estratègia es basa en una revisió estructurada i iterativa de les dades prèvies —WES i panells virtuals— articulada en dues etapes principals: (i) la reavaluació de variants segons criteris ACMG/AMP actualitzats i nova evidència (funcional, poblacional i familiar), i (ii) l'actualització dels panells virtuals, transcrits de referència i *pipelines* bioinformàtics. Aquest procés evita una lectura rígida de les dades i permet recuperar variants prèviament descartades per limitacions tècniques o de coneixement, sovint infravalorades en entorns clínics.

L'enfocament dual de revisió i reinterpretació s'ha mostrat no només efectiu, sinó també eficient i sostenible: optimitza recursos,

redueix la necessitat de repetir proves i fomenta una pràctica diagnòstica fonamentada en l'actualització constant. Tanmateix, la seva implementació requereix temps, expertesa i accés a eines bioinformàtiques avançades, factors que poden limitar-ne l'aplicació sistemàtica en entorns amb menys recursos (43,60). Malgrat això, el model és transferible i escalable, i ofereix un marc potencialment aplicable a altres malalties genètiques complexes.

Els resultats obtinguts en aquesta tesi n'avalen la utilitat. El rendiment inicial amb WES i panell virtual va ser del 59,6%, en línia amb la bibliografia que consolida aquest enfocament com a primera línia robusta en DHR (48). En la subcohort no resolta (n=101), l'aplicació del model va permetre identificar 49 nous diagnòstics (48,5%) i elevar el rendiment global al 67,6%, amb un increment relatiu del 13,4% (Figura 17). Aquest guany supera els increments habituals (<10%) associats a estratègies massives de reseqüenciació sense estratificació clínica, les quals sovint generen una elevada càrrega de VUS i una relació cost-benefici discutible (102–104).

Aquests resultats qüestionen la tendència a recórrer de manera indiscriminada a tecnologies emergents davant de casos no resolts, i posen de manifest que la millora del rendiment diagnòstic no depèn només de l'adopció de noves plataformes, sinó de la capacitat d'analitzar, reinterpretar i contextualitzar les dades existents. El model desenvolupat en aquest treball exemplifica com una revisió experta i iterativa pot transformar informació prèvia en diagnòstics clínicament útils, amb un impacte directe en l'atenció i la planificació mèdica.

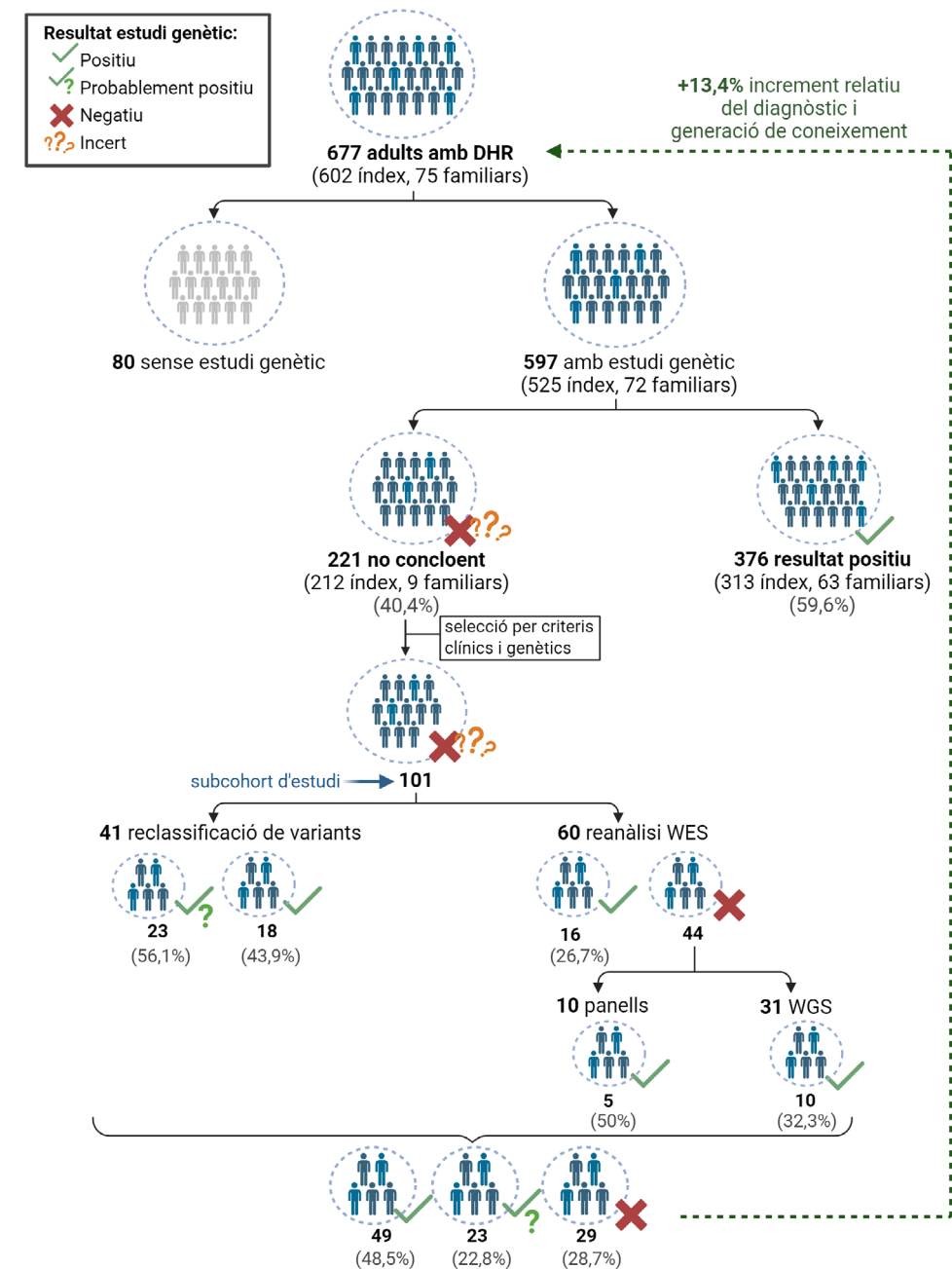


Figura 17. Flux seqüencial del diagnòstic molecular en una cohort de 677 adults amb DHR. L'aplicació del model desenvolupat en aquesta tesi a la subcohort de 101 casos no resolts va aportar 49 nous diagnòstics, amb un increment relatiu del rendiment del 13,4%. *Figura original.*

10.3. Reptes del diagnòstic molecular

Tot i els avenços en les tècniques de seqüenciació i en el coneixement genètic, aquesta tesi constata que el diagnòstic molecular de les DHR continua limitat per factors interpretatius i tècnics que afecten tant la classificació de variants com la seva detecció. L'anàlisi crítica d'aquests reptes, centrada especialment en la gestió de les VUS i en les limitacions dels *pipelines* bioinformàtics, ha permès identificar estratègies innovadores per superar-los, optimitzar els recursos disponibles i augmentar l'impacte clínic dels resultats genètics.

10.3.1. Gestió de variants de significat clínic incert

Aquesta tesi ha posat de manifest que la interpretació de variants genètiques és un dels principals reptes del diagnòstic molecular de les DHR. L'elevada heterogeneïtat genètica, la baixa prevalença i la manca d'evidència funcional per a molts gens en dificulten la classificació robusta, fet que limita l'aplicació estricta de les guies ACMG/AMP (56,95) i genera una elevada proporció de resultats no concloents. Segons la literatura, fins a un 40–50% dels pacients reben informes amb VUS (105), la qual cosa repercuteix directament en l'assessorament genètic, la presa de decisions reproductives i l'accés a teràpies dirigides.

Els casos d'aquesta tesi i estudis recents mostren que l'aplicació rígida de criteris com BA1 o PVS1 pot conduir a interpretacions errònies, especialment en gens complexos com *ABCA4* (106,107), on alguns al·lels hipomòrfics presenten freqüències elevades però són patogènics en contextos específics (56). Variants inicialment

descartades, com p.(Asn1868Ile) o c.4253+43G>A, es van confirmar després de la reanàlisi com a P en *trans* amb variants severes (106). De manera similar, dades poblacionals i fenotípiques representatives han permès reclassificar variants com *CNGB1* c.1644-3C>G i *RPE65* p.(Phe83Leu) i p.(Gly187Glu) (108). Aquestes experiències evidencien que l'aplicació flexible dels criteris, juntament amb la disponibilitat de cohorts locals i ben caracteritzades, és clau per evitar biaixos i optimitzar la fiabilitat del diagnòstic (31).

La determinació de fase és un altre element crític per a la gestió de VUS en malalties recessives (109). Aquesta tesi ha identificat tres escenaris recurrents: (i) pacients amb una variant LP/P i una VUS reclassificable en confirmar la disposició en *trans*; (ii) casos amb variants aparentment concordants però en *cis*, que ocultaven una tercera variant intrònica profunda (p. ex., *ABCA4*) (56); i (iii) pacients amb una única variant LP/P en *ABCA4* que eren realment portadors d'una alteració causal en un altre gen (110). Aquests casos exemplifiquen que la segregació familiar i, cada cop més, l'ús de tecnologies emergents com el *long-read sequencing* són eines decisives no només per confirmar la fase al·lèlica, sinó també per evitar diagnòstics erròniament “resolts” (109).

