



# Models *in vivo* i *in vitro* per a l'estudi de gens causants de distròfies de retina: *CERKL* i *RP2*

Marina Riera Gibernau

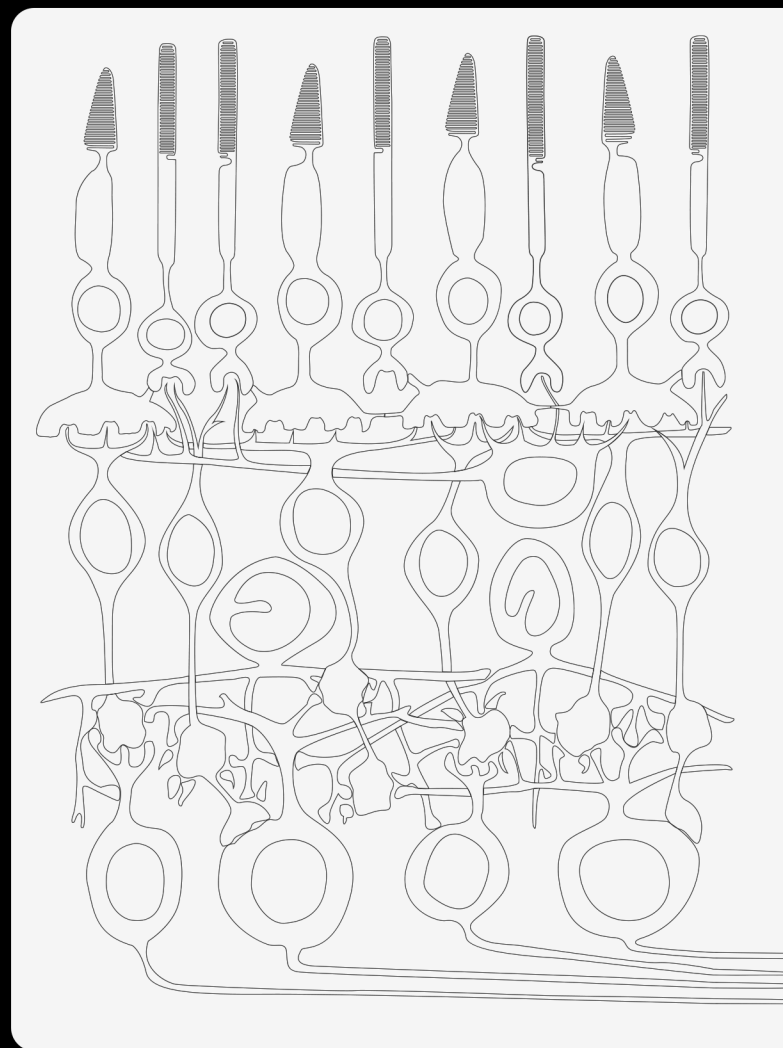
**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Models *in vivo* i *in vitro* per a l'estudi de  
gens causants de distròfies de retina:  
*CERKL* i *RP2*





Models *in vivo* i *in vitro* per a l'estudi de gens causants de  
distròfies de retina: *CERKL* i *RP2*

Memòria presentada per  
**Marina Riera Gibernau**

Per optar al títol de  
**Doctora**  
per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Roser González Duarte al  
Departament de Genètica de la Facultat de Biologia  
Universitat de Barcelona  
Programa de Genètica

Roser González Duarte

Marina Riera Gibernau

Barcelona, abril 2013



*A la meva mare*



Aquesta tesi doctoral no s'hagués pogut materialitzar sense un suport econòmic, moral i personal al darrera, així com una sèrie d'instal·lacions i institucions imprescindibles per poder desenvolupar-la. Tota la feina aquí presentada ha estat realitzada gràcies al suport de les següent entitats, en projectes i finançaments concedits a la Dra. Roser González Duarte:

- Ministerio de Ciencia i Tecnología (BFU2006-04562-*Construcción de un modelo genético para el estudio de una patología neurodegenerativa. Búsqueda y análisis funcional de nuevos genes causantes de retinosis pigmentaria*).
- Ministerio de Ciencia e Innovación, MICINN (SAF2009-08079-*Genómica funcional para el estudio de la retinosis pigmentaria*).
- Ajuts al Grup de Recerca Consolidat de la Generalitat de Catalunya (2009SGR1427-*Genòmica funcional aplicada a l'estudi de patologies*).
- Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, CIBERER, Instituto de Salud Carlos III (*Infraestructura para acciones de alto coste*, 2008; *Ayudas intramurales*, 2008-2010; *PIBER2-Estudio de un modelo knockdown del gen ortólogo de CERKL, causante de RP/CRD, en pez cebra*, 2012).
- Bidons Egara (*Estudio funcional de genes RP*, 2007-2010).
- ONCE (*Caracterización de la neurodegeneración retiniana en el modelo murino knockout Cerkl<sup>-/-</sup>*, 2010-2011).

Durant aquest temps he gaudit de diverses beques i ajuts:

- Beca Bidons Egara (Setembre 2007-Agost 2008)
- Beca FPU (AP2007-00805) del MICINN (Setembre 2008-Agost 2012)
- Ajuda per l'assistència al *Curso de Fenotipado de Modelos Animales* CIBERER (2012)

També cal esmentar que aquesta feina s'ha pogut dur a terme gràcies a estades de curta durada en diferents centres, entre els quals cal destacar:

- Centre de Regulació Genòmica, CRG (Barcelona), al grup del Dr. Vivek Malhotra, on em van proporcionar totes les facilitats per poder realitzar part dels estudis de localització cel·lular de CERKL.
- Institut de Recerca Biomèdica, IRB (Barcelona), al grup del Dr. Fernando Albericio, on vaig dur a terme el disseny i generació de pèptids per a l'obtenció d'anticossos anti-CERKL.

Per últim, vull agrair el suport i els ànims rebuts per part de diverses fundacions d'afectats, molt especialment a l'**Andrés Mayor** (President de la Asociación Retina Asturias) i al **José M<sup>a</sup> Casado** (President de Retina Navarra), a més del recolzament personal de la **M<sup>a</sup> Victoria Solano** i del **Joaquim Lòpez** (Bidons Egara).



Amb aquesta memòria es posa punt i final a una llarga però alhora curta etapa, per la qual han passat i s'han aturat diverses persones, a les que vull agrair:

En primer lloc, a la **Roser**, per l'oportunitat que em va donar farà ja 5 anys, per confiar en mi i per haver-me permès créixer científicament.

A la **Gemma**, per tots els consells, idees i ganes de fer ciència, i per tenir sempre la porta del seu despatx oberta.

A en **Marc**, per ser el responsable que m'aventurés en la tesi doctoral, per transmetre'm tota la il·lusió i motivació necessàries durant l'etapa d'alumna interna.

A en **Jon**, per haver-me "adoptat" i cuidat tan bé, per tots els anys viscuts i conviscuts plegats al laboratori 6 i per tota la sapiència transmesa.

A les nenes al complet, a l'**Esther** (perquè sempre hi és), a la **Pilar** (per fer-me riure i somriure com ningú), a l'**Amanda** (per la força i optimisme que desprèn constantment), a la **Montse S** (per ser tan autèntica), a la **Sheila** (per ser tan bona en tot!) i, més recentment, a la **Marta de Castro Miró** (per veure les coses des d'un altre punt de vista) i a la **Flori** (per aconseguir sempre allò que es proposa), pels bons moments dins i fora del lab, per tots els viatges, sopars, partits, festes i demés que hem viscut plegades. I perquè sé que no acabaran aquí!

A tota la gent que ha anat passant pels laboratoris 4 i 5 de la planta 2, a en **Freddy**, a la **Miriam**, a la **Crina**, a l'**Àlex G**, a la **Mariona**, a en **Víctor A**, a la **Sílvia G**, a la **María G**, a l'**Elena**, a l'**Anna**, a la **Mireia** i a en **Vasilis**, per estar sempre disposats a xerrar una estoneta i a donar un cop de mà.

A l'**Isaac** (des de Mònaco que no em trec l'*azzurro* del cap) i a la tropa de la planta 3, a la **Noe**, a la **Patri**, a la **Roser U**, a la **Laura**, a la **Cèlia**, a la **Bàrbara**, a la **Marta G** i a tota la resta, per posar el punt còmic i despreocupat del departament.

Als de la planta 1, per tota l'ajuda en l'experiència *Danio rerio*, sobretot a la família del lab *Jordis/Emilis* (**Roser F**, **Bea**, **Kike**, **María A**, **Gus**, **Susanna**, **Sisco**, *Animalet*, ...) i, especialment, a en **Demi**, que ha fet únics i divertits els eterns matins a la -3.

A tota la gent de MOL, a en **Ricard** (parlem de coses importants?), a la **Neus** (per l'infinit coneixement en proteòmica), a en **Cristian** (per tots els consells), i a en **Dani**, a la **Lluïsa**, a la **Susi**, a la **Sílvia** i a en **Bru**, per poder recórrer a ells sempre que ho necessites. També a la resta del departament que em queda per anomenar, especialment a la **Mari**, a en **Pep Abril**, a en **Francesc Mestres**, a l'**Iñaki**, a en **Víctor Hugo**, i a en **Michael** i a l'**Àlex P**, que fa temps que ja no corren pel passadís de la 2a planta... Finalment, a la **Berta** i a en **Manel** dels SCTs, per oferir sempre tantes facilitats en tot.

Fora del lab, a tota la colla de l'Autònoma, especialment a la **Mireia** (per portar una mica de la UAB a la UB), a l'**Ana** (con una *n* que esto es serio), a la **Nerea** (per ser tan *cuca*), a l'**Albert** (per fer insuperables molts moments), a la **Montse R** (aquelles mirades...*Maireia!*), a en **Roca** (simplement, *Velcro*), a la **Caro** (*és la Caro*) i a en **Regius** (res és el mateix des d'aquella dutxa), per fer de Bio els millors anys i per continuar exactament al mateix lloc tot i les distàncies.

També a en **Diego**, per ballar tan bé, i a en **Víctor G** i a la **Lara**, per tots els Creixells, Espolles, Cahors, Arenys i demés plegats.

A la **Cristina**, per ser una companya perfecte d'Erasmus, de viatges, de pis i d'il·lusions, pels anys compartits a Sabadell i per ser, simplement, tan així. I a en **Jonathan**, per tenir tantes ganes de tot, i per l'ajuda aquestes últimes setmanes.

A en **Joan**, per haver-me acompanyat sempre de la mà en aquest viatge d'alts i baixos, per haver tingut tanta paciència i per haver après que “*5 minuts*” mai eren 5 minuts...

I, finalment, a la meva petita però gran (gegant) família; a la meva **mare**, a en **David** i a la **Gemma**.

A tots, mil gràcies.





A decorative graphic at the bottom of the page consists of several stylized, light gray outlines of human figures. The figures are arranged in a row, with their heads and shoulders visible. They appear to be in various poses, some with arms raised or bent. The lines are thin and elegant, creating a modern, minimalist aesthetic.

# Índex



# ÍNDIX


---

<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>7</b>
<b>1. ESTRUCTURA I FUNCIO DE LA RETINA</b>	<b>9</b>
1.1 La retina externa: l'epiteli pigmentari	10
1.2 La retina interna	11
1.2.1 Les cèl·lules fotoreceptores: els bastons i els cons	11
1.2.2 Les cèl·lules de la INL: amacrines, bipolars, horitzontals, interplexiformes i de Müller	12
1.2.3 Les cèl·lules ganglionars	13
<b>2. LES DISTRÒFIES DE RETINA: LA RETINOSI PIGMENTÀRIA</b>	<b>14</b>
2.1 Característiques clíniques	14
2.2 Característiques genètiques	16
2.2.1 Patrons d'herència	16
2.2.2 Heterogeneïtat genètica i al·lèlica	17
<b>3. EL GEN <i>CERKL</i> (<i>CERamide Kinase Like</i>)</b>	<b>19</b>
3.1 El locus RP26	19
3.2 Identificació del gen <i>CERKL</i>	19
3.2.1 Estructura i expressió	20
3.3 <i>CERKL</i> : un gen causant de RP i CRD	21
3.3.1 Mutacions descrites	21
3.4 <i>CERKL</i> : una proteïna òrfena de funció	22
3.4.1 Homologies amb CERK i dominis proteics	22
3.4.2 Localització cel·lular	25
3.4.5 Estudis funcionals	26
<b>4. EL GEN <i>RP2</i> (<i>Retinitis Pigmentosa 2</i>)</b>	<b>27</b>
4.1 <i>RP2</i> : gen causant de RP lligada al cromosoma X	27
4.1.1 Estructura i expressió	28
4.1.2 Mutacions descrites	28
<b>5. ELS GENS QUE CAUSEN DISTRÒFIES DE RETINA: ASPECTES FUNCIONALS</b>	<b>30</b>
5.1 La fototransducció	31
5.2 El metabolisme del retinol	32
5.3 El transport ciliar	33
5.4 L'estructura dels fotoreceptors	35
5.5 Les interaccions cel·lulars	35
5.6 La transcripció	36
5.7 El processament del mRNA	37
5.8 Els altres gens de distròfies de retina	37

6. MODELS ANIMALS EN L'ESTUDI DE LES DISTRÒFIES DE RETINA	40
6.1 Models animals naturals	41
6.1.1 Models murins naturals	41
6.1.2 Altres models naturals	44
6.2 Models animals manipulats genèticament	44
6.2.1 Model murí <i>de Cerkl</i>	44
6.2.2 Models murins de <i>Gcap1</i> i <i>Gcap2</i>	45
6.2.3 Models en peix zebra	46
<b>OBJECTIUS</b>	<b>47</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>51</b>
INFORME DE LA DIRECTORA	53
<b>CAPÍTOL 1</b>	
CARACTERITZACIÓ TRANSCRIPCIONAL DE <i>CERKL</i> I DE LA MUTACIÓ MÉS PREVALENT, R257X	55
PUBLICACIÓ 1	
<i>High transcriptional complexity of the retinitis pigmentosa CERKL gene in human and mouse</i>	57
MATERIAL SUPLEMENTARI	
Taules i figures suplementàries de la Publicació 1	73
RESULTATS SUPLEMENTARIS	
El mecanisme <i>nonsense-mediated decay</i> com a causa molecular de retinosi pigmentària en les famílies portadores de la mutació R257X de <i>CERKL</i>	83
<b>CAPÍTOL 2</b>	
CONSTRUCCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE MODELS ANIMALS PER A L'ESTUDI DE <i>CERKL</i>	91
PUBLICACIÓ 2	
<i>Targeted knockdown of Cerkl, a retinal dystrophy gene, causes mild affectation of the retinal cell layer</i>	93
MATERIAL SUPLEMENTARI	
Taules i figures suplementàries de la Publicació 2	107
PUBLICACIÓ 3	
<i>CERKL knockdown causes retinal degeneration in zebrafish</i>	113