Els estudis funcionals han resultat determinants en aquells casos on les prediccions *in silico* no han estat suficients per establir la patogenicitat d'una variant. En aquesta tesi, l'anàlisi d'ARN va confirmar alteracions d'*splicing* (*ATF6* c.160-8A>G), mentre que l'ús de cèl·lules ciliars nasals va permetre detectar defectes en gens amb baixa expressió en sang (*REEP6* c.349-4G>T). A més, els assajos amb

minigens i midigens van validar variants situades fora dels llocs canònics d'*splicing* (*ABCA4* c.859-442C>T i *TULP1* c.822G>T) (111,112). Aquestes estratègies han transformat diagnòstics parcials en casos resolts i han evidenciat el paper clau de la validació funcional per millorar la precisió diagnòstica.

Tanmateix, el seu ús generalitzat és limitat pel cost, la complexitat i l'expressió sistèmica reduïda de molts gens retinals (105). Aquestes restriccions reforcen la importància d'eines computacionals avançades, com els *pipelines* de Iancu et al. (2021) (113) i Fernández-Suárez et al. (2025) (114), que integren correlació genotip-fenotip, segregació i prediccions *in silico* per reduir la incertesa en absència de dades experimentals. Aquestes aproximacions apunten cap a un futur on la intel·ligència artificial complementi els assajos funcionals i en multipliqui el valor clínic.

En síntesi, la gestió de VUS en DHR requereix un enfocament flexible que combini (i) aplicació crítica dels criteris ACMG/AMP, (ii) determinació de fase al·lèlica (iii) validació funcional i/o (iv) eines computacionals i *pipelines* predictius. Aquest enfocament, alineat amb les recomanacions de Finnegan et al. (2025) (105), demostra que la incertesa diagnòstica pot esdevenir una oportunitat per innovar metodologies, enriquir el coneixement translacional i millorar la presa de decisions per a pacients i famílies.

10.3.2. Limitacions tècniques i bioinformàtiques

Més enllà de la interpretació, el diagnòstic genètic de les DHR continua fortament condicionat per limitacions tècniques i bioinformàtiques que en dificulten la identificació precisa de la causa molecular. Entre les més rellevants destaquen les diferències entre *pipelines* analítics, la dependència de transcrits de referència, la cobertura incompleta o irregular de regions crítiques —com introns o el domini ORF15 de *RPGR*— i els reptes associats a la detecció de SV. Aquests factors comprometen la sensibilitat i la fiabilitat dels resultats (115–120).

L'experiència d'aquesta tesi mostra que la reanàlisi crítica i l'actualització periòdica dels panells virtuals tenen un impacte diagnòstic directe. Variants inicialment no detectades —com en *CERKL* després de revisar el transcrit de referència— o diagnòstics aparentment no sindròmics, reclassificats en incorporar gens exclosos inicialment (p. ex., *NPHP4*), il·lustren el valor d'aquest enfocament. La detecció d'una deleció parcial en *PDE6B*, possible només després d'optimitzar el cribratge de CNVs i revisar manualment les lectures, subratlla com els *pipelines* poden condicionar significativament la fiabilitat dels resultats (48,120).

Eines de priorització fenotípica com l'*Human Phenotype Ontology* (HPO) (121) han estat igualment útils per orientar el diagnòstic en casos amb sospita sindròmica, facilitant la identificació de gens com *HK1* o *RPGRIP1*. Aquest treball confirma que una reanàlisi selectiva guiada per informació fenotípica pot superar els guanys diagnòstics del

15–20% descrits en altres estudis (122,123), reforçant la necessitat d'una aplicació crítica i contextualitzada (100).

L'ús d'un panell amb cobertura reforçada a ORF15 il·lustra clarament el potencial d'aquest enfocament. En un pacient amb sospita inicial de RP recessiva, atribuïda a la presència d'una variant en *ABCA4*, la revisió fenotípica —amb identificació d'estafiloma posterior, miopia i altres troballes— va reorientar el diagnòstic cap a *RPGR* (Figura 18). Tot i que inicialment no s'havien detectat variants en aquest gen, l'anàlisi manual de la regió ORF15 —interpretant zones amb cobertura limitada— amb el panell de disseny específic va permetre identificar retrospectivament una deleció en hemizigosi (c.2527del), confirmada posteriorment per seqüenciació Sanger.

Finalment, el WGS s'ha mostrat essencial per detectar variants intròniques profundes i SVs, confirmant afectació bial·lèlica en *ABCA4* i *USH2A*, revelant una deleció homozigota en *NPHP1* i una deleció parcial de l'exó 6 en *ABCA4* (c.699_768+341del) que havien escapat al WES. Tot i que el seu guany addicional és limitat en cohorts exhaustivament analitzades (124), els resultats d'aquesta tesi i la literatura (89,102,116) demostren que el WGS assoleix la seva màxima utilitat quan s'aplica de manera selectiva dins d'un model escalonat.

En conjunt, aquest treball demostra que una gestió estratègica de les limitacions tècniques i interpretatives, mitjançant reanàlisi crítica, panells personalitzats i WGS selectiu, pot transformar obstacles estructurals en oportunitats per millorar l'eficiència diagnòstica i generar un impacte clínic tangible, tant en el maneig oftalmològic com en la prevenció de complicacions sistèmiques.

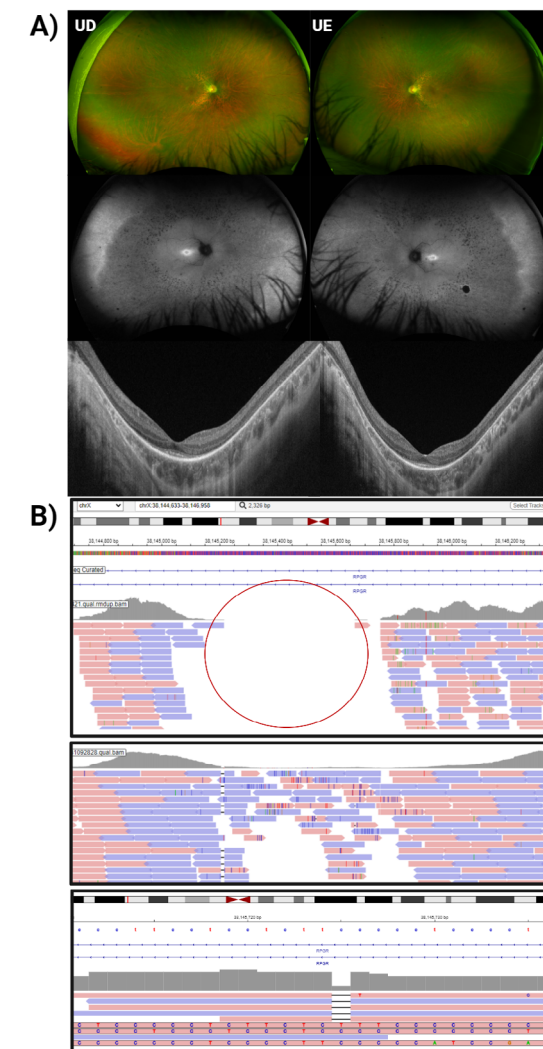


Figura 18. Identificació d'una variant patogènica en *RPGR* mitjançant panell personalitzat. A) Imatges multimodals: retinografia d'ultra camp i FAF mostrant atròfia coriorretiniana perifoveal i OCT macular amb disrupció de les capes externes fora de la fòvea i estafiloma posterior. UD: ull dret; UE: ull esquerre. B) Panell superior: visualització en IGV de la regió ORF15 amb cobertura insuficient per absència de sondes (cercle vermell). Panell central: cobertura optimitzada amb el panell personalitzat. Panell inferior: IGV de la deleció en hemizigosi (*RPGR*:c.2527del). *Figura original.*

10.4. Coneixement generat més enllà del diagnòstic

L'anàlisi detallada de diversos casos d'aquesta tesi ha generat informació que transcendeix l'objectiu inicial d'obtenir un diagnòstic, aportant noves dades sobre la patogènesi de les DHR. Algunes d'aquestes observacions han permès afinar la correlació genotip-fenotip, mentre que d'altres han posat de manifest gens amb evidència emergent de patogenicitat, ampliant el coneixement clínic i molecular disponible.

10.4.1. Correlació genotip-fenotip

La correlació genotip-fenotip en les DHR rarament és lineal o previsible. Gens associats històricament a un fenotip concret poden donar lloc a presentacions clíniques diverses, modulades per la combinació al·lèlica, mecanismes moleculars i factors genètics, epigenètics i ambientals (125).

Diversos casos d'aquesta tesi exemplifiquen aquesta complexitat. En *CEP290*, dos germans amb la mateixa combinació bial·lèlica mostraven trajectòries molt diferents: una mantenia una AV funcional a l'edat adulta, mentre que l'altre presentava pèrdua visual greu i precoç (126). Casos similars han estat descrits en pacients homozigots per *USH2A* p.(Trp3955Ter) amb edats d'inici que oscil·len entre els 4 i els 42 anys i graus de degeneració variables (46,127), fet que apunta al paper de modificadors. En el nostre cas, el germà amb fenotip més greu presentava variants addicionals en gens funcionalment relacionats

amb *CEP290* (*AHI1*, *RPGRIP1L*, *CC2D2A*), reforçant la hipòtesi que la càrrega genètica global pot influir en la severitat clínica. També s'ha plantejat que mecanismes posttranscripcionals, com el NMD, el *nonsense-associated altered splicing* o el *basal exon skipping*, poden permetre una expressió residual de proteïna i modular el fenotip (128).

En *TULP1*, les variants bial·lèliques mostren una heterogeneïtat fenotípica destacable, amb casos que van des de formes greus i d'inici precoç fins a presentacions atípiques, com la maculopatia amb pigmentació perivascular documentada en aquesta tesi (111,129,130). El nostre cas, amb una variant d'*splicing* en *trans* amb una *missense* al domini *Tubby*, il·lustra la variabilitat intragènica i els límits dels models predictius. La influència potencial de modificadors genètics, com *MAP1A* en models murins (131), apunta a una arquitectura poligènica complexa.

Altres exemples reforcen aquesta visió multifacètica. En *ABCA4* i *USH2A*, la combinació d'un al·lel hipomòrfic amb un altre patogènic pot donar lloc a fenotips intermedis difícils de classificar (42). La coexistència de variants patogèniques en més d'un gen, com *ABCA4* i *CNGB3*, pot originar fenotips combinats per digenisme o sinergisme patogènic (73). A més, estudis recents suggereixen que fins i tot factors sistèmics, com el sexe biològic, poden contribuir a l'expressivitat clínica d'algunes DHR (132).

Aquests exemples evidencien que la correlació genotip-fenotip en les DHR és multidimensional —al·lèlic, gènic, intergènic i sistèmic— i que una interpretació acurada requereix integrar informació genètica,

funcional i clínica per aconseguir un impacte diagnòstic i terapèutic real.

10.4.2. Evidència emergent de gens candidats

Més enllà de la variabilitat genotip-fenotip observada en gens àmpliament validats, un repte persistent en el diagnòstic de les DHR és la identificació i validació de nous gens candidats. L'ampliació del catàleg de gens associats és, en principi, essencial per resoldre pacients no diagnosticats, especialment en cohorts àmplies i clínicament ben caracteritzades (133). Tot i així, la major part dels diagnòstics es concentra en un nombre reduït de gens recurrents —com *ABCA4*, *USH2A*, *EYS*, *RPGR* o *RS1*—, mentre que els gens emergents representen una fracció minoritària però potencialment rellevant de casos.

Una part d'aquests candidats s'ha proposat a partir d'anàlisis d'enriquiment de variants rares en cohorts de pacients, com l'estudi de Carss et al. (2017) (134), que va identificar 19 gens fins aleshores no associats a DHR, entre ells *CROCC*, *IRX5* i *NUMB*, relacionats amb processos clau com la ciliogènesi, el desenvolupament neuroretinià o la polaritat cel·lular. Tot i la seva plausibilitat biològica, la majoria encara no han estat replicats en cohorts independents ni incorporats a marcs de validació estandarditzats com ClinGen, cosa que limita la seva aplicabilitat clínica actual.

Altres candidats compten amb evidència experimental en models animals, com *TLCD3B* o *UBAP1L*, la pèrdua de funció dels quals provoca fenotips retinals en ratolins i en peix zebra (135,136). Tot i això, la

translació d'aquests resultats al context humà és encara preliminar i requereix una validació genètica i funcional sòlida en poblacions independents.

Un tercer grup correspon a gens amb un interès translacional més immediat, com *THRB*. Clàssicament associat a resistència a hormones tiroïdals, aquest gen s'ha vinculat recentment a fenotips oculars sense afectació sistèmica, amb variants patogèniques en heterozigosi que segreguen en famílies amb distròfia macular i miopia alta (137,138). Aquest exemple il·lustra com gens ben caracteritzats en altres sistemes fisiològics poden adquirir un paper inesperat en la retina i obrir noves hipòtesis patogèniques.

Els gens mitocondrials també mereixen consideració. Tot i la seva baixa prevalença, variants en *MT-ATP6* o *MT-TL1* s'han associat a atròfia òptica, RP i distròfia macular (45). No obstant això, en cohorts àmplies, com la de 677 adults inclosa en aquest estudi, només tres casos presentaven alteracions mitocondrials, fet que confirma que, tot i formar part de protocols diagnòstics integrals, la seva contribució al rendiment global és marginal.

En la cohort d'aquesta tesi no s'han identificat variants en gens candidats, probablement com a conseqüència de l'ús d'un panell virtual extens i d'una taxa de resolució elevada pròpia d'un centre d'alta especialització. Aquest resultat reforça que els gens emergents, tot i el seu potencial científic, expliquen actualment un percentatge ínfim de casos. Tanmateix, representen una font d'informació valuosa per ampliar la comprensió dels mecanismes moleculars i explorar noves vies de diagnòstic i recerca translacional.

En conseqüència, l'estratègia més adequada és mantenir una vigilància crítica sobre aquests gens, incorporar-los progressivament als panells virtuals només quan existeixi evidència sòlida, i participar en iniciatives de col·laboració internacional que permetin validar o descartar candidats de manera definitiva. Aquest enfocament, alineat amb el model seqüencial i adaptatiu d'aquesta tesi, afavoreix actualitzacions dinàmiques i reanàlisis guiades pel context clínic, maximitzant el rendiment diagnòstic i la generació de coneixement.

10.5. Implicacions clíniques, limitacions i perspectives futures

Els resultats d'aquesta tesi consoliden el diagnòstic molecular com una eina clínica central en les DHR, amb implicacions directes en el seguiment assistencial, l'accés a assajos clínics —com LUNA i HYPERION (139,140)— i la planificació reproductiva, incloent-hi el DGP. Aquest impacte clínic tangible reforça que la utilitat del diagnòstic genètic no depèn tant de la tecnologia emprada sinó com de la capacitat d'integrar i reinterpretar dades genètiques, clíniques i funcionals en un marc iteratiu i contextualitzat (124).

Tanmateix, aquest model també presenta limitacions estructurals i metodològiques. La dependència d'expertesa especialitzada, l'ús de panells virtuals restringits a gens validats i la filtració bioinformàtica estricta poden excloure mecanismes no convencionals, com el digenisme, les variants reguladores o l'herència mitocondrial. A més, el

predomini d'una cohort adulta pot haver limitat la detecció de formes sindròmiques d'inici precoç.

En paral·lel, els resultats obtinguts i la literatura actual suggereixen línies de millora clares: reanàlisi sistemàtica (cada 18–24 mesos), ús selectiu del WGS, circuits formals de revisió multidisciplinària i derivació estructurada a estudis funcionals o assajos clínics (62,114,141). Tecnologies emergents —com el *long-read sequencing*, els organoides retinals i la intel·ligència artificial— poden jugar un paper clau en pacients no resolts o amb VUS, tot reforçant l'enfocament personalitzat i translacional (142,143).

Un altre repte emergent és superar el paradigma monogènic clàssic. La variabilitat fenotípica observada en les DHR apunta cap a una arquitectura més complexa, influïda per variants modificadores, interaccions oligogèniques i factors ambientals. L'estudi sistemàtic d'aquests mecanismes requerirà iniciatives col·laboratives, bases de dades compartides, harmonització fenotípica mitjançant codis HPO refinats i reanàlisis iteratives alineades amb l'evidència emergent (105,109,144).

L'experiència d'aquesta tesi també demostra la transferibilitat del model a altres centres especialitzats, sempre que hi hagi infraestructura multidisciplinària i capacitat d'interpretació experta. El protocol proposat (Figura 19), basat en un panell inicial de 302 gens amb evidència moderada o forta i en la presa de decisions consensuada, permet una aplicació escalonada i adaptable a entorns clínics diversos.