MATERIAL SUPLEMENTARI	
Taules i figures suplementàries de la Publicació 3	145
<b>CAPÍTOL 3</b>	
ESTUDI D'UNA MUTACIÓ DE <i>RP2</i> CAUSANT DE XL-RP EN UNA FAMÍLIA ESPANYOLA	149
PUBLICACIÓ 4	
<i>Identification of an intronic single-point mutation in RP2 as the cause of semidominant X-linked retinitis pigmentosa</i>	151
<b>DISCUSSIÓ</b>	161
1. AVENÇOS EN L'ESTUDI DE LES DISTRÒFIES DE RETINA	163
2. COMPLEXITAT TRANSCRIPCIONAL DE <i>CERKL</i>	165
3. ÉS <i>CERKL</i> UNA QUINASA DE LÍPIDS?	169
4. <i>CERKL</i> , AGENT PROTECTOR D'ESTRÈS I MORT CEL·LULAR	171
5. ES TROBA <i>CERKL</i> IMPLICADA EN LA FOTOTRANSDUCCIÓ?	172
6. LOCALITZACIÓ DINÀMICA DE <i>CERKL</i> EN CÈL·LULES EN CULTIU I A LA RETINA	173
7. APROXIMACIONS FUNCIONALS <i>IN VIVO</i> I <i>IN VITRO</i> PER A L'ESTUDI DE MUTACIONS ALS GENS <i>CERKL</i> I <i>RP2</i>	175
8. QUIN ÉS EL MILLOR MODEL ANIMAL PER A L'ESTUDI DE LES DISTRÒFIES DE RETINA?	176
9. PERSPECTIVES FUTURES	180
<b>CONCLUSIONS</b>	181
<b>ABREVIATURES</b>	185
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	189
<b>ANNEX</b>	207
<b>ANNEX 1</b>	
ESTUDIS DE LA LOCALITZACIÓ CEL·LULAR DE <i>CERKL</i>	209
<b>ANNEX 2</b>	
PUBLICACIÓ 5	
<i>Comprehensive SNP-chip for retinitis pigmentosa-Leber congenital amaurosis diagnosis: new mutations and detection of mutational founder effects.</i>	215





# Introducció



# INTRODUCCIÓ

## 1. ESTRUCTURA I FUNCIO DE LA RETINA

L'ull és un òrgan sensorial complex que actua com a receptor de l'aparell de la visió. Es compon d'un sistema sensible als canvis de llum, capaç de transformar-los en impulsos neuronals que són enviats al cervell mitjançant el nervi òptic. Està format d'un globus ocular i de diverses estructures de sosteniment i protecció.

El globus ocular mesura al voltant d'uns 25 mm de diàmetre i està ocupat majoritàriament d'humor vitri. A la part anterior presenta dues càmeres petites plenes d'humor aquós les quals es comuniquen a través de la pupil·la. La paret del globus ocular es troba dividida en tres capes concèntriques: la túnica fibrosa, composta per l'escleròtica i la còrnia; la túnica vascular, que comprèn la coroides, el cos ciliar i l'iris; i, finalment, la túnica nerviosa o retina (Figura 1).

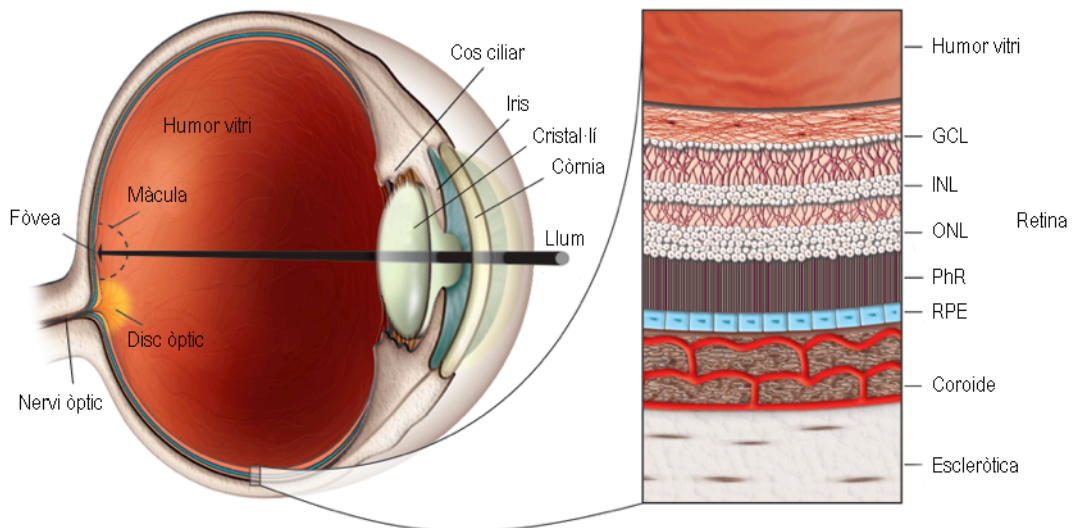


Figura 1. Diagrama de les estructures internes de l'ull humà. A la part esquerra, un tall horitzontal del globus ocular i a la dreta el detall de l'estructura de la seva paret. En la visió, la llum entra travessant la còrnia, la pupil·la i el cristal·lí fins enfocar-se a la retina, on creua totes les capes internes fins arribar a les cèl·lules fotosensibles, els fotoreceptors. RPE: epitel·li pigmentari; PhR: fotoreceptor; ONL: capa nuclear externa, INL: capa nuclear interna, GCL: capa de cèl·lules ganglionars. Figura adaptada de den Hollander et al. 2010.

La retina és una fina capa de teixit d'uns 0.2 mm de gruix que recobreix la cara més interna de l'ull. Està formada per la retina nerviosa, que conté les cèl·lules fotosensibles o fotoreceptors, i una capa pigmentada. Al centre de la retina s'hi troba el disc òptic o papil·la, des d'on s'origina el nervi òptic i emergeixen els vasos sanguinis que irriguen tot el teixit. En aquesta regió hi manquen els fotoreceptors i, per tant, es tracta d'un punt cec en el camp visual. Just al costat del disc òptic hi ha una depressió poc profunda anomenada fòvea, on es concentren i s'ordenen de manera òptima els fotoreceptors i on es dona la màxima agudeses visual. La fòvea es troba a la regió central de la retina, envoltada d'una regió anomenada màcula, d'uns 1.5 mm de diàmetre, de color groguenc i clarament diferenciada de la resta, la retina perifèrica.

La retina conté diferents poblacions cel·lulars. A la part més externa, una monocapa de cèl·lules forma l'epiteli pigmentari (RPE) i a la part més interna, una xarxa de neurones i connexions donen lloc a la retina nerviosa. Aquesta última està formada per tres capes nuclears i dues capes d'interaccions sinàptiques, les capes plexiformes. A la capa nuclear externa (ONL) s'hi troben els nuclis de les cèl·lules fotoreceptores, que estan en contacte directe amb l'RPE a través dels seus segments externs, els quals formen la capa de fotoreceptors (PhR). Els axons d'aquests fotoreceptors contacten, a la capa plexiforme externa (OPL), amb les dendrites de les cèl·lules que formen la capa nuclear interna (INL): bipolars, horitzontals, amacrines,

interplexiformes i de Müller. Finalment, aquestes contacten a la capa plexiforme interna (IPL) amb les cèl·lules ganglionars (GCL), els axons de les quals formen el nervi òptic (Figura 2).

En la visió, la llum entra a través de la còrnia, travessa la pupilla, el cristal·lí i l'humor vitri i, finalment, es projecta sobre la retina. En el cas de la retina dels vertebrats existeixen dos tipus de fotoreceptors, els cons i els bastons, la proporció dels quals no és equitativa, existint 120 milions de bastons per només 5 milions de cons. A més, la distribució d'aquestes cèl·lules no és homogènia; els bastons es concentren a la perifèria i són els encarregats de la visió en condicions de foscor, mentre que al centre, s'hi troben exclusivament cons, sent aquesta regió l'especialitzada en la discriminació dels detalls i la visió en color. A la fòvea, els cons es troben sovint connectats de manera òptima en una relació 1:1:1 amb les cèl·lules bipolars i ganglionars. A més, en aquesta zona no hi ha vasos sanguinis, i això permet que la llum arribi sense obstacles als segments externs dels cons.

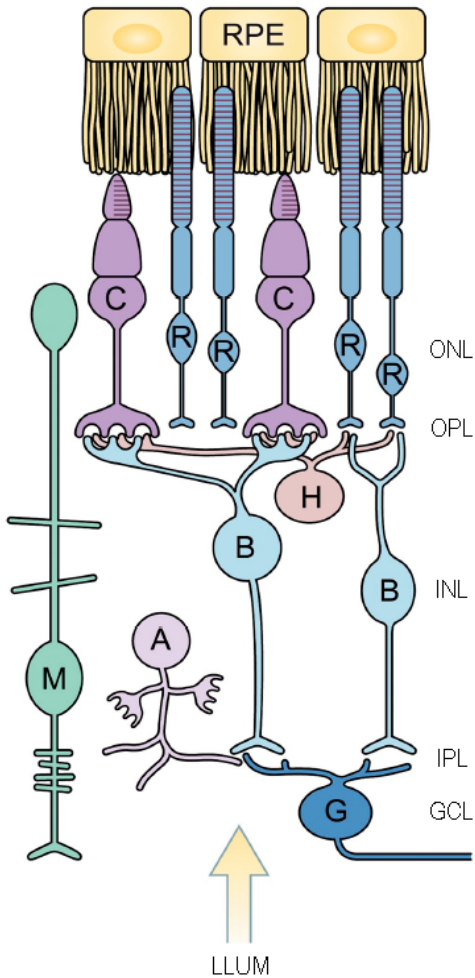


Figura 2. Esquema de les capes de la retina. S'indiquen les capes nuclears i la interrelació entre neurones. La llum arriba a la retina i travessa totes les capes internes fins arribar als fotoreceptors, els cons (C) i els bastons (R), estretament associats amb l'epiteli pigmentari (RPE). Els fotoreceptors connecten, mitjançant la capa plexiforme externa (OPL), amb la capa nuclear interna (INL), on hi trobem els somes de les cèl·lules horitzontals (H), bipolars (B), amacrines (A) i de Müller (M). Finalment, aquestes últimes contacten amb la capa de cèl·lules ganglionars (GCL) a través de la capa plexiforme interna (IPL). Els axons de les cèl·lules ganglionars (G) formen el nervi òptic. Figura adaptada de Sung i Chuang 2010.

## 1.1 LA RETINA EXTERNA: L'EPITELI PIGMENTARI

L'epiteli pigmentari de la retina (RPE) és una monocapa molt especialitzada de cèl·lules essencial per la funció visual, ja que desenvolupa múltiples tasques que permeten el funcionament normal de les cèl·lules fotoreceptores. Les cèl·lules de l'RPE es troben connectades mitjançant complexos d'unió de zònules oclusives i adherents formant la barrera hemato-retiniana, aïllant les cèl·lules retinals de les substàncies transportades per la sang.

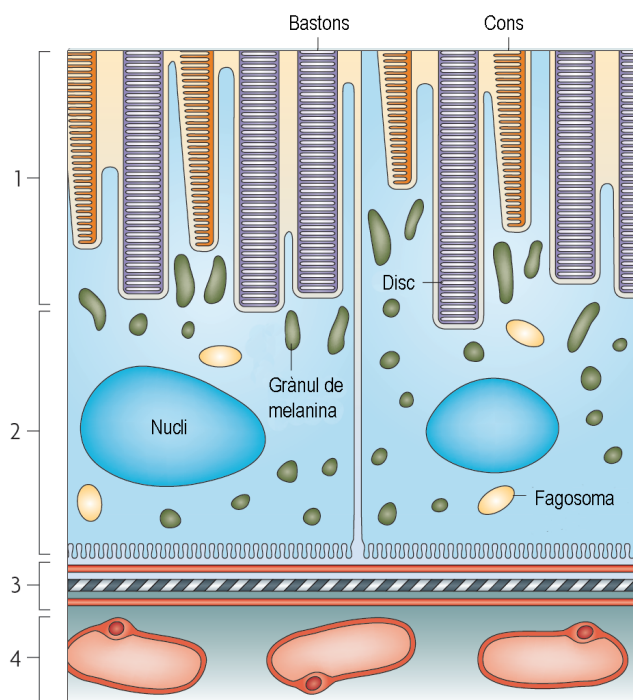


Figura 3. Esquema de l'RPE i la membrana de Bruch. Els segments externs dels fotorceptors (1) són envoltats per les prolongacions apicals de les cèl·lules adjacents de l'RPE (2), les quals acumulen grànuls de melanina. La membrana de Bruch (3) és una estructura pentalaminar situada entre l'RPE i la coroida (4). Imatge adaptada de Wright et al. 2010.

Considerant l'estructura interna i la morfologia de les cèl·lules de l'RPE, a la part basal, els nuclis s'ubiquen prop de la membrana de Bruch, la qual separa l'RPE de la coroida. A la superfície apical, apareixen unes baines cilíndriques que s'associen amb els extrems dels segments externs dels cons i bastons (Figura 3). En aquestes prolongacions s'hi concentren grans quantitats de grànuls de melanina allargats, els quals permeten l'absorció de la llum per tal de protegir els fotorceptors d'una excessiva exposició lumínica. A més, les cèl·lules de l'RPE contenen material fagocitat provinent dels discs dels segments externs dels fotorceptors que és emmagatzemat en cossos residuals o fagosomes per tal de ser digerit i eliminat. L'RPE també participa en la restauració dels pigments visuals dissociats en resposta a la llum, així com en la secreció de factors de creixement essencials pel manteniment i la integritat estructural de la retina (Strauss 2005).

## 1.2 LA RETINA INTERNA

### 1.2.1 Les cèl·lules fotorceptors: els bastons i els cons

Les cèl·lules fotorectores són neurones especialitzades capaces d'absorbir la llum i convertir-la en canvis de potencial de membrana cel·lular, en un procés anomenat fototransducció. Aquestes cèl·lules presenten una morfologia comuna composta per quatre elements: el segment extern, el segment intern, el soma i la terminal sinàptica (Figura 4).

El **segment extern** (OS) dels fotorceptors és una estructura cilíndrica que conté uns 800-900 discs membranosos aplanats, en els quals s'hi troben els pigments visuals, així com d'altres molècules estructurals. Aquests discs estan separats de la membrana plasmàtica en el cas dels bastons, i units a ella en el cas dels cons. En la regió basal de l'OS es generen constantment nous discs, mentre que a l'apical són fagocitats per l'RPE. La morfologia de l'OS dóna nom als dos tipus de fotorceptors, ja que en els bastons és allargat i arrodonit a l'extrem, i en els cons és més curt i de forma conoïdal.

El **segment intern** (IS), que connecta amb l'extern a través d'un cili modificat (cili connector, CC), conté la major part d'òrgans cel·lulars (mitocondris, reticle endoplasmàtic i aparell de Golgi), així com una xarxa de microtúbuls estesa per tot el segment. En aquesta regió és on tenen lloc la síntesi proteica, els

processos cel·lulars metabòlics i l'endocitosi. L'IS es troba connectat amb el **soma** o nucli cel·lular, des d'on s'estén un axó fins a la **terminal sinàptica**, on els fotoreceptors interactuen amb les cèl·lules bipolars i horitzontals de la INL.

Tots els components necessaris per la funció, manteniment i producció continuada de nous discs, són sintetitzats al segment intern i transportats a l'extern a través del cili connector (CC), mitjançant un mecanisme altament regulat anomenat transport intraflagelar (IFT). Aquest cili està format per nou dobles perifèrics de microtúbuls que parteixen d'un cos basal (BB). En els últims anys, molts autors han considerat l'OS dels fotoreceptors com a part especialitzada d'aquest cili.

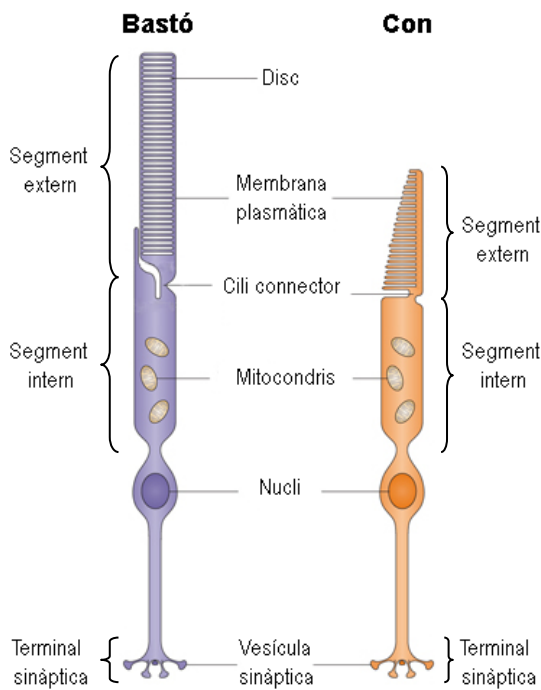


Figura 4. Esquema d'un bastó (esquerra) i d'un con (dreta) en el qual s'indiquen els elements cel·lulars principals. Adaptada de Wright et al. 2010.

Des del punt de vista funcional, els bastons són més sensibles a la llum que els cons i són les cèl·lules utilitzades en condicions de baixa intensitat lumínica. El fotopigment dels bastons, la rodopsina, té una absorció màxima de 496 nm en l'espectre visual, donant lloc a una imatge composta per diferents tons de color gris. Els cons, són menys sensibles a intensitats de llum baixes, però permeten la visió en colors. En els primats i els humans existeixen tres tipus de cons diferents: els cons L, M i S, sensibles a longituds d'ona llargues, mitjanes i curtes, respectivament. Cada tipus conté pigments visuals o opsines diferents, que difereixen en la longitud d'ona a la qual responen. Així doncs, el cons L responen a la llum vermella (588 nm), els cons M a la verda (531 nm), i el cons S a la blava (420 nm). Pel que fa a la resta de mamífers, aquests només disposen dels cons M i S, mentre que d'altres animals com les aus o els peixos poden arribar a tenir-ne fins a cinc tipus (Kolb et al. 2003).

### 1.2.2 Les cèl·lules de la INL: amacrines, bipolars, horitzontals, interplexiformes i de Müller

A la INL trobem quatre tipus de cèl·lules neuronals: les cèl·lules amacrines, les bipolars, les horitzontals i les interplexiformes; totes elles presenten orientacions i localitzacions diferents dins la retina nerviosa. A més, també s'hi troba un tipus de cèl·lula glial, les cèl·lules de Müller.

Les **cèl·lules bipolars** s'estenen des de l'OPL fins la IPL, connectant directament els fotoreceptors amb les cèl·lules ganglionars. Existeixen uns 5 milions d'aquestes cèl·lules a la retina, les quals es classifiquen en 9 tipus; 8 d'elles estableixen sinapsis amb els cons i només un tipus ho fa amb els bastons. Aquestes cèl·lules també es poden classificar segons la resposta que ofereixen al neurotransmissor que condueix el senyal químic

a través de les diferents capes de la retina, el glutamat. Les cèl·lules bipolars ON responen despolaritzant la membrana, detectant imatges fosques sobre fons clars; mentre que les OFF ho fan hiperpolaritzant, detectant imatges clares sobre fons fosc. Les cèl·lules bipolars processen una imatge inicial borrosa que esdevé més nítida amb la informació de les cèl·lules horitzontals.

Les **cèl·lules horitzontals**, de les quals es coneixen 3 tipus, poden establir sinapsis amb les terminals nervioses dels cons, dels bastons i també de les cèl·lules bipolars. Cada cèl·lula horitzontal rep inputs de molts cons, sent receptora d'estímuls d'un ampli camp de visió.

Finalment, les prolongacions de les **cèl·lules amacrines** es ramifiquen àmpliament per establir connexions amb les cèl·lules bipolars i les dendrites de les cèl·lules ganglionars. D'aquesta manera, la informació generada pels fotoreceptors arriba, mitjançant un flux vertical, a les cèl·lules ganglionars. No obstant, un altre tipus cel·lular, les **neurones interplexiformes**, permeten també un flux vertical però de sentit contrari, connectant ambdues capes plexiformes i enviant estímuls des de la IPL a l'OPL.

A la INL hi trobem també els nuclis d'un altre tipus cel·lular, no neuronal, les **cèl·lules de Müller**. Les seves prolongacions s'estenen a totes les capes de la retina i són les cèl·lules encarregades de mantenir l'homeòstasi i protegir les cèl·lules neuronals. Recentment, s'ha demostrat en alguns organismes que aquestes cèl·lules poden sotmetre's a processos de diferenciació i esdevenir qualsevol tipus de cèl·lula retinal (Stenkamp 2011).

### 1.2.3 Les cèl·lules ganglionars

La capa de cèl·lules ganglionars (GCL) està formada pels nuclis de les neurones ganglionars, els quals són grans i multipolars. Del soma neuronal en surt una prolongació axònica que continua per la capa de fibres nervioses fins abandonar el globus ocular com a part del nervi òptic. A l'extrem oposat, una sèrie de dendrites es ramifiquen dins la IPL. A les regions de la retina perifèrica una única cèl·lula ganglionar pot establir sinapsis amb un centenar de cèl·lules bipolars, mentre que a la regió central la connexió és 1:1. La GCL s'estructura en forma de monocapa en la major part de la retina; no obstant, a la màcula es poden formar fins a vuit estrats cel·lulars. S'estima que la retina humana conté al voltant d'un milió de cèl·lules ganglionars, dividides en 20 tipus diferents.

## 2. LES DISTRÒFIES DE RETINA: LA RETINOSI PIGMENTÀRIA

Les distròfies de retina (DR) engloben un conjunt de patologies caracteritzades per la degeneració dels fotoreceptors i les cèl·lules de l'RPE, i representen la major causa de ceguesa hereditària. Les DR es classifiquen segons el tipus cel·lular que es veu afectat en els primers estadis de la malaltia, els cons o els bastons i, en conseqüència, per la regió principalment danyada, la màcula o la retina perifèrica. Generalment, es tracta de malalties monogèniques que presenten els patrons típics d'herència mendeliana i mostren una gran heterogeneïtat clínica i genètica.

La retinosi pigmentària (RP) explica la meitat dels casos de distròfies de retina hereditàries, sent la DR més freqüent amb una prevalença aproximada d'1 en 4.000 i més d'un milió d'individus afectats arreu del món (Hartong et al. 2006, Churchill et al. 2012).

### 2.1 CARACTERÍSTIQUES CLÍNIQUES

La **retinosi pigmentària** és una malaltia amb una gran variabilitat fenotípica entre els individus afectats, tant pel que fa a l'edat d'aparició dels primers símptomes, com en la velocitat de progressió de la malaltia. D'aquesta manera, alguns pacients pateixen pèrdues de visió durant la infància, mentre que d'altres romanen asimptomàtics fins l'edat adulta.

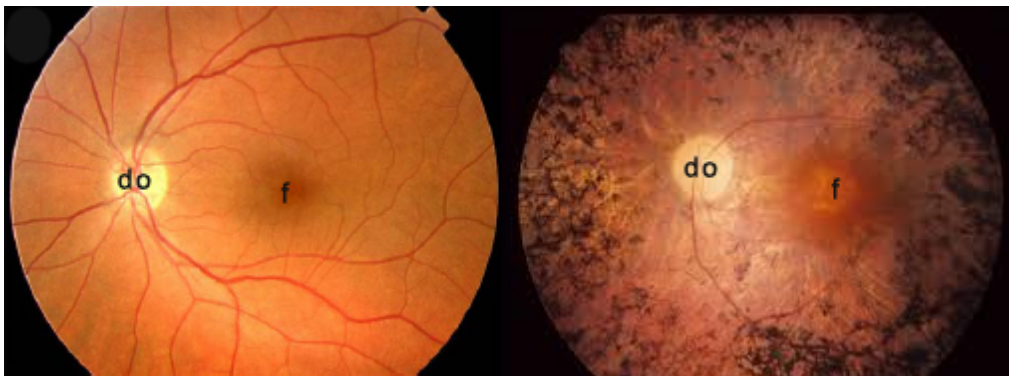


Figura 5. Comparació del fons d'ull d'un individu sa (esquerra) i d'un malalt de retinosi pigmentària (dreta). Si es comparen les imatges, s'observa que l'individu afecte d'RP presenta totes les característiques típiques d'aquesta patologia: aparició de dipòsits pigmentaris a la perifèria, apriament dels vasos sanguinis i pal·lidesa del disc òptic. do: disc òptic, f: fòvea.

En els primers estadis de la malaltia, durant l'adolescència, i degut a la degeneració dels bastons, els pacients afectes d'RP pateixen ceguesa nocturna i dificultats d'adaptació a la foscor. Progressivament, el camp de visió es constreny, originant el que es denomina com a visió en túnel. Durant aquesta etapa, l'agudesia visual pot romandre intacte sempre i quan es conservi una petita illa del camp de visió central. En resposta a la mort dels bastons, les cèl·lules de l'RPE migren cap a la retina nerviosa ocupant els espais vuits creats, formant dipòsits pigmentaris en forma d'espícules, els quals són observables a la perifèria dels fons d'ull dels pacients (Figura 5). També s'evidencia un apriament dels vasos sanguinis i una pal·lidesa del disc òptic. En estadis ja

més avançats, els cons es veuen també afectats, fet que ocasiona problemes en l'agudesia visual i constreny cada vegada més el camp visual, fins provocar en alguns casos la ceguesa total (Hamel 2006, den Hollander et al. 2010).

Els electroretinogrames (ERGs) mesuren l'activitat elèctrica que genera la retina en resposta als flaixos de llum, i distingeixen, depenent del flaix de llum emès, les respostes elèctriques dels bastons, dels cons o d'ambdós tipus cel·lulars alhora. Els fotoreceptors dels pacients amb RP generen unes respostes elèctriques menors que els dels individus sans, ja que produeixen menors amplituds d'ona i retards en les respostes a l'estímul lumínic (Berson et al. 1969). És per aquest motiu que els ERGs es consideren una eina bàsica i objectiva per mesurar la funció retinal i són útils per al diagnòstic de la malaltia, per a l'avaluació de la seva gravetat (Iannaccone et al. 1995, Sandberg et al. 1996), per seguir-ne el curs, per proporcionar un pronòstic visual i per a la mesura de les respostes als tractaments (Berson et al. 1993).

La mesura de l'autofluorescència present en el fons d'ull també és una eina útil a l'hora de diagnosticar els afectats d'RP. Els pacients amb retinosi pigmentària mostren majors autofluorescències que els individus sans, ja que tenen concentracions de lipofucsina més elevades a l'epiteli pigmentari. Les regions de la retina amb major autofluorescència són les que produeixen les amplituds més baixes als ERGs, en mesurar-les amb electroretinogrames multifocals (Robson et al. 2006).

Les DR presenten un elevat grau de solapament pel que fa a les característiques clíniques (Figura 6). En molts casos, les diferències entre patologies són molt subtils i, fins i tot, arbitràries, particularment quan es diagnostiquen en estadis avançats. En la majoria de les RP típiques, la pèrdua de la funció dels bastons supera la reducció de la sensibilitat dels cons. En altres casos, però, el declivi dels dos tipus de cèl·lules fotoreceptores és similar i, ocasionalment, el dèficit de cons supera en escreix el de bastons, donant lloc a l'anomenada **distròfia de cons i bastons** (CRD). Aquesta distròfia de retina, amb una prevalença d'1:40.000, presenta trets característics oposats a la RP (en alguns casos anomenada com a distròfia de bastons i cons, RCD): disminució de l'agudesia visual, defectes en la visió en color, fotoaversió, pèrdua de visió central i aparició de dipòsits pigmentaris a la màcula. No obstant, i encara que el curs clínic de la CRD és generalment més sever i ràpid que el de la RP, ambdues malalties no difereixen en els estadis finals (Hamel 2007), dificultant d'aquesta manera un diagnòstic clínic acurat. D'altra banda, en la classificació de les DR també s'estableixen diferències segons l'edat d'aparició dels primers símptomes i la severitat d'aquests. Aquest és el cas de l'**amaurosi congènita de Leber** (LCA), freqüentment classificada com una RP severa. De fet, l'LCA és la més severa de totes les distròfies de retina, causant ceguesa o problemes visuals greus abans de l'any de vida. Sovint, però, és difícil distingir el que es classifica com una RP d'aparició primerenca (*early onset* RP), diagnosticada abans dels dos anys, d'una LCA. No obstant, l'LCA presenta altres característiques clíniques, com són el nistagme, l'amaurosi i l'absència de senyals electroretinogràfics (den Hollander et al. 2008). Es tracta d'una DR rara amb una prevalença 1:30.000-1:81.000, però que explica aproximadament un 5% de les distròfies de retina i un 20% de les cegueses en la infància (Koenekoop 2004).

Altres DR, com la **malaltia d'Stargardt** o la **distròfia de cons** (CD), afecten principalment la màcula, mentre que la **ceguesa nocturna congènita estacionària** (CSNB) implica bàsicament els bastons i, a diferència de la RP, no progressa amb el pas del temps.

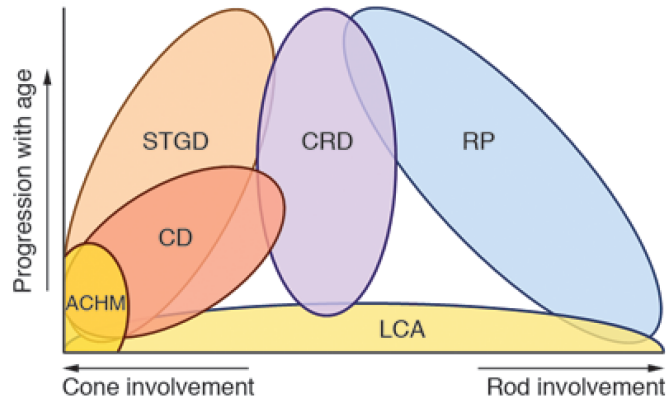


Figura 6. Heterogeneïtat fenotípica d'algunes distròfies de retina d'herència autosòmica recessiva. Pacients amb acromatòpsia (ACHM) mostren defectes estacionaris dels cons, sense afectació de bastons. En canvi, la distròfia de cons (CD) presenta afectació dels bastons en estadis avançats, difícil de distingir de la distròfia de cons i bastons (CRD). Igualment, pacients en estadis avançats de la malaltia d'Stargardt (STGD) mostren característiques solapades amb el fenotip de la CRD. La retinosi pigmentària (RP) inicialment implica una visió en túnel degut a la mort dels bastons, però quan la malaltia progressa els cons es veuen també afectats. Pacients amb amaurosi congènita de Leber (LCA) pateixen defectes en els dos tipus de cèl·lules fotoreceptores i, per tant, mostren trets característics similars a pacients amb CD, CRD o RP. Figura extreta de den Hollander et al. 2010.