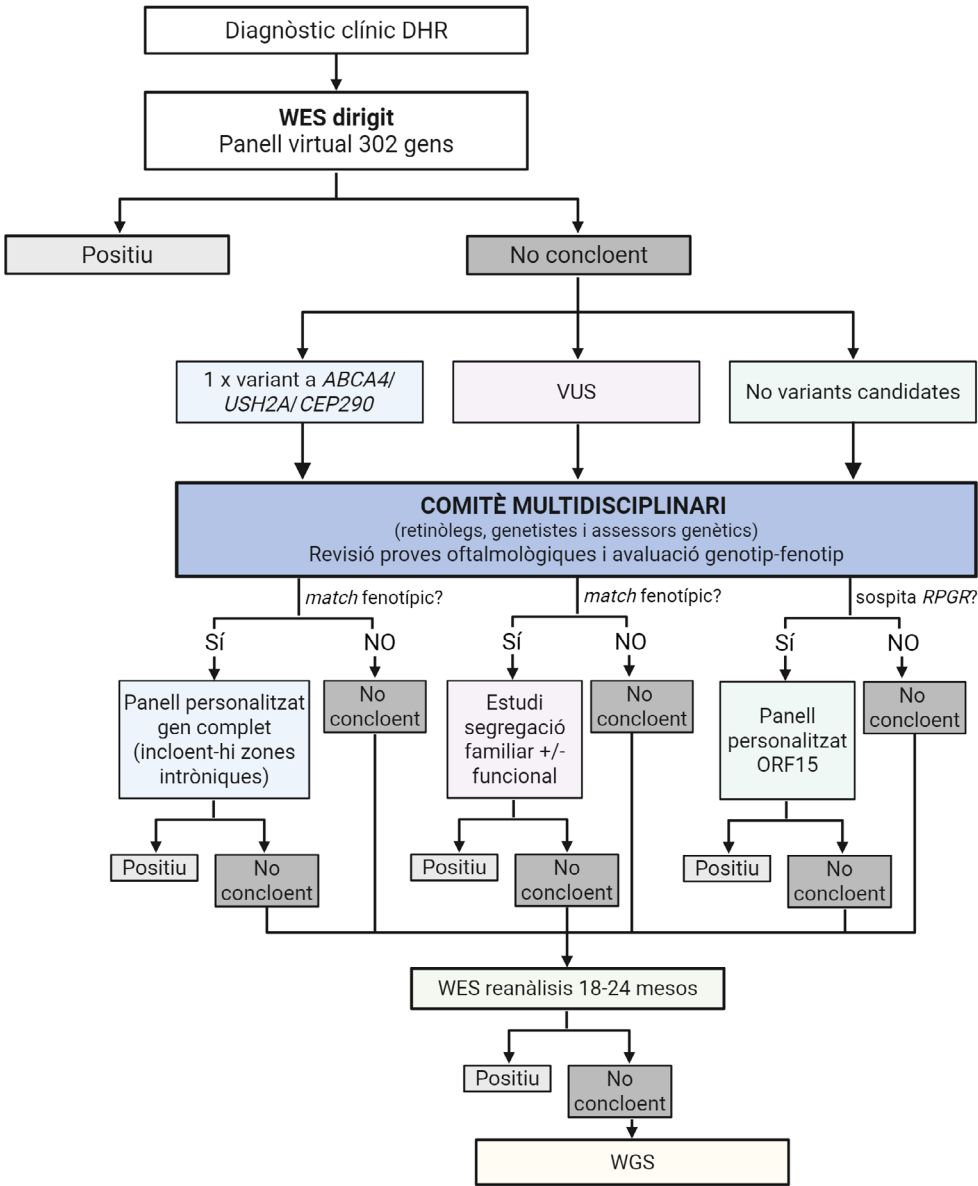


Figura 19. Diagrama de flux de l’algoritme diagnòstic personalitzat segons el resultat i les accions consegüents. Figura original.

Per gestionar la incertesa, aquest model incorpora dues categories internes intermèdies —complementàries a la classificació

ACMG/AMP—: “VUS en revisió/pendent de validació”, que agrupa variants prioritzades per completar estudis de fase, funció o freqüència, i “gen d’interès per a la cohort”, que identifica gens amb evidència preliminar rellevant en una població específica. Aquesta darrera categoria ha permès incloure i monitoritzar *THRB*, reportat en sèries espanyoles de DHR però encara absent en moltes guies de diagnòstic (137,138). Totes dues categories disposen de criteris de sortida i traçabilitat a través de comitès de revisió, en línia amb propostes recents que defensen classificacions dinàmiques i circuits de reanàlisi iterativa (56,114,145).

En síntesi, aquesta tesi demostra que l’èxit del diagnòstic genètic no depèn només de la incorporació de noves tecnologies, sinó de la qualitat de la integració clínica i de la capacitat de traduir les dades en decisions amb impacte real. És en aquest punt on la medicina genòmica adquireix la seva màxima dimensió: com a eina col·laborativa, centrada en el pacient i transformadora del model assistencial en malalties minoritàries.



CONCLUSIONS



1. El diagnòstic genètic és una eina essencial en el maneig clínic de les distròfies hereditàries de la retina, ja que identifica la causa molecular subjacent i orienta el pronòstic, l'assessorament genètic i l'accés a opcions terapèutiques emergents.
2. Un model diagnòstic seqüencial, flexible i adaptatiu, que integri coneixement clínic, anàlisi genòmica avançada i tècniques funcionals, incrementa significativament el rendiment diagnòstic en aquestes malalties.
3. La reavaluació crítica de les dades genòmiques, juntament amb l'actualització constant dels criteris interpretatius, permet transformar troballes incertes en diagnòstics clínicament útils.
4. La resolució de casos complexos sovint requereix una aproximació personalitzada que combini eines complementàries, com l'anàlisi funcional de variants, l'estudi de la fase al·lèlica i la seqüenciació genòmica completa.
5. El coneixement expert i la col·laboració multidisciplinària són fonamentals per a la interpretació de variants, especialment en contextos amb elevada heterogeneïtat genètica o fenotípica.
6. La correlació genotip-fenotip és complexa i pot estar modulada per factors com la configuració al·lèlica, mecanismes posttranscripcionals o la presència de modificadors genètics.
7. L'anàlisi funcional, aplicada de manera selectiva i guiada pel context clínic, és determinant per confirmar l'efecte patogènic de variants d'alteració de l'*splicing* i validar diagnòstics moleculars en casos amb informació genètica incompleta.
8. L'avaluació de gens amb evidència emergent de patogenicitat contribueix a expandir el coneixement molecular d'aquestes malalties i estableix les bases per millorar el diagnòstic en casos encara no resolts.
9. El model diagnòstic desenvolupat en aquest treball és transferible a altres entorns clínics sempre que es disposi d'una estructura interdisciplinària i d'un sistema de revisió contínua del coneixement.
10. L'aplicació clínica de la genètica en aquest grup de patologies ha de basar-se en un procés dinàmic, integrador i centrat en el pacient, capaç de generar coneixement útil, sostenible i amb projecció translacional.