## 2.2 CARACTERÍSTIQUES GENÈTIQUES

### 2.2.1 Patrons d'herència

La retinosi pigmentària és una malaltia monogènica que pot seguir qualsevol dels tres patrons típics d'herència mendeliana: autosòmic recessiu (arRP), autosòmic dominant (adRP) o lligat al cromosoma X (XL-RP). En concret, la forma més comuna és l'arRP (explica un 50-60% dels casos), seguida de l'adRP (30-40%) i, finalment, de la XL-RP (5-15%) (Hartong et al. 2006). No obstant, aquestes freqüències poden variar ja que en alguns casos és complicat distingir entre pedigrís adRP i XL-RP, sobretot degut a la semi-dominància descrita en famílies XL-RP. Fins fa poc, es pensava que la XL-RP només afectava als homes, però diversos estudis han revelat que les dones portadores de mutacions en gens XL-RP presenten una diversitat de fenotips, des de romandre asimptomàtiques fins manifestar distròfies severes semblants a la que pateixen els homes (Rozet et al. 2002, Branham et al. 2012). Així doncs, la presència de dones "afectes" juntament amb l'absència de transmissió home-home en el pedigrí, poden donar lloc a males interpretacions. A més, alguns gens adRP, com *PRPF31* o *TOPORS*, sovint manifesten fenòmens de penetrància incompleta, complicant encara més la distinció entre els patrons d'herència. Recentment, s'ha publicat que un 8,5% de famílies classificades com a adRP, així com el 15% dels casos aïllats, presenten en realitat XL-RP (Churchill et al. 2012).

També s'han descrit casos de RP d'herència atípica, com són els casos d'herència digènica (on les mutacions es presenten en heterozigosi en dos gens diferents) i no mendeliana d'herència materna (on les

mutacions es troben en gens del DNA mitocondrial). No obstant, es tracta de casos molt rars que expliquen només un 0.5-3% dels casos de pacients amb RP (Kajiwara et al. 1994, Dryja et al. 1997, Mansergh et al. 1999).

La RP, així com d'altres DR, és una malaltia principalment no sindròmica, però en alguns casos (20-30%) pot trobar-se associada a un gran llistat de síndromes, on l'ull no és l'únic òrgan afectat. Un dels més freqüents és el síndrome d'Usher, on la RP es manifesta conjuntament amb sordesa, així com el síndrome de Bardt-Biedl, on la RP o la CRD es presenten conjuntament amb obesitat, deteriorament cognitiu, problemes renals, polidactília i hipertensió (Hamel 2006).

### 2.2.2 Heterogeneïtat genètica i al·lèlica

Les distròfies de retina en general, i la RP en particular, presenten una gran heterogeneïtat genètica. Actualment, s'han descrit més de 185 *loci* i prop de 100 gens DR (RetNet: <https://sph.uth.edu/RetNet/>) (Taula 1), però s'especula que expliquen poc més de la meitat dels casos (Daiger et al. 2007, Koenekoop et al. 2007), fent que la tasca de cercar nous gens sigui una de les línies de recerca on més esforços es concentren actualment. No obstant i malgrat els avenços en seqüenciació massiva, alguns dels casos encara sense diagnosticar es deuen segurament a mutacions situades en regions reguladores, promotores o intròniques, de difícil predicció patològica o, fins i tot, a mutacions impossibles de detectar mitjançant la seqüenciació Sanger, com són les delecions en heterozigosi.

Taula 1. Nombre de gens DR classificats segons el tipus de distròfia de retina que causen i el patró d'herència que segueixen (dades extretes del RetNet, <https://sph.uth.edu/RetNet/>, última actualització: febrer 2013).

Distròfia de retina	Patró d'herència	Nombre de gens identificats	Total
Retinosi pigmentària (RP)	Autosòmic dominant	22	65
	Autosòmic recessiu	40	
	Lligat a l'X	3	
Distròfia de cons (CD) i distròfia de cons i bastons (CRD)	Autosòmic dominant	10	24
	Autosòmic recessiu	12	
	Lligat a l'X	2	
Amaurosi congènita de Leber (LCA)	Autosòmic dominant	3	19
	Autosòmic recessiu	16	
Degeneració macular (MD)	Autosòmic dominant	7	9
	Autosòmic recessiu	1	
	Lligat a l'X	1	
Ceguesa nocturna estacionària congènita (CSNB)	Autosòmic dominant	3	13
	Autosòmic recessiu	9	
	Lligat a l'X	1	

En el cas de la RP, s'han descrit més de 60 gens, on cadascun és responsable de només una petita porció de casos, fet que complica molt el seu diagnòstic genètic. No obstant, existeixen algunes excepcions que es podrien considerar "gens majoritaris", com són la rodopsina (*RHO*), responsable del 25% de casos d'arRP; la usherina (*USH2A*), que explica el 17% d'arRP (la meitat de casos associats a síndrome d'Usher); i, per

últim, el gen *RPGR* que està implicat en el 70% dels casos de XL-RP. Sovint, la resta de gens explica només un 1%, amb mutacions trobades a una o poques famílies (Hartong et al. 2006).

El fet que diferents membres d'una mateixa família, que comparteixen la mateixa mutació, presentin graus d'afectació diferents, revela l'acció de gens modificadors, on el fons genètic de cada pacient modula l'aparició i desenvolupament d'aquestes distròfies.

A part d'aquesta gran complexitat genètica, les DR també presenten una elevada heterogeneïtat al·lèlica, ja que diferents mutacions en un mateix gen causen diferents distròfies de retina, amb una clínica diferenciada en cadascuna d'elles (Figura 7). Freqüentment, aquest fet s'explica per la complexitat funcional d'un únic gen que sovint es troba implicat en diferents vies cel·lulars, l'efecte de les mutacions sobre les diverses isoformes que es generen a la retina i les interaccions d'aquestes amb els seus *partners* proteics (Berger et al. 2010). Encara avui és difícil establir correlacions genotip-fenotip, d'altra banda essencials a l'hora de realitzar el diagnòstic i el pronòstic. A més, mutacions diferents en el mateix gen poden estar implicades en casos tant d'herència dominant com recessiva, causant la mateixa o diferents distròfies. Per exemple, el gens *NR2E3*, *NRL* i *RHO*, estan implicats en arRP i adRP; mentre que el gen *RDH12* explica casos d'arLCA i adRP (vegeu també Taula 2 de l'apartat *Els gens que causen distròfies de retina: aspectes funcionals*).

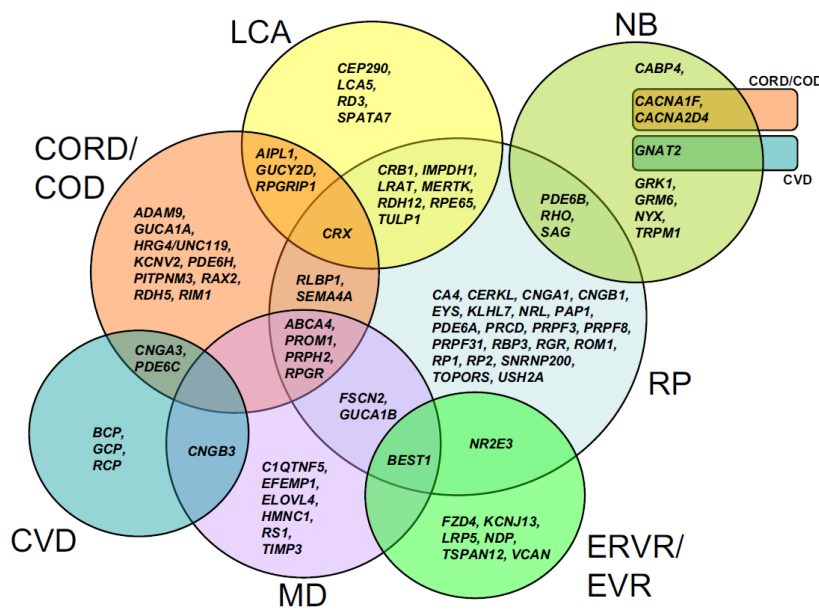


Figura 7. Heterogeneïtat al·lèlica en les distròfies de retina que es troben representades per cercles de colors. Els gens que es troben en les àrees compartides mostren com mutacions en un mateix gen poden causar fenotips diferents. RP: retinosi pigmentària, NB: ceguesa nocturna, LCA: amaurosi congènita de Leber, CORD/COD: distròfia de cons i bastons i distròfia de cons, CVD: defectes de la visió en color, MD: degeneració macular, EVR/EVR: vitreoretinopatia erosiva i exsudativa. Per exemple, el gen *ABCA4*, on s'han descrit més de 500 mutacions, està implicat en casos de MD, RP i CRD. Figura extreta de Berger et al. 2010.

### 3. EL GEN CERKL (CERamide Kinase-Like)

#### 3.1 EL LOCUS RP26

L'any 1998 el nostre grup va descriure un nou locus RP en el braç llarg del cromosoma 2 d'una família espanyola (P2) consanguínia amb una rellevant variabilitat clínica intrafamiliar (Bayés et al. 1998). Una anàlisi de cosegregació havia permès descartar els gens i loci DR descrits fins aquell moment i l'estudi de lligament mitjançant marcadors de tipus microsatèl·lit distribuïts al llarg del genoma va revelar lligament amb el marcador D2S118 a la regió 2q32, amb un *lod score* de 4,12. Més tard, es van analitzar marcadors d'aquesta regió i es va acotar l'interval de cosegregació a 11 cM a 2q31-2q33, entre els microsatèl·lits D2S148 i D2S117 (Figura 8).

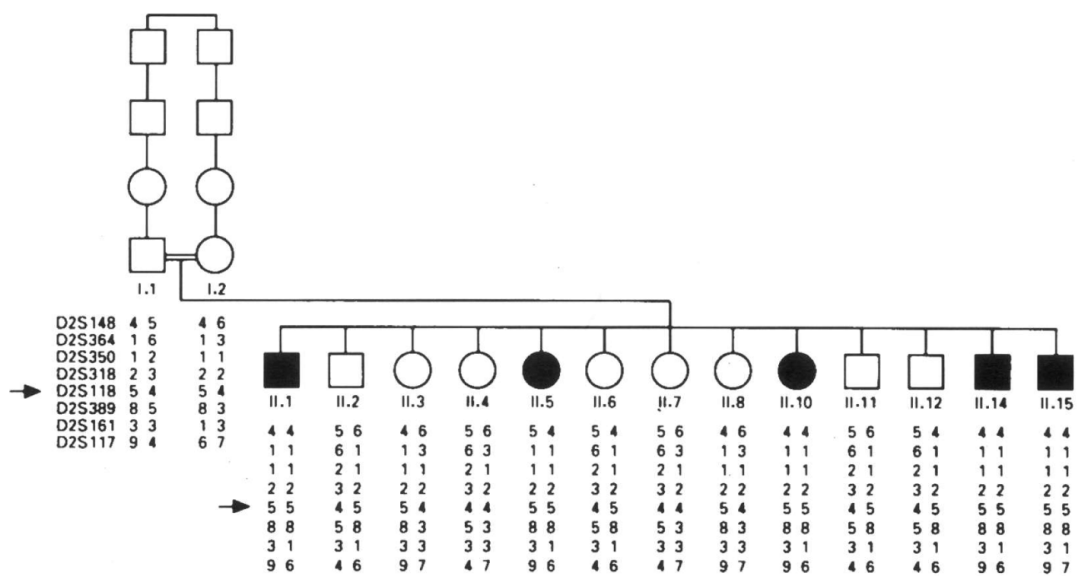


Figura 8. Pedigri de la família consanguínia P2 afecta d'arRP. S'indiquen els haplotips de cada individu dels marcadors de la regió 2q32. Imatge extreta de Bayés et al. 1998.

#### 3.2 IDENTIFICACIÓ DEL GEN CERKL

Un cop acotat, el locus RP26 abastava 17,4 Mb i contenia més de 50 gens. La publicació del genoma humà l'any 2001 va permetre l'anàlisi de nous marcadors, majoritàriament SNPs, a la regió. En una primera fase, el locus es va reduir a 12,5 Mb, i finalment l'estudi de més de 100 SNPs va permetre rebaixar la distància física fins a 2,5 Mb. Aquesta regió candidata contenia 5 gens anotats i 4 mRNAs parcialment caracteritzats, els quals van ser descartats per seqüenciació manual. Una cerca exhaustiva *in silico* va permetre la identificació d'un EST i un cDNA incomplet d'una llibreria d'ull/retinoblastoma, localitzats entre el gen *ITGA4* i *NEUROD1*. Després d'estudiar aquestes seqüències en detall i realitzar un cribratge en una llibreria de cDNA de retina, es van obtenir els 1596 nt d'un cDNA format per 13 exons que codificaven per una proteïna de 532 aa, la qual mostrava una gran homologia amb la proteïna CERK (CERamide Kinase). Per aquest motiu, el nou gen es va anomenar *CERKL*, CERamide Kinase Like (Tuson et al. 2004).

La seqüenciació de la regió codificant de *CERKL* a la família P2 va revelar una mutació sense sentit a l'exó 5 del gen (R257X; CGA->TGA) que causava una terminació prematura de la proteïna, no es trobava a la població control i cosegregava amb la malaltia en aquesta família; evidències clares a favor que *CERKL* era un nou gen RP (Tuson et al. 2004).

### 3.2.1 Estructura i expressió

Inicialment, el gen *CERKL* caracteritzat abastava 13 exons però estudis posteriors d'expressió realitzats en diversos teixits han demostrat que el gen conté 15 exons i transcriu fins a 9 isoformes (Figura 9), que es generen mitjançant *splicing* alternatiu (Tuson et al. 2004, Bornancin et al. 2005). En 8 de les 9 isoformes descrites, el primer exó és l'exó 1 inicialment caracteritzat, el qual conté un codó d'inici de traducció (TIS). En canvi, la variant *i* s'inicia en un exó alternatiu no codificant, l'exó 0. Es tracta del 5' UTR del gen *NEUROD1*, que es troba a 5' de *CERKL* i el qual presenta un elevat nivell d'expressió al sistema nerviós central. En aquest transcrit l'exó 0 s'empalma directament amb l'exó 2, saltant-se el TIS situat a l'exó 1 i, a falta de dades experimentals que ho recolzin, podent iniciar la síntesi de la proteïna a l'exó 4, on es situa el primer ATG en pauta (Figura 9).

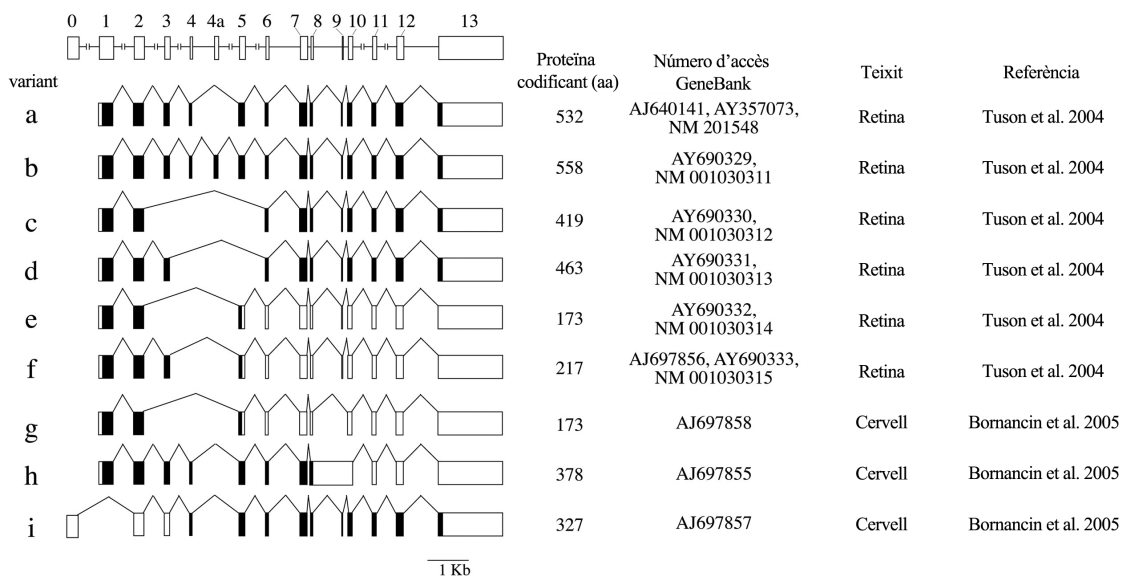


Figura 9. Representació esquemàtica de les 9 isoformes descrites per *CERKL* (variants a-i). En negre es mostren les regions codificants i en blanc les no codificants. En cada cas s'indica la mida de la proteïna resultant (en aa), el número d'accés al GeneBank, el teixit d'on s'ha aïllat i els autors. Imatge adaptada d'Auslender et al. 2007.

Tal i com s'observa a la Figura 9, la diversitat de transcrits és deguda bàsicament a fenòmens d'*splicing* entre els exons 2 i 6 del gen, que generen 4 isoformes capaces de codificar una proteïna en pauta des del primer a l'últim exó (variants *a*, *b*, *c* i *d*). En canvi, hi ha combinacions d'exons que generen codons d'aturada prematurs (PTC), que en el cas de no ser sotmesos a *non-sense mediated decay* (NMD) produïrien proteïnes truncades (és el cas de les variants *e*, *f* i *g*). L'absència d'estudis *in vivo* quantitius sobre les

isoformes de *CERKL* limita el coneixement sobre la rellevància dels transcrits abundants a la retina així com la funció d'aquests a les cèl·lules fotoreceptores, fet que dependrà dels dominis proteics codificats en cada cas.

Pel que fa a ratolí, només s'ha descrit una isoforma pel gen *Cerkl* (NM\_001048176). Es tracta de l'equivalent a la isoforma *a* humana i consta de 1759 pb que codifiquen per una proteïna de 525 aa.

A diferència del gen paràleg *CERK*, el qual es troba expressat de manera ubíqua, *CERKL* presenta una expressió més aviat específica de teixit. Diversos estudis, quantitatius i semi-quantitatius, han demostrat que en teixits adults el gen s'expressa de manera moderada a retina, cervell, ronyó, pulmó, testicles, pàncrees i fetge (Tuson et al. 2004, Bornancin et al. 2005).

La retina és un dels teixits que mostra un nivell d'expressió de *CERKL* més elevat i, a més, presenta un fet diferencial respecte a la resta de teixits; és l'únic que expressa les 4 variants que generen proteïnes en pauta des del primer a l'últim exó (variants *a*, *b*, *c* i *d*) (Tuson et al. 2009).

Recentment, estudis en rosegadors han revelat que la retina és el teixit de rata on l'expressió de *Cerkl* és més elevada, concretament 10 vegades superior a la resta de teixits on també es detecta expressió del gen. A més, estudis en ulls de ratolins, mostren que *Cerkl* s'expressa, encara en menor mesura, en altres teixits oculars a part de la retina, com són l'RPE, la coroida, l'iris i el nervi òptic (Mandal et al. 2012). Finalment, s'ha detectat expressió de *Cerkl* en l'ull murí durant el desenvolupament embrionari (E14) i a P0. No obstant, l'expressió del gen incrementa de manera notòria a P7, estadi en el qual es comencen a formar els segments externs dels fotoreceptors, però no és fins a P60 quan s'assoleix el màxim d'expressió (Vekslin i Ben-Yosef 2010, Mandal et al. 2012).

### 3.3 *CERKL*: UN GEN CAUSANT DE RP I CRD

Des de la publicació de la mutació R257X a la família P2 l'any 2004, s'han identificat fins a un total de 9 mutacions en el gen *CERKL* (Figura 10). Tal i com s'ha esmentat anteriorment, les distròfies de retina presenten una elevada heterogeneïtat al·lèlica i un bon exemple n'és el cas de *CERKL*, ja que algunes mutacions en aquest gen poden causar tant RP com CRD.

#### 3.3.1 Mutacions descrites

Un cop identificada la mutació R257X a la família P2, i mitjançant anàlisis mutacionals i de cosegregació, la mutació va ser identificada en 11 famílies espanyoles més, diagnosticades també de RP (Tuson et al. 2004, Pomares et al. 2007, Ávila-Fernández et al. 2008, Ávila-Fernández et al. 2010). Estudis sobre la freqüència dels gens causants de RP a la població espanyola han situat *CERKL* com el segon gen arRP més prevalent (5%), just per darrere d'*USH2A*. La mutació R257X ha estat associada també a la CRD, en una família d'origen alemany/anglès i una canadenca (Aleman et al. 2009, Littink et al. 2010).

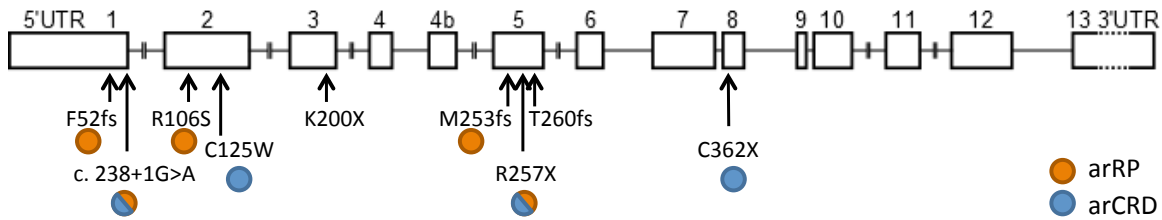


Figura 10. Mutacions patogèniques descrites a *CERKL*. S'indica la posició de cada mutació al llarg del gen amb el fenotip que causen en cada cas. De les mutacions K200X i T260fs presentades recentment (Benaglio et al. 2012) no s'ha especificat la simptomatologia clínica. arRP: retinosi pigmentària autosòmica recessiva; arCRD: distròfia de cons i bastons autosòmica recessiva.

L'any 2007, es va publicar una nova mutació identificada en 7 famílies no emparentades de jueus iemenites, c.238+1G>A, situada al donador d'*splicing* de l'intró 1 (Auslender et al. 2007). La conservació de l'haplotip al voltant de la mutació va suggerir un origen comú en totes elles. Tots els individus mostraven un fenotip sever amb afectació macular tot i que algunes de les famílies van ser diagnosticades de RP mentre que d'altres de CRD. Aquest fet posa de manifest la importància del fons genètic en la progressió i severitat de la malaltia, i evidencia la complexitat d'establir relacions genotip-fenotip a l'hora d'oferir un pronòstic acurat. L'efecte patogènic d'aquesta mutació va ser comprovat mitjançant la generació d'un minigen, el qual va revelar problemes en l'*splicing* del mRNA. Un any més tard, el 2008, es publicava una altra mutació en una família arRP consanguínia d'origen paquistanès. En aquest cas es tractava d'un canvi aminoacídic en un residu altament conservat, R106S, situat en un dels dominis suposadament important pel transport intracel·lular de *CERKL* (Ali et al. 2008). Una altra mutació de canvi de sentit es va descriure a l'exó 2, C125W, en una família arCRD canadense (Littink et al. 2010).

A part de les mutacions en homozigosi esmentades anteriorment, s'han descrit casos d'heterozigosi composta al gen *CERKL*. En una família d'origen alemany/anglès diagnosticats de CRD s'ha trobat la mutació R257X en heterozigosi composta amb una altra mutació sense sentit a l'exó 8, C362X. En una altra família del mateix origen, també afecta de CRD, s'ha trobat en heterozigosi la mutació R257X, però encara manca l'altra alteració (Aleman et al. 2009). Finalment, en una família xinesa arRP s'han descrit les mutacions c.156\_157insT (p.F52fs) i c.758delT (p.M253fs), també en heterozigosi composta (Tang et al. 2009).

### 3.4 CERKL: UNA PROTEÏNA ÒRFENA DE FUNCIÓ

#### 3.4.1 Homologies amb CERK i dominis proteics

Anàlisis comparatives i filogenètiques van agrupar *CERKL* a la subfamília de les quinases de lípids. La proteïna més propera a *CERKL* va resultar ser la quinasa de ceramides (*CERK*), encara que també es van identificar homologies amb les quinases d'esfingosines (*SPHK1* i *SPHK2*) i les diacilglicerol quinases (*AGK*) (Tuson et al. 2004). *CERKL* i *CERK* mostren un 50% de similituds i un 26% d'identitats i posseeixen una estructura força semblant compartint la majoria dels dominis.

El gen *CERK* es troba situat al cromosoma 22 i, fins el moment, s'ha descrit una única isoforma de mRNA que conté 13 exons (NM\_022766) els quals codifiquen per una proteïna de 537 aa. *CERK* participa en el metabolisme dels esfingolípids, una família de lípids amfipàtics essencials pel manteniment de l'estructura de les membranes de les cèl·lules eucariotes (Riboni et al. 2010). Concretament, la proteïna *CERK* és la responsable de fosforilar les ceramides (Cer), un tipus de lípid format per una base esfingoide i un àcid gras de longitud i nombre d'insaturacions variable, a ceramida-1-fosfat (C1P). L'augment de Cer a la cèl·lula es troba relacionat amb la inducció de l'apoptosi, mentre que la C1P participa en senyalitzacions de creixement i supervivència, així com d'estimulació de síntesi de DNA i divisió cel·lular (Gómez-Muñoz et al. 1997). L'equilibri entre aquestes dues molècules actua de reòstat, regulant les respostes de mort o proliferació cel·lular (Figura 11) (Pettus et al. 2002).

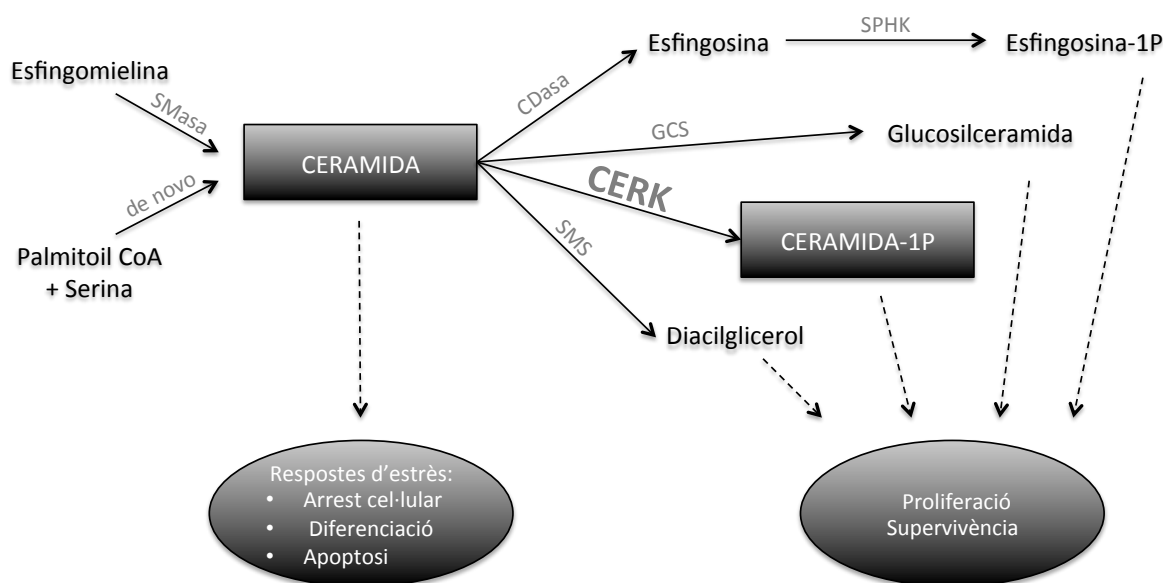


Figura 11. Esquema del metabolisme dels esfingolípids amb les vies de senyalització cel·lular desencadenades per la presència de les diferents molècules. *CERK* fosforila la ceramida, la qual promou respostes d'estrès cel·lular com l'apoptosi, a ceramida-1P, que estimula la proliferació. L'equilibri entre aquestes dues molècules actua de reòstat cel·lular. SMasa: esfingomièlina; CDasa: ceramidasa; SPHK: esfingosina quinasa; GCS: glucosilceramida sintasa; *CERK*: ceramida quinasa; SMS: esfingomièlina sintasa.

*CERK* és una fosfotransferasa que utilitza l'ATP com a donador de fosfat primari per tal de fosforilar la Cer a C1P. *CERKL* comparteix amb *CERK* el domini diacilglicerol quinasa (DAGK), especialment conservat entre les quinases d'esfingolípids. A més, entremig del DAGK, *CERK* conté un lloc d'unió ATP, el motiu *GGDG*, el qual es troba també a *CERKL* (Figura 12) (Bornancin et al. 2005).

L'extrem N-terminal de *CERK* conté un domini d'homologia a plextrina (PH), el qual juga un paper essencial en la localització subcel·lular de la proteïna i l'associació d'aquesta a les membranes cel·lulars (Carre et al. 2004). A diferència de *CERK*, a l'N-terminal de *CERKL* hi trobem una seqüència exclusiva rica en aminoàcids arginina, àcid glutàmic, prolina i alanina (anomenada per alguns autors caixa REPA), però a continuació d'aquesta s'hi troba una regió que mostra homologia amb el domini PH de *CERK*. A més, els residus carregats positivament, crítics pel plegament i funcionalitat d'aquest domini, es troben conservats amb *CERK* (Rovina et al. 2006).