BIBLIOGRAFIA

12

1. Hutmacher F. Why Is There So Much More Research on Vision Than on Any Other Sensory Modality? *Front Psychol.* 2019 Oct 4;10:2246.
2. Langlo CS, Amin A, Park SS. Optical coherence tomography retinal imaging: narrative review of technological advancements and clinical applications. *Ann Transl Med.* 2025 Apr 30;13(2):17.
3. Ng QX, Tang ASP, Chan KE, Chan HW, Howard N, Koh GCH. Lived experiences of patients, families and caregivers affected by inherited retinal diseases: A qualitative systematic review. *Disabil Health J.* 2025; Jul 18(3):101826.
4. Kolb H. How the Retina Works. *Am Sci.* 2003;91(1):28–35.
5. Manley A, Meshkat BI, Jablonski MM, Hollingsworth TJ. Cellular and Molecular Mechanisms of Pathogenesis Underlying Inherited Retinal Dystrophies. *Biomolecules.* 2023 Feb 1;13(2):271.
6. Zhang SX, Wang JJ, Starr CR, Lee EJ, Park KS, Zhylkibayev A, et al. The endoplasmic reticulum: Homeostasis and crosstalk in retinal health and disease. *Prog Retin Eye Res.* 2024 Jan;98:101231.
7. West ER, Lapan SW, Lee C, Kajderowicz KM, Li X, Cepko CL. Spatiotemporal patterns of neuronal subtype genesis suggest hierarchical development of retinal diversity. *Cell Rep.* 2022 Jan;38(1):110191.
8. Curcio CA, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson AE. Human photoreceptor topography. *J Comp Neurol.* 1990 Feb 22;292(4):497–523.
9. Provis JM, Dubis AM, Maddess T, Carroll J. Adaptation of the central retina for high acuity vision: Cones, the fovea and the avascular zone. *Prog Retin Eye Res.* 2013 Jul;35:63–81.
10. Pearing JN, Salinas RY, Baker SA, Arshavsky VY. Protein sorting, targeting and trafficking in photoreceptor cells. *Prog Retin Eye Res.* 2013 Sep;36:24–51.
11. Wong WM, Mahroo OA. Monogenic Retinal Diseases Associated With Genes Encoding Phototransduction Proteins: A Review. *Clin Exp Ophthalmol.* 2025 Apr 27;53(3):260–80.
12. Wang JS, Kefalov VJ. The Cone-specific visual cycle. *Prog Retin Eye Res.* 2011 Mar;30(2):115–28.
13. Klapper SD, Swiersy A, Bamberg E, Busskamp V. Biophysical Properties of Optogenetic Tools and Their Application for Vision Restoration Approaches. *Front Syst Neurosci.* 2016 Sep 2;10:74.
14. Pan WW, Wubben TJ, Besirli CG. Photoreceptor metabolic reprogramming: current understanding and therapeutic implications. *Commun Biol.* 2021 Feb 24;4(1):245.
15. Boya P, Codogno P. Recycling in sight. *Nature.* 2013 Sep 4;501(7465):40–2.
16. Nebbioso M, Artico M, Gharbiya M, Mannocci A, Limoli PG, Iannetta D, et al. State of the Art on Inherited Retinal Dystrophies: Management and Molecular Genetics. *J Clin Med.* 2025 May 18;14(10):3526.
17. Hanany M, Rivolta C, Sharon D. Worldwide carrier frequency and genetic prevalence of autosomal recessive inherited retinal diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020 Feb 4;117(5):2710–6.
18. Gómez-Escribano AP, García-García G, Pérez-Santamarina E, Aller-Mañas E, Vázquez-Manrique RP, Millán-Salvador JM. Innovative therapies for inherited retinal dystrophies: navigating DNA, RNA, and protein approaches. *EBioMedicine.* 2025 Jun;116:105751.
19. Rodríguez-Muñoz A, Aller E, Jaijo T, González-García E, Cabrera-Peset A, Gallego-Pinazo R, et al. Expanding the Clinical and Molecular Heterogeneity of Nonsyndromic Inherited Retinal Dystrophies. *J Mol Diagn.* 2020 Apr;22(4):532–43.
20. Murro V, Banfi S, Testa F, Iarossi G, Falsini B, Sodi A, et al. A multidisciplinary approach to inherited retinal dystrophies from diagnosis to initial care: a narrative review with inputs from clinical practice. *Orphanet J Rare Dis.* 2023 Jul 31;18(1):223.
21. Ullah M, Rehman AU, Quinodoz M, Rashid A, Cancellieri F, Munir A, et al. A comprehensive genetic landscape of inherited retinal diseases in a large Pakistani cohort. *NPJ Genom Med.* 2025 Apr 4;10(1):31.
22. Tawfik CA, Roshdy MM, Morris NM. Prevalence of inherited retinal diseases in a large Egyptian cohort. *BMC Ophthalmol.* 2023 Oct 20;23(1):422.
23. Griffith J, Sioufi K, Wilbanks L, Magrath GN, Say EAT, Lyons MJ, et al. Inherited Retinal Dystrophy in Southeastern United States: Characterization of South Carolina Patients and Comparative Literature Review. *Genes (Basel).* 2022 Aug 20;13(8):1490.

24. Stephenson KAJ, Dhanji SR, Kolawole OU, Gregory-Evans CY, Gregory-Evans K. Ethnic disparities in inherited retinal degenerations. *Can J Ophthalmol*. 2025 Jun 5:S0008-4182(25)00160-7.
25. Perea-Romero I, Gordo G, Iancu IF, Del Pozo-Valero M, Almoguera B, Blanco-Kelly F, et al. Genetic landscape of 6089 inherited retinal dystrophies affected cases in Spain and their therapeutic and extended epidemiological implications. *Sci Rep*. 2021 Jan 15;11(1):1526.
26. Chaumet-Riffaud AE, Chaumet-Riffaud P, Cariou A, Devisme C, Audo I, Sahel JA, et al. Impact of Retinitis Pigmentosa on Quality of Life, Mental Health, and Employment Among Young Adults. *Am J Ophthalmol*. 2017 May;177:169-74.
27. Britten-Jones AC, Schultz J, Mack HG, Kearns LS, Huq AJ, Ruddie JB, et al. Patient experiences and perceived value of genetic testing in inherited retinal diseases: a cross-sectional survey. *Sci Rep*. 2024 Mar 5;14(1):5403.
28. Duncan JL, Bowman A, Laster A, Gelfman C, Birch DG, Boye SE, et al. Inherited Retinal Degenerations and Non-Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Progress and Unmet Needs. *Transl Vis Sci Technol*. 2024 Dec 17;13(12):28.
29. Leroy BP, Birch DG, Duncan JL, Lam BL, Koenekoop RK, Porto FBO, et al. Leber Congenital Amaurosis due to CEP290 mutations-severe vision impairment with high unmet medical need. *Retina*. 2021 May;41(5):898-907.
30. Stone EM, Andorf JL, Whitmore SS, DeLuca AP, Giacalone JC, Streb LM, et al. Clinically Focused Molecular Investigation of 1000 Consecutive Families with Inherited Retinal Disease. *Ophthalmology*. 2017 Sep;124(9):1314-31.
31. Ellingford JM, Hufnagel RB, Arno G. Phenotype and Genotype Correlations in Inherited Retinal Diseases: Population-Guided Variant Interpretation, Variable Expressivity and Incomplete Penetrance. *Genes (Basel)*. 2020 Oct 29;11(11):1274.
32. Broadgate S, Yu J, Downes SM, Halford S. Unravelling the genetics of inherited retinal dystrophies: Past, present and future. *Prog Retin Eye Res*. 2017 Jul;59:53-96.
33. De Silva SR, Arno G, Robson AG, Fakin A, Pontikos N, Mohamed MD, et al. The X-linked retinopathies: Physiological insights, pathogenic mechanisms, phenotypic features and novel therapies. *Prog Retin Eye Res*. 2021 May;82:100898.
34. Verbakel SK, van Huet RAC, Boon CJF, den Hollander AI, Collin RWJ, Klaver CCW, et al. Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res*. 2018 Sep;66:157-86.
35. Georgiou M, Robson AG, Fujinami K, de Guimarões TAC, Fujinami-Yokokawa Y, Daich Varela M, et al. Phenotyping and genotyping inherited retinal diseases: Molecular genetics, clinical and imaging features, and therapeutics of macular dystrophies, cone and cone-rod dystrophies, rod-cone dystrophies, Leber congenital amaurosis, and cone dysfunction syndromes. *Prog Retin Eye Res*. 2024 May;100:101244.
36. Tsang SH, Sharma T. Atlas of Inherited Retinal Diseases. Tsang SH, Sharma T, editors. Vol. 1085. Cham: Springer International Publishing; 2018.
37. Bujakowska KM, Liu Q, Pierce EA. Photoreceptor Cilia and Retinal Ciliopathies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017 Oct;9(10):a028274.
38. Liu X, Pacwa A, Bresciani G, Swierczynska M, Dorecka M, Smedowski A. Retinal primary cilia and their dysfunction in retinal neurodegenerative diseases: beyond ciliopathies. *Mol Med*. 2024 Jul 26;30(1):109.
39. Vrabič N, Fakin A, Tekavčič Pompe M. Spectrum and frequencies of extraocular features reported in CEP290-associated ciliopathy – A systematic review. *J Fr Ophtalmol*. 2024 Oct;47(8):104232.
40. Estrada-Cuzcano A, Roepman R, Cremers FPM, den Hollander AI, Mans DA. Non-syndromic retinal ciliopathies: translating gene discovery into therapy. *Hum Mol Genet*. 2012 Oct 15;21(R1):R111-24.
41. Stephenson KAJ, Zhu J, Dockery A, Whelan L, Burke T, Turner J, et al. Clinical and Genetic Re-Evaluation of Inherited Retinal Degeneration Pedigrees following Initial Negative Findings on Panel-Based Next Generation Sequencing. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 17;23(2):995.
42. Cornelis SS, Runhart EH, Bauwens M, Corradi Z, De Baere E, Roosing S, et al. Personalized genetic counseling for Stargardt disease: Offspring risk estimates based on variant severity. *Am J Hum Genet*. 2022 Mar;109(3):498-507.