CERK	1	MG-----ATGAAEP--	9	
		M	AAE	
CERKL	1	MPWRRRRNRVSALEGGREEEAPPEAAAVPALLTSFQQTEAAAERIL	47	"REPA box"
CERK	10	LQSVLWVKQQRCAVSLPARALLRWRSFPGGAGAPGADACSVVSEIIAVEET-DVHGK	68	
CERKL	48	LRGIFEIFGRSDCVVLSE-RALR--WRPIQPERPAGDSKYDLLCKEPIELKIDIFSVKLK	104	
		L+ + + C V L RAL WR P A + + E I +++ V K		
CERK	69	HQSGSKWQKMEKPYAFTVHCVKRRRRHRWKAQVTFWCPEEQCHLWLQTLREMLEKLT	128	PH domain
CERKL	105	RSRQVQQRSGTLLGITLFI <del>CLKKEQNKLN</del> STLDLNLSEDHCDI <del>WFRQFKKILAGFPN</del>	164	
		+ S K Q+ T+ + +++ K + + E C +W + +++L +		
CERK	129	RPKLLLVFNPFGGKQKRIYERKVAFLPTLASITTDIIVTEHANQAKETLYEINIDKY	188	
CERKL	165	RPKSLKILLNPQSHKKEATQVYVEKVEPLKLAGIKTDVTIMEYEGHALSLKCELOGF	224	
		RPK L + +NP K + ++Y KV PL LA I TD+ + E+ A L E + +		
CERK	189	DGIVCVGGDGFSEVHLGLIGRTQRSAGVDQNHPRAVLVP--SSLRIGIIPAGSTDCVCY	246	DAGK domain
CERKL	225	DGVVCGGDSSEVAHALLLRAQKNAGMETDR--ILT <del>FPVRAQLPLGLIPAGSTNVLAH</del>	281	
		DG+VCGGGD SEV H L+ R Q++AG++ + +L P + L +G+IPAGST+ + +		
CERK	247	STVGTSDAETSALHIVGDSLAMDVSSVHHNSTLLRYSVSLGQYFYGDIKDKSEKRWL	306	
CERKL	282	SLHGPHVITATLHIMGHVQLVDVCTFSTAGLLRFGFSAM-FGFGGRTLALAEKYRWM	340	
		S G T+ LHI++G +DV + LLR+ S + +GF G + +EK RW+		
CERK	307	G-LARYDFSGLKTFSLSHHCYEGTVSFLPAQHTVGS <del>PRDRKPCRAGCFVC</del> RQSKQLEEEQ	365	CC1
CERKL	341	SPNQRDFAVVKALAKLKAEDCEISFLPFNSS-----DDVQ	376	
		R DF+ +K + +SFLP + ++ Q		
CERK	366	KKALYGLEAAEDVEE <del>WQVCGKFLAINATNMSCACRRSPRGLSPAHLGDGSSDLILIRK</del>	425	CC2
CERKL	377	ERRAQGSPKSDCNDQ <del>WMIQGGFLNVSIMATPCLCSVAPRGLAPNTRLNNGSMALITARN</del>	436	
		++ G ++ ++WQ++ G+PL ++ + C C +PRGL+P L +GS LI+ R		
CERK	426	CSRFNFLRFLIRHTNQDQDFTFVEVYRVK <del>KFQFTSKH-----MEDESDLKEGGK</del>	478	
CERKL	437	TSRPEFIKHLKRYASVKNQFNFPVETTV <del>EEVKVHPRNNTGGYNPEEEDFTASE----</del>	492	"DE box"
		SR F++ L R+ + ++QF+F FVE Y V++ + ++ E+ED E		
CERK	479	RFGHICSSHPSCCCTVSNS <del>WNCDEVLH-SPAIEVRVHCQLVRLFARGIEENPKPDSHS</del>	537	
CERKL	493	-----NC-----FP <del>NVVDGLMEVASEVHIRLHPRLISLYGGMEEMI----</del> PK	532	CC3
		+C WN DG+++ + + +R+H +L+ L+ +EE		

Figura 12. Alineament de CERK i CERKL. Es mostren les regions conservades en diferents colors. La conservació aminoacídica s'indica entre les dues seqüències en gris. "+" denota aminoàcids similars. El domini plextrina (PH) de CERK i CERKL conté residus positivament carregats crítics pel seu correcte plegament (subratllats en blau). El lloc d'unió a ATP GGDG del domini DAGK es troba enquadrat. El motiu  $C_{347}$ RAGCFVC $_{354}$  de CERK entre els blocs conservats CC1 i CC2 s'assenyala subratllat en negre. Subratllat en verd s'indica el domini calci/calmodulina de CERK present en el domini CC2. El motiu ric en aminoàcids arginina, àcid glutàmic, prolina i alanina (caixa REPA, en blau) exclusiu de CERKL es troba davant del domini PH. Entre els dominis CC2 i CC3, CERKL i CERK contenen una regió rica en àcid aspàrtic i glutàmic (caixa DE, en rosa). Imatge adaptada de Rovina et al. 2009.

Els alineaments entre aquestes dues proteïnes mostren 3 dominis més amb homologies, anomenats dominis de conservació CC1, CC2 i CC3, els quals mostren un 35%, 41% i 32% de similitud, respectivament (Figura 12). El primer i el tercer mostren una conservació parcial amb les quinases d'esfingosines, mentre que el segon no té cap equivalent. Entre els dominis CC1 i CC2 de CERK s'hi troba el motiu ric en cisteïnes ( $C_{347}$ RAGCFVC $_{354}$ ), absent a CERKL però crucial per l'activitat quinasa de CERK (Bi et al. 2011). Al domini CC2 de CERKL, la presència d'un residu prolina (P440) altera la conservació del domini calci/calmodulina descrit a CERK (Rovina et al. 2009).

Tant CERK com CERKL contenen dominis que regulen el seu transport intracel·lular, en l'entrada i sortida del nucli. No obstant, aquests dominis no són compartits ja que mentre CERK té un domini d'entrada a nucli (*nuclear localization signal*, NLS) i un d'exportació a citoplasma (*nuclear export signal*, NES), CERKL conté 2 NLS (que es troben a la regió d'N-terminal) i 2 NESs (a C-terminal) (Inagaki et al. 2006, Rovina et al. 2009).

Tenint en compte la posició de les mutacions descrites a CERKL, aquestes es concentren principalment a la regió N-terminal de la proteïna, afectant bàsicament als dominis PH i DAGK (Figura 13). El fet que les mutacions no es trobin distribuïdes uniformement al llarg de la proteïna podria ser degut a l'existència d'una regió calenta (*hotspot*) amb més elevada taxa mutagènica en els primers exons del gen, rics en nucleòtids C i G, o bé al fet que canvis a la regió C-terminal, amb menys dominis funcionals descrits, no siguin deleteris. La majoria dels canvis nucleotídics descrits associats a RP o CRD són mutacions sense sentit o de canvis en la pauta de lectura (*frameshift*), les quals comporten l'aparició de codons *stop* prematurs que podrien afectar a la viabilitat del mRNA. Les mutacions de canvi d'aminoàcid es troben en residus conservats dels dominis NLS2 (R106S) i PH (C125W).

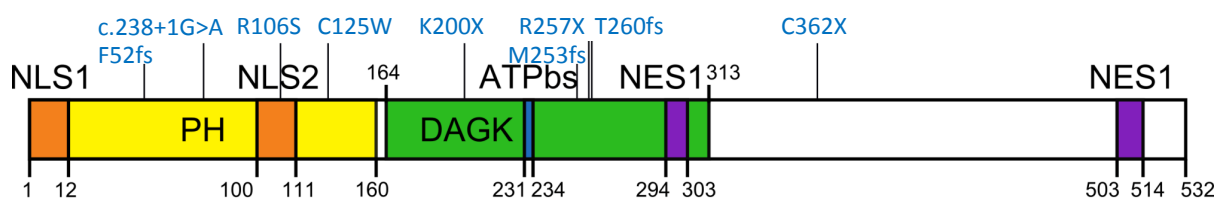


Figura 13. Representació dels dominis proteics de la isoforma *a* de CERKL. S'indiquen les posicions de les mutacions descrites. PH: homologia a plextrina; DAGK: diacilglicerol quinasa; NLS: senyal de localització nuclear; NES: senyal d'exportació nuclear; ATPbs: lloc d'unió a ATP.

### 3.4.2 Localització cel·lular

Tot i les homologies, CERK i CERKL mostren diferent patró de localització subcel·lular. En cèl·lules transfectades, CERK s'acumula a l'aparell de Golgi i a les vesícules unides a microtúbuls que trafiquen entre el Golgi i la membrana plasmàtica (Rovina et al. 2006). En canvi, la localització de CERKL analitzada en cèl·lules en cultiu COS-7 i HeLa és molt més dinàmica i compartimentada, movent-se entre el citoplasma i el nucli (Figura 14). Al citoplasma, CERKL es pot trobar distribuïda uniformement o bé formant cúmuls perinuclears. En algunes cèl·lules, a més, CERKL es troba també present als nuclèols. Cal remarcar que aquest patró de localització és comú a totes les 4 isoformes amb pauta de lectura oberta des del primer a l'últim exó (variants *a*, *b*, *c* i *d*) (Rovina et al. 2009, Tuson et al. 2009).

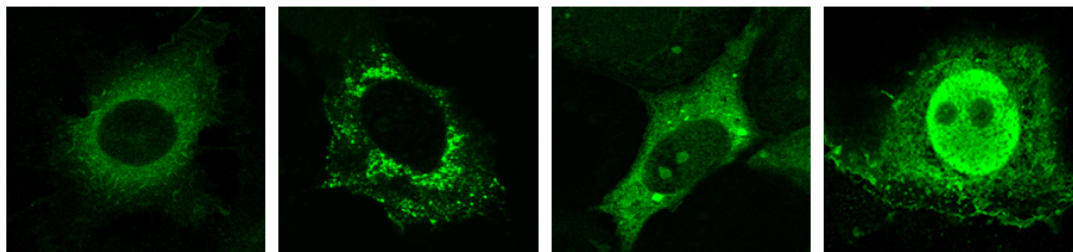


Figura 14. Localització subcel·lular de la isoforma "a" de CERKL transfectada en cèl·lules COS-7. CERKL mostra una localització dinàmica trobant-se distribuïda uniformement al nucli, amb marcatge de nuclèol o sense, i al citoplasma. En algunes cèl·lules s'observen cúmuls perinuclears de CERKL.

Anàlisis amb diferents marcadors d'òrgànuls cel·lulars en cèl·lules HeLa han demostrat una associació parcial de CERKL amb les membranes del reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi. Aquesta localització s'ha confirmat en estudis de fraccionament cel·lular mitjançant gradients de sucrosa (Tuson et al. 2009).

### 3.4.3 Estudis funcionals

Malgrat les homologies amb CERK, tots els assajos *in vitro* i *in vivo* han fracassat a l'hora de demostrar l'activitat quinasa de CERKL (Bornancin et al. 2005, Inagaki et al. 2006, Tuson et al. 2009, Garanto et al. 2013). CERKL sembla no fosforilar ceramides ni tampoc cap altre esfingolípíd, incloent la C2-, C6-, C8- i C18-Cer, C1P, la dihidroceramida, la fitoceramida, la glucosilceramida, el diacilglicerol, esfingosina, i els esfingolípíds complexos com són els sulfàtids, els cerebròsids i els gangliòsids. A més, canvis en el pH o la concentració de NaCl, o l'ús de GTP enlloc d'ATP com a font d'energia, no estimulen l'activitat de la proteïna. Per últim, la presència d'extractes lipídics de cervell o ronyó, així com de micel·les de cèl·lules precursors de fotoreceptors, tampoc activen la fosforilació per part de CERKL. De fet, en els últims anys s'ha posat en entredit la funció de CERKL com a quinasa de lípids.

L'any 2009 el nostre grup va demostrar que CERKL desenvolupa un rol protector en cèl·lules COS-7 en front de l'apoptosi causada per estrès oxidatiu. La sobreexpressió de qualsevol de les 4 isoformes de CERKL (variant *a*, *b*, *c* i *d*) en cèl·lules tractades amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> retardava l'entrada a fase de mort cel·lular. Aquest efecte protector va resultar ser depenent del tipus d'inductor d'estrès (ja que CERKL perdia eficàcia si l'agent inductor era el nitroprussiat de sodi o l'absència de FBS) i del temps d'exposició a aquest. De fet, l'efecte protector era ja evident a les 12 h de tractament, però arribava al seu màxim a les 24 h (amb un 50% de disminució de la mortalitat cel·lular) (Tuson et al. 2009).

Recentment, s'han descrit potencials *partners* proteics de CERKL (Nevet et al. 2012). La metodologia emprada es basa en un experiment de doble híbrid amb una genoteca de retina bovina i diferents construccions de la isoforma murina truncada (NM\_001048176). Els autors han obtingut 15 clons positius i un total de 9 possibles candidats, tres dels quals pertanyen a la família de les proteïnes neuronals sensores de calci (NCS): GCAP2, implicada en distròfies de retina, recoverina i CIB1, les quals intervenen directament en la fototransducció. La interacció d'aquestes 3 proteïnes, així com de dues més de la família de les NCS, GCAP1 (homòleg proper a GCAP2 i responsable també de DR) i neurocalcina D, amb CERKL s'ha confirmat mitjançant assajos de co-immunoprecipiació. Malgrat això, l'absència de dades que recolzin el paper de CERKL en la fototransducció qüestiona aquests resultats. Els autors hipotetitzen que l'activitat quinasa de CERKL pot dependre de la interacció amb alguna d'aquestes proteïnes NCS. No obstant i després de diversos assajos, no han obtingut resultats a favor d'aquesta activitat.

## 4. EL GEN *RP2* (*Retinitis Pigmentosa 2*)

### 4.1 *RP2*: GEN CAUSANT DE RP LLIGADA AL CROMOSOMA X

Tal i com s'ha comentat anteriorment, la RP lligada al cromosoma X (XL-RP) és la forma minoritària de la malaltia (5-15% dels casos) i es caracteritza per una aparició primerenca i severa dels símptomes. En alguns pacients s'associa també al desenvolupament anormal dels espermatòzous i a dificultats auditives i respiratòries, fet que posa en evidència el fons ciliar de la malaltia (Iannaccone et al. 2003, Zito et al. 2003). Fins l'actualitat s'han mapat 6 *loci* responsables de XL-RP al cromosoma X, però només en 3 d'aquests s'ha identificat el gen causal: *RPGR* (RP3), *RP2* i *OFD1* (RP23), tots ells implicats en el transport ciliar en els fotoreceptors. *RPGR* és el gen XL-RP més comú i explica el 70% dels casos XL-RP, més del 15% dels casos aïllats i un 8% de les formes diagnosticades com a dominants (Churchill et al. 2013). Aproximadament, el 60% de les mutacions identificades a *RPGR* es situen a l'exó ORF15 (de l'anglès, *Open Reading Frame*), compostat d'una seqüència altament repetitiva i rica en purines que s'allarga 1,6 kb. Aquest tipus de seqüències sovint provoquen l'aturada o lliscament de la DNA polimerasa durant la replicació i causa delecions (Vervoort et al. 2000). L'exó ORF15 forma part del transcrit majoritari d'aquest gen a la retina, d'entre els més de 20 generats a partir d'*splicing* alternatiu (Neidhardt et al. 2007). Per aquesta raó, l'anàlisi mutacional d'aquesta regió *hotspot* d'ORF15 és imprescindible pel diagnòstic genètic, encara que requereix una estratègia metodològica alternativa més elaborada que la seqüenciació directa.