43. Méjécase C, Malka S, Guan Z, Slater A, Arno G, Moosajee M. Practical guide to genetic screening for inherited eye diseases. *Ther Adv Ophthalmol*. 2020 Jan 22;12:251584142095459.
44. Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandell DW, et al. A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature*. 1990 Jan;343(6256):364–6.
45. Neuhofer CM, Prokisch H. Digenic Inheritance in Rare Disorders and Mitochondrial Disease—Crossing the Frontier to a More Comprehensive Understanding of Etiology. *Int J Mol Sci*. 2024 Apr 23;25(9):4602.
46. Ford LM, Petersen-Jones SM. Modifiers and their impact on inherited retinal diseases: a review. *Ophthalmic Genet*. 2025 Jan 2;46(1):1–14.
47. Testa F, Bacci G, Falsini B, Iarossi G, Melillo P, Mucciolo DP, et al. Voretigene neparvovec for inherited retinal dystrophy due to RPE65 mutations: a scoping review of eligibility and treatment challenges from clinical trials to real practice. *Eye*. 2024 Sep 16;38(13):2504–15.
48. Britten-Jones AC, Gocuk SA, Goh KL, Huq A, Edwards TL, Ayton LN. The Diagnostic Yield of Next Generation Sequencing in Inherited Retinal Diseases: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Ophthalmol*. 2023 May;249:57–73.
49. Al-Khuzaei S, Broadgate S, Foster CR, Shah M, Yu J, Downes SM, et al. An Overview of the Genetics of ABCA4 Retinopathies, an Evolving Story. *Genes (Basel)*. 2021 Aug 13;12(8):1241.
50. Tan TE, Tang RWC, Chan CM, Mathur RS, Fenner BJ. Diagnostic Challenges in ABCA4-Associated Retinal Degeneration: One Gene, Many Phenotypes. *Diagnostics (Basel)*. 2023 Nov 25;13(23):3530.
51. Coppieters F, Lefever S, Leroy BP, De Baere E. CEP290, a gene with many faces: mutation overview and presentation of CEP290base. *Hum Mutat*. 2010 Aug 5;31(10):1097–108.
52. Gocuk SA, Edwards TL, Jolly JK, Chen FK, Sousa DC, McGuinness MB, et al. Retinal Disease Variability in Female Carriers of RPGR Variants Associated with Retinitis Pigmentosa: Clinical and Genetic Parameters. *Genes (Basel)*. 2025 Feb 13;16(2):221.
53. Lin S, Vermeirsch S, Pontikos N, Martin-Gutierrez MP, Daich Varela M, Malka S, et al. Spectrum of Genetic Variants in the Most Common Genes Causing Inherited Retinal Disease in a Large Molecularly Characterized United Kingdom Cohort. *Ophthalmol Retina*. 2024 Jul;8(7):699–709.
54. García Bohórquez B, Aller E, Rodríguez Muñoz A, Jaijo T, García García G, Millán JM. Updating the Genetic Landscape of Inherited Retinal Dystrophies. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jul 13;9:645600.
55. Anna A, Monika G. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J Appl Genet*. 2018 Aug 21;59(3):253–68.
56. Cornelis SS, Bauwens M, Haer-Wigman L, De Bruyne M, Pantrangi M, De Baere E, et al. Compendium of Clinical Variant Classification for 2,246 Unique ABCA4 Variants to Clarify Variant Pathogenicity in Stargardt Disease Using a Modified ACMG/AMP Framework. *Hum Mutat*. 2023 Dec 26;2023:6815504.
57. Garanto A, Chung DC, Duijkers L, Corral-Serrano JC, Messchaert M, Xiao R, et al. In vitro and in vivo rescue of aberrant splicing in CEP290-associated LCA by antisense oligonucleotide delivery. *Hum Mol Genet*. 2016 Jun 15;25(12):2552–63.
58. Huang D, Thompson JA, Chen SC, Adams A, Pitout I, Lima A, et al. Characterising splicing defects of ABCA4 variants within exons 13–50 in patient-derived fibroblasts. *Exp Eye Res*. 2022 Dec;225:109276.
59. Kaltak M, Corradi Z, Collin RWJ, Swildens J, Cremers FPM. Stargardt disease-associated missense and synonymous ABCA4 variants result in aberrant splicing. *Hum Mol Genet*. 2023 Oct 17;32(21):3078–89.
60. Daich Varela M, Bellingham J, Motta F, Jurkute N, Ellingford JM, Quinodoz M, et al. Multidisciplinary team directed analysis of whole genome sequencing reveals pathogenic non-coding variants in molecularly undiagnosed inherited retinal dystrophies. *Hum Mol Genet*. 2023 Jan 27;32(4):595–607.
61. Saunier S, Calado J, Benessy F, Silbermann F, Heilig R, Weissenbach J, et al. Characterization of the NPHP1 locus: mutational mechanism involved in deletions in familial juvenile nephronophthisis. *Am J Hum Genet*. 2000 Mar;66(3):778–89.
62. Rodilla C, Núñez-Moreno G, Benitez Y, Rodríguez de Alba M, Blanco-Kelly F, López-Alcojor A, et al. Long-Read Whole-Genome Sequencing as a Tool for Variant Detection in Inherited Retinal Dystrophies. *Int J Mol Sci*. 2025 Apr 18;26(8):3825.

63. Jang MA, Lee JK, Park JH, Hwang S, Kim Y gon, Kim JW, et al. Identification of diagnostic challenges in RP1 Alu insertion and strategies for overcoming them. *Sci Rep*. 2024 Oct 24;14(1):25119.
64. Runhart EH, Valkenburg D, Cornelis SS, Khan M, Sangermano R, Albert S, et al. Late-Onset Stargardt Disease Due to Mild, Deep-Intronic ABCA4 Alleles. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2019 Oct 1;60(13):4249-4256.
65. Aweidah H, Xi Z, Sahel JA, Byrne LC. PRPF31-retinitis pigmentosa: Challenges and opportunities for clinical translation. *Vision Res*. 2023 Dec;213:108315.
66. den Hollander AI, Koenekoop RK, Yzer S, Lopez I, Arends ML, Voesenek KEJ, et al. Mutations in the CEP290 (NPHP6) Gene Are a Frequent Cause of Leber Congenital Amaurosis. *Am J Hum Genet*. 2006 Sep;79(3):556-61.
67. Vervoort R, Lennon A, Bird AC, Tulloch B, Axton R, Miano MG, et al. Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa. *Nat Genet*. 2000 Aug;25(4):462-6.
68. Usman M, Jüschke C, Song F, Kastrati D, Owczarek-Lipska M, Eilers J, et al. Skewed X-inactivation is associated with retinal dystrophy in female carriers of RPGR mutations. *Life Sci Alliance*. 2023 Oct;6(10):e202201814.
69. Lazaro-Guevara JM, Garrido-Lopez KM, Soberanis LSR, Sandoval-Vargas MA, Flores-Robles BJ, Téllez-Arreola JL. Discovery of a novel missense mutation in the RIMS1 gene potentially enhances the severity of retinitis pigmentosa (RP) caused by RP1 mutation in humans. *Gene Rep*. 2025 Jun;39:102156.
70. Le NQ, He W, MacGregor S. Polygenic Risk Scores and Genetically Complex Eye Disease. *Annu Rev Vis Sci*. 2024 Sep 15;10(1):403-23.
71. Blanco-Kelly F, Jaijo T, Aller E, Avila-Fernandez A, López-Molina MI, Giménez A, et al. Clinical Aspects of Usher Syndrome and the USH2A Gene in a Cohort of 433 Patients. *JAMA Ophthalmol*. 2015 Feb;133(2):157-64.
72. Cehajic-Kapetanovic J, Martinez-Fernandez de la Camara C, Birtel J, Rehman S, McClements ME, Charbel Issa P, et al. Impaired glutamylation of RPGR-ORF15 underlies the cone-dominated phenotype associated with truncating distal ORF15 variants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2022 Dec 6;119(49):e2208707119.
73. Panneman DM, Hitti-Malin RJ, McKibbin M, de Bruijn SE, Boonen EGM, Vincent AL, et al. Expansion of the ABCA4-Associated Retinopathy Spectrum: Severe Variants Can be Associated With Early-Onset Severe Retinal Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2025 Jun 4;66(6):19.
74. Georgiou M, Fujinami K, Michaelides M. Inherited retinal diseases: Therapeutics, clinical trials and end points-A review. *Clin Exp Ophthalmol*. 2021 Apr;49(3):270-88.
75. Russell S, Bennett J, Wellman JA, Chung DC, Yu ZF, Tillman A, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65 -mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2017 Aug;390(10097):849-60.
76. Lau SC, Grati M, Isgrig K, Sinan M, Calabro KR, Zhu J, et al. Dual-AAV vector-mediated expression of MYO7A improves vestibular function in a mouse model of Usher syndrome 1B. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2023 Sep;30:534-45.
77. Vázquez-Domínguez I, Öktem M, Winkelaar FA, Nguyen TH, Hoogendoorn ADM, Roschi E, et al. Lipopeptide-mediated Cas9 RNP delivery: A promising broad therapeutic strategy for safely removing deep-intronic variants in ABCA4. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2024 Dec;35(4):102345.
78. García-Bohórquez B, Barberán-Martínez P, Aller E, Jaijo T, Mínguez P, Rodilla C, et al. Exploring non-coding variants and evaluation of antisense oligonucleotides for splicing redirection in Usher syndrome. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2024 Dec;35(4):102374.
79. Jacobson SG, Cideciyan A V. Treatment Possibilities for Retinitis Pigmentosa. *N Engl J Med*. 2010 Oct 21;363(17):1669-71.
80. Cremers FPM, Lee W, Collin RWJ, Allikmets R. Clinical spectrum, genetic complexity and therapeutic approaches for retinal disease caused by ABCA4 mutations. *Prog Retin Eye Res*. 2020 Nov;79:100861.
81. Brar AS, Parameswarappa DC, Takkar B, Narayanan R, Jalali S, Mandal S, et al. Gene Therapy for Inherited Retinal Diseases: From Laboratory Bench to Patient Bedside and Beyond. *Ophthalmol Ther*. 2024 Jan;13(1):21-50.
82. Combs R, McAllister M, Payne K, Lowndes J, Devery S, Webster AR, et al. Understanding the impact of genetic testing for inherited retinal dystrophy. *Eur J Hum Genet*. 2013 Nov 13;21(11):1209-13.