Les mutacions del gen *RP2* expliquen aproximadament un 15% dels casos XL-RP i aquestes, a diferència de *RPGR*, es distribueixen uniformement al llarg de tot el gen. Finalment, el gen *OFD1*, prèviament implicat en diverses ciliopaties sindròmiques, ha estat proposat recentment com el responsable de XL-RP del locus RP23 (Webb et al. 2012).

En la majoria dels casos, les famílies XL-RP presenten una herència recessiva on els homes presenten un fenotip agressiu, mentre que les dones portadores són majoritàriament asimptomàtiques o mostren una variabilitat d'afectacions lleus (Fishman 1978). Aquest fenotip s'explica pel mecanisme d'inactivació a l'atzar d'un dels dos cromosomes X, fet que implica que l'expressió de l'al·lel sa en la meitat de les cèl·lules d'un teixit és suficient pel correcte funcionament d'aquest. Malgrat en la majoria de casos el patró d'herència en les famílies XL-RP és recessiu, s'han descrit casos de semi-dominància associada a *RPGR*, on les dones manifesten degeneració retinal, tot i que, generalment, de manera menys severa i d'aparició més tardana que els homes afectes de la mateixa família (Churchill et al. 2013). Probablement això es deu a la inactivació no atzarosa o esbiaixada del cromosoma X, fet que implicaria que la majoria de les cèl·lules del teixit afectat expressin l'al·lel mutat (Aguirre et al. 2002). Aquesta hipòtesi es veuria reforçada pel fet que en les revisions oftalmològiques acurades, algunes dones presenten asimetries entre els dos ulls (Vajaranant et al. 2002). No obstant i malgrat no es pot realitzar un assaig *in vivo* de la inactivació del cromosoma X a la retina, diversos estudis a partir de mostres de sang de portadores afectes de XL-RP, demostren que no existeix un biaix en la inactivació d'aquest cromosoma. Per això, alguns autors proposen el fons genètic com a modulador de la severitat de la malaltia, amb gens modificadors que regularien l'expressió o estabilitat de *RPGR* (Banin et al. 2007, Neidhardt et al. 2008). Així doncs, els mecanismes pels quals es presenta semi-dominància o recessivitat en les famílies XL-RP és, encara, discutible. No obstant, queda clar que les causes que determinen la semi-

dominància en la RP lligada al sexe no depenen del gen, ja que l'únic implicat en casos de semi-dominància és *RPGR* (fins l'inici d'aquest treball), i tampoc depenen de la mutació, ja que una mateixa variant ha estat implicada en els dos tipus d'herència (Banin et al. 2007).

### 4.1.1 Estructura i expressió

El gen *RP2* es situa al braç petit del cromosoma X i està format per 5 exons que transcriuen una sola isoforma de 3831 pb (NM\_006915.2) que codifica per una proteïna de 350 aa. Es tracta d'un gen d'expressió ubíqua, encara que fins el moment totes les mutacions identificades han estat associades només a la RP.

Anàlisis estructurals tridimensionals amb rajos X han demostrat que *RP2* conté dos dominis proteics; a l'extrem N-terminal una seqüència que presenta homologia amb la xaperona específica del cofactor C de la tubulina (*C-CAP/ cofactor C-like domain*), i a C-terminal una regió d'homologia a les nucleòsid difosfat quinases (NDPK) (Kuhnel et al. 2006). Es creu que *RP2* actua com a GAP (*GTPase activating protein*) d'Arl3 (*ADP ribosylation factor-like 3*), un membre de la família de les proteïnes petites d'unió a GDP implicada en la transducció del senyal en la fototransducció i en processos de transport cel·lular. *RP2* interactua amb Arl3 mitjançant els primers 35 aminoàcids (Cavenagh et al. 1994, Vetter et al. 2001). Encara que la funció exacte d'aquest *partner* proteic de *RP2* no es coneix, s'ha vist que és important per la integritat dels microtúbuls, així com pel manteniment de les estructures ciliars (Cuvillier et al. 2000, Avidor-Reiss et al. 2004). De fet, ambdues proteïnes, *RP2* i Arl3 localitzen a l'aparell de Golgi i a la base del cili connector dels fotoreceptors, des d'on semblen regular l'assemblatge i el tràfic de complexos proteics associats a la membrana del cili (Schwarz et al. 2012). Diferents estudis han demostrat que modificacions post-traduccionals de miristoilació i palmitoilació al domini N-terminal de *RP2* són essencials per la seva localització al cos basal i l'associació amb Arl3, respectivament (Chapple et al. 2000, Chapple et al. 2002, Evans et al. 2010).

### 4.1.2 Mutacions descrites

L'any 1998 es va identificar el gen responsable del locus *RP2*, el qual es va anomenar amb el mateix nom, *RP2* (Schwahn et al. 1998). Des de llavors s'han descrit més de 70 mutacions, la majoria d'elles implicades en canvis d'aminoàcid en el producte proteic (Figura 15).

A diferència de *RPGR*, les mutacions identificades a *RP2* es troben situades al llarg de tot el gen. A més, a *RP2* no existeixen evidències de guany de funció com s'ha descrit per mutacions de truncament proteic situades a l'exó ORF15 de *RPGR*, que actuen com al·lèls dominants desencadenant un fenotip molt més sever que el provocat per mutants nuls (Hong et al. 2004, Hong et al. 2005).

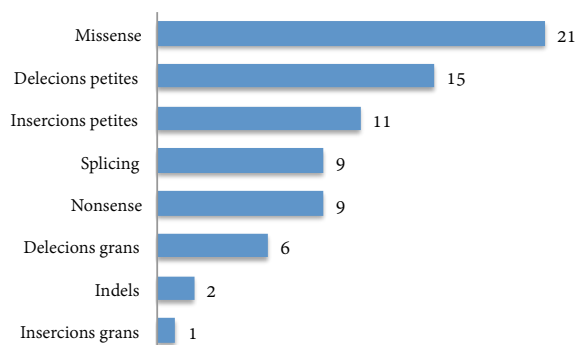


Figura 15. Classificació del tipus de mutacions identificades a RP2. S'indica el nombre de variants descrites en cada cas. Dades extretes de la base de dades HGMD (Human Gene Mutations Database, [www.hgmd.cf.ac.uk](http://www.hgmd.cf.ac.uk), última actualització: abril 2012).

En el cas de les mutacions *missense* de *RP2*, aquestes es situen principalment a l'extrem N-terminal de la proteïna, fet que indica la importància del domini C-CAP (Figura 16). La majoria d'aquestes mutacions semblarien desestabilitzar l'estructura de la proteïna afectant-ne el seu plegament (Kuhnel et al. 2006), mentre que d'altres afecten els motius de miristoilació o d'unió a Arl3 importants per la correcta localització i funció de RP2. De fet, la mutació *missense* de *RP2* diagnosticada més freqüentment en els pacients XL-RP afecta el residu més important per l'activitat GAP. Es tracta de l'Arg118 que s'ha trobat mutada a His, Leu o Lys (Vetel i Wittinghofer 2009).

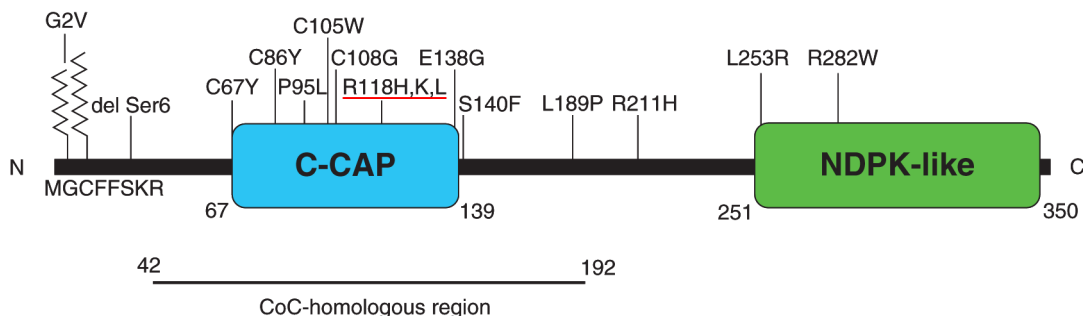


Figura 16. Dominis estructurals de RP2. A N-terminal el domini xaperona específica de tubulina (C-CAP, *Cofactor C-like*) i a C-terminal la regió homòloga a les nucleòsid difosfat quinases (NDPK). S'indiquen les mutacions *missense* identificades en pacients XL-RP. S'assenyala en vermell la mutació *missense* més freqüent que afecta un residu clau per l'activitat GAP. Imatge extreta de Vetel i Wittinghofer 2009.

Pel que fa a les mutacions d'*splicing*, se n'han descrit un total de 9 en els introns del gen *RP2* (Figura 15), encara que són pocs els casos on s'han realitzat estudis *in vivo* o *in vitro* per avaluar-ne el seu impacte (Prokisch et al. 2007). Aquestes mutacions es situen al lloc donador i acceptor d'*splicing* de l'intró 1, a l'acceptor dels introns 2 i 3 i al donador de l'intró 4.

## 5. ELS GENS QUE CAUSEN DISTRÒFIES DE RETINA: ASPECTES FUNCIONALS

Malgrat en les distròfies de retina el mecanisme de degeneració és generalment comú en tots els casos -la mort per apoptosi dels fotoreceptors-, els diferents gens que s'hi troben implicats afecten un gran ventall d'aspectes estructurals i funcionals de la cèl·lula fotoreceptora.

El 1990 es va identificar el primer gen causant de retinosi pigmentària, la rodopsina (*RHO*), que codifica pel pigment visual dels bastons (Dryja et al. 1990). Des de llavors, a mesura que s'han identificat nous gens i se n'ha estudiat la funció, s'ha establert una classificació funcional que els agrupa segons els processos cel·lulars en els que participen. Existeixen mutacions en gens que afecten mecanismes específics de les cèl·lules de la retina, com són la fototransducció o el metabolisme del retinol, les quals són poc més freqüents que les mutacions que afecten gens implicats en funcions cel·lulars generals, com són el processament del mRNA o el metabolisme dels lípids. A més, sorprenentment, són pocs els gens que mostren una expressió restringida a les cèl·lules de la retina, ja que la majoria mostren patrons d'expressió ubíqua. En aquest últim cas, el fet que els fotoreceptors siguin cèl·lules altament especialitzades i polaritzades, les quals necessiten recanvis constants d'estructures cel·lulars, explicaria que la retina sigui l'únic teixit afectat. No obstant, la funció redundat d'altres proteïnes a la resta de teixits, però no a la retina, també podrien explicar aquestes situacions. Tal i com s'observa a la Figura 17, el transport ciliar és la categoria que agrupa més gens, seguida de la fototransducció.

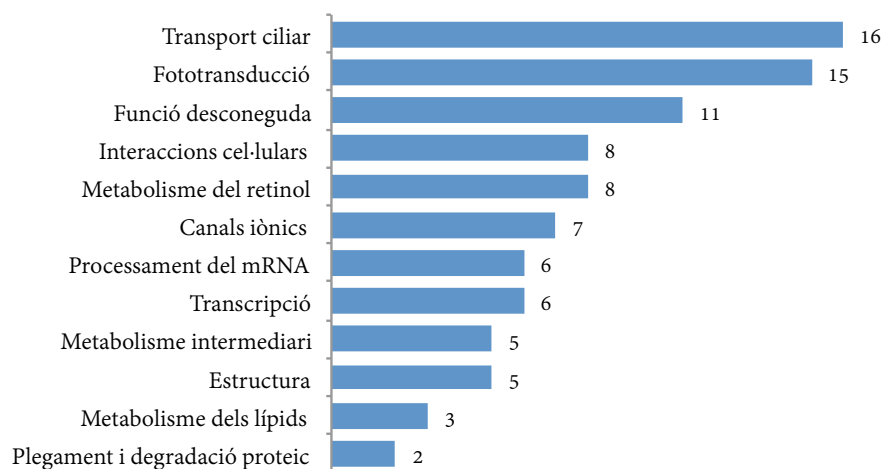


Figura 17. Classificació funcional dels 92 gens implicats en les distròfies de retina no sindròmiques. S'indica el nombre de gens que formen part de cada categoria.

En aquest apartat es repassen les característiques més importants de les diferents categories en les que s'han classificat els 92 gens implicats en les principals distròfies de retina. Encara que sovint alguns gens es veuen implicats en més d'una via funcional, la classificació reflexa la principal funció que desenvolupen, la qual queda recollida a la Taula 2 (al final d'aquesta secció, pàgina 38), on també s'indica l'associació genopatologia i el tipus d'herència de la malaltia. Cal tenir en compte que la caracterització dels gens responsables de DR es va basar inicialment en l'estudi de *candidats funcionals*, independentment de la seva posició al

genoma. D'aquesta manera es varen identificar diversos gens DR implicats en la fototransducció i el metabolisme del retinol, com són la subunitat  $\alpha$  de la fosfodiesterasa 6 (*PDE6A*), la lecitina aciltransferasa (*LRAT*) o el receptor unit a proteïna G de l'epiteli pigmentari de la retina (*RGR*). Aquestes dues categories funcionals són, doncs, les més àmpliament estudiades amb un major coneixement de la participació dels gens que en formen part. No obstant i malgrat que actualment es coneixen els processos generals en els quals participen la majoria dels gens DR de la resta de categories, encara es desconeix la contribució concreta de cadascun d'ells en la degeneració dels fotoreceptors. Fins i tot, hi ha una sèrie de gens dels quals es desconeix totalment la funció (orfes de funció), ja sigui perquè són gens poc caracteritzats o bé perquè els estudis funcionals que s'han realitzat fins el moment han fracassat a l'hora d'aportar pistes fiables. *CERKL*, juntament amb d'altres gens, es troba classificat en aquest últim apartat (*Funció desconeguda* a la Figura 15 i a la Taula 2). No obstant, les diferents anàlisis publicades sobre la localització cel·lular i els *partners* proteics podrien acostar *CERKL* a alguna de les categories funcionals, a falta de més dades que ho recolzin.

## 5.1 LA FOTOTRANSDUCCIÓ

En la fototransducció, els fotons de la llum són absorbits pels fotoreceptors, fet que desencadena una cascada de senyals que culmina en la hiperpolarització de la membrana de la neurona i en l'alliberament del neurotransmissor, el glutamat, a la sinapsi nerviosa.