83. Austin-Tse CA, Jobanputra V, Perry DL, Bick D, Taft RJ, Venner E, et al. Best practices for the interpretation and reporting of clinical whole genome sequencing. *NPJ Genom Med.* 2022 Apr 8;7(1):27.
84. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016 Jun 17;17(6):333–51.
85. Matczyńska E, Beć-Gajowniczek M, Sivitskaya L, Gregorczyk E, Łyszkiewicz P, Szymańczak R, et al. Optimised, Broad NGS Panel for Inherited Eye Diseases to Diagnose 1000 Patients in Poland. *Biomedicines.* 2024 Jun 18;12(6):1355.
86. Setty ST, Scott-Boyer MP, Cuppens T, Droit A. New Developments and Possibilities in Reanalysis and Reinterpretation of Whole Exome Sequencing Datasets for Unsolved Rare Diseases Using Machine Learning Approaches. *Int J Mol Sci.* 2022 Jun 18;23(12):6792.
87. Mihalich A, Cammarata G, Tremolada G, Manfredini E, Bianchi Marzoli S, Di Blasio AM. Genetic Characterization of 191 Probands with Inherited Retinal Dystrophy by Targeted NGS Analysis. *Genes (Basel).* 2024 Jun 12;15(6):766.
88. Ganapathi M, Thomas-Wilson A, Buchovecky C, Dharmadhikari A, Barua S, Lee W, et al. Clinical exome sequencing for inherited retinal degenerations at a tertiary care center. *Sci Rep.* 2022 Jun 7;12(1):9358.
89. Ellingford JM, Barton S, Bhaskar S, Williams SG, Sergouniotis PI, O'Sullivan J, et al. Whole Genome Sequencing Increases Molecular Diagnostic Yield Compared with Current Diagnostic Testing for Inherited Retinal Disease. *Ophthalmology.* 2016 May;123(5):1143–50.
90. Strande NT, Riggs ER, Buchanan AH, Ceyhan-Birsoy O, DiStefano M, Dwight SS, et al. Evaluating the Clinical Validity of Gene-Disease Associations: An Evidence-Based Framework Developed by the Clinical Genome Resource. *Am J Hum Genet.* 2017 Jun 1;100(6):895–906.
91. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405–24.
92. Pepin MG, Murray ML, Bailey S, Leistritz-Kessler D, Schwarze U, Byers PH. The challenge of comprehensive and consistent sequence variant interpretation between clinical laboratories. *Genet Med.* 2016 Jan;18(1):20–4.
93. Harrison SM, Dolinsky JS, Knight Johnson AE, Pesaran T, Azzariti DR, Bale S, et al. Clinical laboratories collaborate to resolve differences in variant interpretations submitted to ClinVar. *Genet Med.* 2017 Oct;19(10):1096–104.
94. Andersen EF, Azzariti DR, Babb L, Berg JS, Biesecker LG, Bly Z, et al. The Clinical Genome Resource (ClinGen): Advancing genomic knowledge through global curation. *Genet Med.* 2025 Jan;27(1):101228.
95. Biesecker LG, Harrison SM, ClinGen Sequence Variant Interpretation Working Group. The ACMG/AMP reputable source criteria for the interpretation of sequence variants. *Genet Med.* 2018 Dec;20(12):1687–8.
96. Ellingford JM, Ahn JW, Bagnall RD, Baralle D, Barton S, Campbell C, et al. Recommendations for clinical interpretation of variants found in non-coding regions of the genome. *Genome Med.* 2022 Dec 19;14(1):73.
97. Sangermano R, Khan M, Cornelis SS, Richelle V, Albert S, Garanto A, et al. ABCA4 midigenes reveal the full splice spectrum of all reported noncanonical splice site variants in Stargardt disease. *Genome Res.* 2018 Jan;28(1):100–10.
98. Neveling K, Feenstra I, Gilissen C, Hoefsloot LH, Kamsteeg EJ, Mensenkamp AR, et al. A Post-Hoc Comparison of the Utility of Sanger Sequencing and Exome Sequencing for the Diagnosis of Heterogeneous Diseases. *Hum Mutat.* 2013 Dec;34(12):1721–6.
99. Burdick KJ, Cogan JD, Rives LC, Robertson AK, Koziura ME, Brokamp E, et al. Limitations of exome sequencing in detecting rare and undiagnosed diseases. *Am J Med Genet A.* 2020 Jun 19;182(6):1400–6.
100. Surl D, Won D, Lee ST, Lee CS, Lee J, Lim HT, et al. Clinician-Driven Reanalysis of Exome Sequencing Data From Patients With Inherited Retinal Diseases. *JAMA Netw Open.* 2024 May 31;7(5):e2414198.
101. Lam BL, Leroy BP, Black G, Ong T, Yoon D, Trzupek K. Genetic testing and diagnosis of inherited retinal diseases. *Orphanet J Rare Dis.* 2021 Dec 14;16(1):514.
102. Zeuli R, Karali M, de Bruijn SE, Rodenburg K, Scarpato M, Capasso D, et al. Whole genome sequencing identifies elusive variants in genetically

- unsolved Italian inherited retinal disease patients. *Hum Genet Genom Adv.* 2024 Jul;5(3):100314.
103. Liu X, Hu F, Zhang D, Li Z, He J, Zhang S, et al. Whole genome sequencing enables new genetic diagnosis for inherited retinal diseases by identifying pathogenic variants. *NPJ Genom Med.* 2024 Jan 20;9(1):6.
 104. Fadaie Z, Whelan L, Ben-Yosef T, Dockery A, Corradi Z, Gilissen C, et al. Whole genome sequencing and in vitro splice assays reveal genetic causes for inherited retinal diseases. *NPJ Genom Med.* 2021 Nov 18;6(1):97.
 105. Finnegan LK, Ridgeway AR, Chadderton N, Farrar GJ. The Challenge of VUS in Inherited Retinal Degeneration: Insight from Functional Studies. *Adv Exp Med Biol.* 2025;1468:51–55.
 106. Zernant J, Lee W, Collison FT, Fishman GA, Sergeev Y V, Schuerch K, et al. Frequent hypomorphic alleles account for a significant fraction of ABCA4 disease and distinguish it from age-related macular degeneration. *J Med Genet.* 2017 Jun;54(6):404–12.
 107. Abou Tayoun AN, Pesaran T, DiStefano MT, Oza A, Rehm HL, Biesecker LG, et al. Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion. *Hum Mutat.* 2018 Nov 7;39(11):1517–24.
 108. Motta F, Martin R, Porto F, Wohler E, Resende R, Gomes C, et al. Pathogenicity Reclassification of RPE65 Missense Variants Related to Leber Congenital Amaurosis and Early-Onset Retinal Dystrophy. *Genes (Basel).* 2019 Dec 24;11(1):24.
 109. Gupta P, Nakamichi K, Bonnell AC, Yanagihara R, Radulovich N, Hisama FM, et al. Familial co-segregation and the emerging role of long-read sequencing to re-classify variants of uncertain significance in inherited retinal diseases. *NPJ Genom Med.* 2023 Aug 10;8(1):20.
 110. Kolesnikova M, Oh JK, Wang J, Lee W, Zernant J, Su PY, et al. A pathogenic in-frame deletion-insertion variant in BEST1 phenocopies Stargardt disease. *JCI Insight.* 2022 Dec 8;7(23):e162687.
 111. Esteve-Garcia A, Cobos E, Sau C, Padró-Miquel A, Català-Mora J, Barberán-Martínez P, et al. Deciphering complexity: TULP1 variants linked to an atypical retinal dystrophy phenotype. *Front Genet.* 2024 Feb 21;15:1352063.
 112. Esteve-Garcia A, Padró-Miquel A, Català-Mora J, Sau C, Yubero D, Corradi Z, et al. Personalised genomic strategies improve diagnostic yield in inherited retinal dystrophies: a stepwise, patient-centred approach. *Eye.* 2025 Sep 9. Epub ahead of print. doi:10.1038/s41433-025-03981-1.
 113. Iancu IF, Avila-Fernandez A, Arteché A, Trujillo-Tiebas MJ, Riveiro-Alvarez R, Almoguera B, et al. Prioritizing variants of uncertain significance for reclassification using a rule-based algorithm in inherited retinal dystrophies. *NPJ Genom Med.* 2021 Feb 23;6(1):18.
 114. Fernández-Suárez E, González-del Pozo M, Méndez-Vidal C, Martín-Sánchez M, Mena M, García-Núñez A, et al. New genetic diagnoses for inherited retinal dystrophies by integrating splicing tools into NGS pipelines. *NPJ Genom Med.* 2025 Jul 2;10(1):52.
 115. Wenger AM, Guturu H, Bernstein JA, Bejerano G. Systematic reanalysis of clinical exome data yields additional diagnoses: implications for providers. *Genet Med.* 2017 Feb;19(2):209–14.
 116. González-del Pozo M, Martín-Sánchez M, Bravo-Gil N, Méndez-Vidal C, Chimenea Á, Rodríguez-de la Rúa E, et al. Searching the second hit in patients with inherited retinal dystrophies and monoallelic variants in ABCA4, USH2A and CEP290 by whole-gene targeted sequencing. *Sci Rep.* 2018 Sep 6;8(1):13312.
 117. Chiang JPW, Lamey TM, Wang NK, Duan J, Zhou W, McLaren TL, et al. Development of High-Throughput Clinical Testing of RPGR ORF15 Using a Large Inherited Retinal Dystrophy Cohort. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018 Sep 4;59(11):4434–4440.
 118. Maggi J, Roberts L, Koller S, Rebello G, Berger W, Ramesar R. De Novo Assembly-Based Analysis of RPGR Exon ORF15 in an Indigenous African Cohort Overcomes Limitations of a Standard Next-Generation Sequencing (NGS) Data Analysis Pipeline. *Genes (Basel).* 2020 Jul 15;11(7):800.
 119. Li J, Tang J, Feng Y, Xu M, Chen R, Zou X, et al. Improved Diagnosis of Inherited Retinal Dystrophies by High-Fidelity PCR of ORF15 followed by Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn.* 2016 Nov;18(6):817–24.
 120. Romero R, de la Fuente L, Del Pozo-Valero M, Riveiro-Álvarez R, Trujillo-Tiebas MJ, Martín-Mérida I, et al. An evaluation of pipelines for DNA variant detection can guide a reanalysis protocol to increase the

- diagnostic ratio of genetic diseases. *NPJ Genom Med.* 2022 Jan 27;7(1):7.
121. Robinson PN, Köhler S, Bauer S, Seelow D, Horn D, Mundlos S. The Human Phenotype Ontology: A Tool for Annotating and Analyzing Human Hereditary Disease. *Am J Hum Genet.* 2008 Nov;83(5):610–5.
 122. Areblom M, Kjellström S, Andréasson S, Öhberg A, Gränse L, Kjellström U. A Description of the Yield of Genetic Reinvestigation in Patients with Inherited Retinal Dystrophies and Previous Inconclusive Genetic Testing. *Genes (Basel).* 2023 Jul 8;14(7):1413.
 123. Bullich G, Matalonga L, Pujadas M, Papakonstantinou A, Piscia D, Tonda R, et al. Systematic Collaborative Reanalysis of Genomic Data Improves Diagnostic Yield in Neurologic Rare Diseases. *J Mol Diagn.* 2022 May;24(5):529–42.
 124. Maggi J, Koller S, Feil S, Bachmann-Gagescu R, Gerth-Kahlert C, Berger W. Limited Added Diagnostic Value of Whole Genome Sequencing in Genetic Testing of Inherited Retinal Diseases in a Swiss Patient Cohort. *Int J Mol Sci.* 2024 Jun 13;25(12):6540.
 125. Meyer KJ, Anderson MG. Genetic modifiers as relevant biological variables of eye disorders. *Hum Mol Genet.* 2017 Aug 1;26(R1):R58–R67.
 126. Esteve-Garcia A, Sau C, Padró-Miquel A, Català-Mora J, Aguilera C, Cobos E. Expanding the Clinical Spectrum of CEP290 Variants: A Case Report on Non-Syndromic Retinal Dystrophy with a Mild Phenotype. *Genes (Basel).* 2024 Dec 9;15(12):1584.
 127. Coppieters F, Casteels I, Meire F, De Jaegere S, Hooghe S, van Regemorter N, et al. Genetic screening of LCA in Belgium: predominance of CEP290 and identification of potential modifier alleles in AHI1 of CEP290-related phenotypes. *Hum Mutat.* 2010 Oct;31(10):E1709–66.
 128. Littink KW, Pott JWR, Collin RWJ, Kroes HY, Verheij JBGM, Blokland EAW, et al. A novel nonsense mutation in CEP290 induces exon skipping and leads to a relatively mild retinal phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Jul;51(7):3646–52.
 129. Bodenbender JP, Marino V, Bethge L, Stingl K, Haack TB, Biskup S, et al. Biallelic Variants in TULP1 Are Associated with Heterogeneous Phenotypes of Retinal Dystrophy. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 31;24(3):2709.
 130. Al-Hindi H, Chauhan MZ, Sanders R, Samarah H, DeBenedictis M, Traboulsi E, et al. TULP1 related retinal dystrophy: report of rare and novel variants with a previously undescribed phenotype in two cases. *Ophthalmic Genet.* 2022 Mar 4;43(2):277–81.
 131. Maddox DM, Ikeda S, Ikeda A, Zhang W, Krebs MP, Nishina PM, et al. An Allele of Microtubule-Associated Protein 1A (Mtap1a) Reduces Photoreceptor Degeneration in Tulp1 and Tub Mutant Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Mar 26;53(3):1663–9.
 132. Cornelis SS, Int'Hout J, Runhart EH, Grunewald O, Lin S, Corradi Z, et al. Representation of Women Among Individuals With Mild Variants in ABCA4-Associated Retinopathy. *JAMA Ophthalmol.* 2024 May 1;142(5):463–471.
 133. González-del Pozo M, Fernández-Suárez E, Bravo-Gil N, Méndez-Vidal C, Martín-Sánchez M, Rodríguez-de la Rúa E, et al. A comprehensive WGS-based pipeline for the identification of new candidate genes in inherited retinal dystrophies. *NPJ Genom Med.* 2022 Mar 4;7(1):17.
 134. Carss KJ, Arno G, Erwood M, Stephens J, Sanchis-Juan A, Hull S, et al. Comprehensive Rare Variant Analysis via Whole-Genome Sequencing to Determine the Molecular Pathology of Inherited Retinal Disease. *Am J Hum Genet.* 2017 Jan;100(1):75–90.
 135. Zeitz C, Navarro J, Azizzadeh Pormehr L, Méjécase C, Neves LM, Letellier C, et al. Variants in UBAP1L lead to autosomal recessive rod-cone and cone-rod dystrophy. *Genet Med.* 2024 Jun;26(6):101081.
 136. Bertrand RE, Wang J, Xiong KH, Thangavel C, Qian X, Ba-Abbad R, et al. Ceramide synthase TLCD3B is a novel gene associated with human recessive retinal dystrophy. *Genet Med.* 2021 Mar;23(3):488–97.
 137. Fernández-Suárez E, González-del Pozo M, García-Núñez A, Méndez-Vidal C, Martín-Sánchez M, Mejías-Carrasco JM, et al. Expanding the phenotype of THRB: a range of macular dystrophies as the major clinical manifestations in patients with a dominant splicing variant. *Front Cell Dev Biol.* 2023 Jul 21;11:1197744.
 138. Fernández-Caballero L, Blanco-Kelly F, Swafiri ST, Martín-Mérida MI, Quinodoz M, Ullah M, et al. Identification of new families and variants in autosomal dominant macular dystrophy associated with THRB. *Sci Rep.* 2025 Apr 28;15(1):14904.
 139. Russell SR, Drack A V., Cideciyan A V., Jacobson SG, Leroy BP, Van Cauwenbergh C, et al. Intravitreal antisense oligonucleotide

- sepofarsen in Leber congenital amaurosis type 10: a phase 1b/2 trial. *Nat Med*. 2022 May 4;28(5):1014–21.
140. Leith FK, Lye J, Delaney DS, McLenachan S, Chen FK, Atlas MD, et al. Current approaches for Usher syndrome disease models and developing therapies. *Front Cell Dev Biol*. 2025 Jun 20;13:1547523.
 141. Fabian-Morales GE, Ordoñez-Labastida V, Rowell WJ, Lambert C, Fanslow C, Robertson A, et al. Resolving the Diagnostic Odyssey in Inherited Retinal Dystrophies Through Long-Read Genome Sequencing. *Am J Med Genet A*. 2025 Oct;197(10):e64139.
 142. Jaganathan K, Kyriazopoulou Panagiotopoulou S, McRae JF, Darbandi SF, Knowles D, Li YI, et al. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell*. 2019 Jan;176(3):535-548.e24.
 143. Bauwens M, Del Pozo Valero M, De Bruyne M, Van Den Broeck F, Mahieu Q, Van de Sompele S, et al. A multi-omics approach increases the diagnostic yield 'beyond the exome' in unsolved patients with inherited eye diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2024;65(7):4939.
 144. Nash BM, Ma A, Ho G, Farnsworth E, Minoche AE, Cowley MJ, et al. Whole Genome Sequencing, Focused Assays and Functional Studies Increasing Understanding in Cryptic Inherited Retinal Dystrophies. *Int J Mol Sci*. 2022 Mar 31;23(7):3905.
 145. Zawar A, Manoj G, Nair PP, Deshpande P, Suravajhala R, Suravajhala P. Variants of uncertain significance: At the crux of diagnostic odyssey. *Gene*. 2025 Aug;962:149587.