Principalment, aquest mecanisme té lloc als segments externs dels fotoreceptors (Figura 18). En el cas dels bastons, els discs d'aquests segments contenen grans quantitats de rodopsina (codificada pel gen *RHO*), la qual es troba unida al cromòfor 11-*cis*-retinal. En el procés de la fototransducció, i com a resultat de l'absorció d'un fotó, l'11-*cis*-retinal s'isomeritza a tot-*trans*-retinal i la rodopsina pateix tot un seguit de canvis conformacionals, esdevenint rodopsina fotoactivada ( $RHO^a$ ). Un cop la rodopsina és fotoactivada, s'inicia la cascada de fototransducció mitjançada per la unitat  $\alpha$  de la transducina (codificada pel gen *GNAT1*) i les diferents subunitats de les fosfodiesterases (*PDE6A*, *PDE6B*, *PDE6C* i *PDE6G*). En conseqüència, es produeix una davallada del missatger cGMP, fet que provoca el tancament dels canals iònics (subunitats  $\alpha$  i  $\beta$  del canal catiónic dels bastons, *CNGA1* i *CNGB1*; i subunitats  $\beta$  del canal catiónic dels cons, *CNGB3*), amb la consegüent hiperpolarització de la membrana plasmàtica i alliberament del glutamat (Yau i Hardie 2009). Un dels receptors del glutamat, codificat pel gen *GRM6*, s'ha descrit com a responsable d'una forma de ceguesa nocturna estacionària congènita (Dryja et al. 2005).

Un cop culminada la fotoactivació, la cèl·lula entra en una fase de recuperació que consisteix en la desactivació de la rodopsina i el restabliment de cGMP i calci. La desactivació implica la fosforilació de la *RHO* per part d'una quinasa específica (*GRK1*). Tot seguit, la proteïna arrestina (*SAG*) s'uneix a la rodopsina fosforilada bloquejant el lloc d'unió a *GNAT1*. La recuperació dels nivells de cGMP, que permet la reobertura dels canals iònics i la consegüent despolarització de la membrana plasmàtica, és responsabilitat d'una guanilat ciclasa (*GUCY2D*) i de les seves proteïnes activadores, *GCAP1* i *GCAP2*, les quals s'han descrit recentment com a candidats a *partners* proteics de *CERKL* (Nevet et al. 2012).

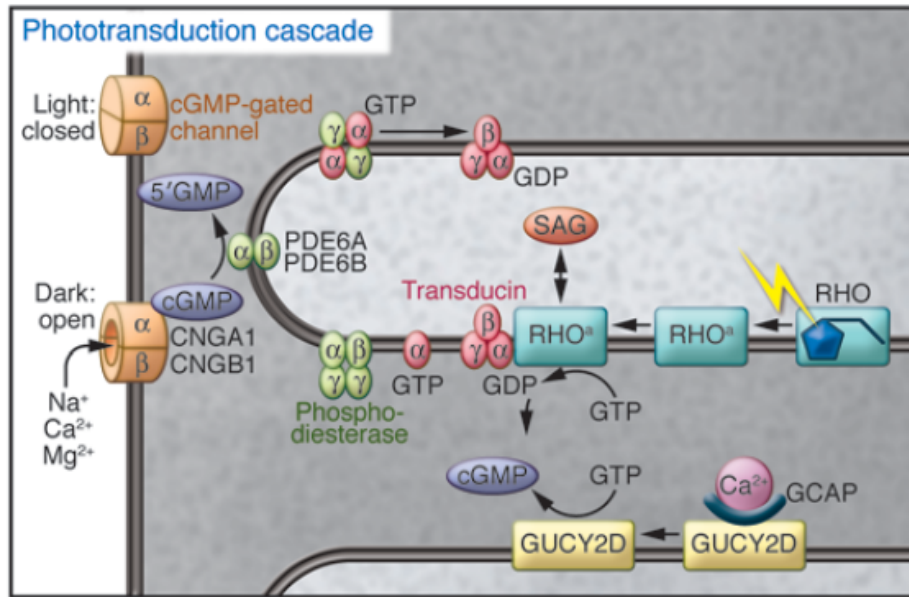


Figura 18. Representació esquemàtica de la cascada de fototransducció. A la membrana dels discs, després de l'absorció d'un fotó, la rodopsina fotoactivada (RHO<sup>\*</sup>) interactua amb la transducina i catalitza la unió de GTP a aquesta. La transducina unida a GTP activa una fosfodiesterasa que hidrolitza cGMP. La disminució d'aquest misstager provoca el tancament dels canals iònics i causa l'hiperpolarització de la membrana i l'alliberament del neurotransmissor a la terminal sinàptica. En l'extinció del senyal de la fototransducció hi intervien, entre d'altres, una guanilat ciclasa (GUCY2D) i les seves proteïnes activadores (GCAPs) (den Hollander et al. 2010).

## 5.2 EL METABOLISME DEL RETINOL: EL CICLE VISUAL

El retinol o vitamina A (tot-*trans*-retinol) és el substrat necessari per a la síntesi dels cromòfors dels pigments visuals. Malgrat cap de les dades apunta que CERKL pugui formar part d'aquesta categoria funcional, majoritàriament formada per enzims i proteïnes transportadores, recentment s'ha descrit la localització de la proteïna CERKL en cèl·lules de l'epiteli pigmentari (RPE) de rata (Mandal et al. 2012) on, juntament amb els segments externs dels fotoreceptors, es dona el metabolisme del retinol.

Després de l'absorció d'un fotó per part d'una opsina, el cromòfor 11-*cis*-retinal s'isomeritza a tot-*trans*-retinal, es dissocia del pigment visual i s'allibera a l'interior dels discs del segment extern. Una proteïna transportadora codificada pel gen *ABCA4* dirigeix el tot-*trans*-retinal des de la cara interna del disc al citoplasma del fotoreceptor, on es redueix a tot-*trans*-retinol per part de la deshidrogenasa 12 (*RDH12*). La proteïna d'unió a retinol (*RBP3/IRBP*) és l'encarregada d'unir aquest cromòfor i transportar-lo a l'interior de les cèl·lules de l'RPE (Figura 19). Un cop aquí, és reciclat a 11-*cis*-retinal després de patir tot un seguit de passos enzimàtics mediat per proteïnes codificades per diversos gens DR: *LRAT*, *RGR*, *RPE65*, *CRALBP/RLBP1* i *RDH5*. Finalment, l'11-*cis*-retinal és transportat al fotoreceptor, gràcies a la mateixa proteïna d'unió a retinol IRBP, i s'associa de nou amb l'opsina. Majoritàriament, els gens englobats en aquesta categoria funcional són causants de DR d'herència autosòmica recessiva (vegeu Taula 2 al final d'aquesta secció).

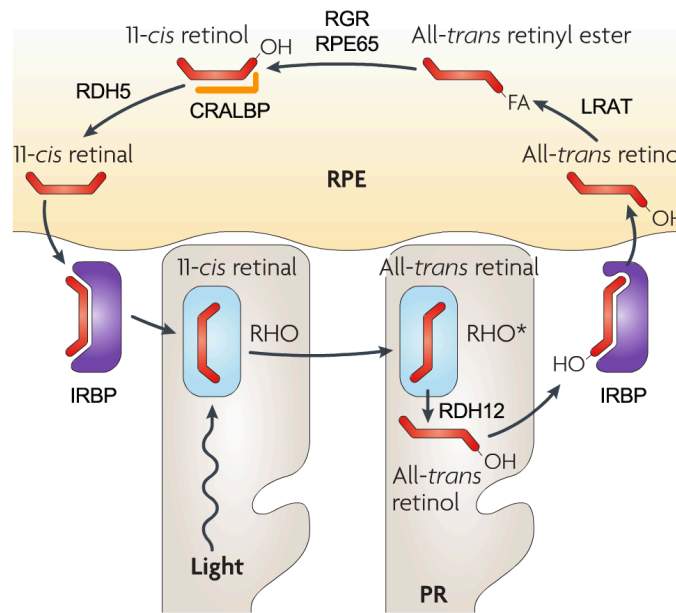


Figura 19. Esquema del metabolisme del retinol el qual té lloc al segment extern dels fotoreceptors (PR) i a les cèl·lules de l'epiteli pigmentari (RPE). Després de la fotoactivació, l'11-cis-retinal s'isomeritza a tot-trans-retinal i es dissocia de la rodopsina. El tot-trans-retinal és reciclat a l'RPE per ser convertit de nou a 11-cis-retinal. Imatge adaptada de Wright et al. 2010.

Els cons necessiten una extinció ràpida de la cascada de fototransducció ja que requereixen una adaptació dinàmica a la foscor, per així romandre funcionals en condicions d'alta intensitat lumínica. D'aquesta manera, els cromòfors de les opsines necessiten ser ràpidament reciclats de tot-trans-retinol a 11-cis-retinal, fet que evidencia l'existència d'un segon tipus de cicle visual complementari però independent de l'RPE. En aquest cas, el cromòfor és reciclat gràcies a les cèl·lules de Müller (Kefalov 2011, Wang i Kefalov 2011).

### 5.3 EL TRANSPORT CILIAR

Els fotoreceptors són neurones altament polaritzades, amb el segment intern (IS) clarament diferenciat de l'extern (OS). L'IS conté tota la maquinària de síntesi proteica, mentre que l'OS és el principal centre funcional de la cèl·lula. Les proteïnes han de ser transportades d'un compartiment a l'altre a través d'un pont cel·lular anomenat cili connectiv (CC), el qual conté un axonema de microtúbuls ancorat a un cos basal (BB) (Figura 20). Aquest mecanisme es troba altament regulat per una sèrie de macrocomplexes proteics implicats en la recepció i selecció de les proteïnes, així com del propi transport fins l'OS. Defectes en la funció d'aquests cilis poden resultar en tota una sèrie de malalties anomenades ciliopaties, on diverses distròfies de retina s'hi troben englobades.

Diverses famílies de GTPases petites i els seus reguladors s'han descrit com a membres crucials en aquest tràfic cel·lular. És el cas de *RPGR* (implicat en el 70% de casos de XL-RP), un regulador de GTPases localitzat al CC que forma part del complex proteic de transport intraflagelar (IFT), i dels seus interactors *RPGRIP1* i *IQCB1* (Gerner et al. 2010, Otto et al. 2005). Un altre cas és el de *RP2*, que codifica per una proteïna reguladora de GTPases encarregada de regular el transport de vesícules des de l'aparell de Golgi fins el BB (Evans et al. 2010). Finalment, la proteïna Tubby-like 1, *TULP1*, interactura amb una GTPasa anomenada dinamina-1 i s'ha descrit com la responsable de transportar la rodopsina de l'IS a l'OS (Hagstrom et al. 2001).

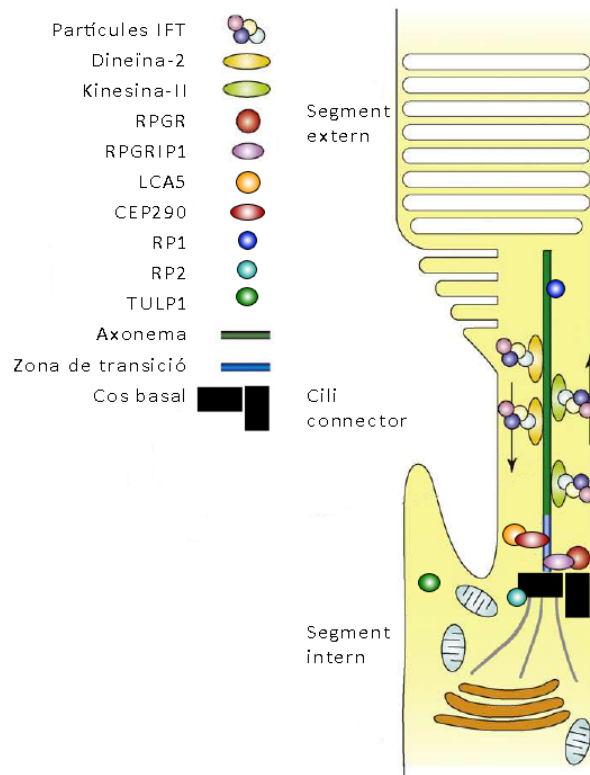


Figura 20. Esquema del transport proteic a través del cili connector, el qual està format per un axonema ancorat a un cos basal. La família de quinesines intervien en el transport, regulat per part una sèrie de proteïnes implicades en les distròfies de retina. Imatge adaptada de Smith et al. 2009.

Altres proteïnes implicades en el transport intraflagelar són les codificades pels gens *LCA5*, *ORF1*, *CEP290* i *TTC8*, importants reguladores de la ciliogènesi, i *RP1*, una proteïna associada als microtúbuls implicada en el control de la longitud i l'estabilitat de l'axonema.

Estudis recents de localització cel·lular han situat altres gens DR com a membres del transport ciliar, sent la categoria funcional que més gens agrupa: *C2ORF71*, *CC2D2A*, *FAM161A*, *MAK*, *TOPORS* i *WDR19*. De tots ells es desconeix la funció principal. L'associació de CERKL amb el reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi (Tuson et al. 2009), suggeriria una possible contribució de la proteïna en el transport proteic. Fins el

moment, però, no s'ha demostrat cap associació de CERKL amb les proteïnes responsables de DR implicades en el transport ciliar.

#### 5.4 L'ESTRUCTURA DELS FOTORECEPTORS

Els fotoreceptors són cèl·lules altament especialitzades i metabòlicament molt actives que requereixen proteïnes molt específiques per la formació i manteniment de la seva estructura. Aquest és el cas de *RDS* i *ROM1*, proteïnes transmembrana que formen heterotetràmers localitzats als discs dels fotoreceptors, i els quals s'han vist implicats en casos de RP d'herència digènica (Kajiwara et al. 1994, Dryja et al. 1997) i són imprescindibles per a la formació de l'arquitectura complexa que presenten els segments externs. En aquest mateix context, dos altres gens, *PROM1* i *FSCN2*, es veuen implicats en la morfogènesi dels nous discs, els quals són renovats constantment (Tubb et al. 2000, Yang et al. 2008). Recentment, s'ha descrit un nou gen RP, *EYS*, que abasta unes 2 Mb, sent el gen més llarg expressat a retina. La proteïna es localitza al segment extern dels fotoreceptors, però la seva funció a la retina es desconeix. No obstant, el seu homòleg a *Drosophila* juga un paper essencial en la creació de l'espai extracel·lular entre els rabdòmers, les cèl·lules fotoreceptores, i en humans, es considera essencial per la integritat del segment extern (Collin et al. 2008).

#### 5.5 LES INTERACCIONS CEL·LULARS

La retina és un teixit estratificat altament organitzat que conté diferents tipus cel·lulars interconnectats. El correcte manteniment de les connexions entre cèl·lules i la seva polaritat apical-basal és essencial per la integritat d'aquest teixit i, de fet, mutacions en 8 gens implicats en aquests mecanismes s'han associat a diverses distròfies de retina. És el cas del gen *crumbs* homòleg 1 (*CRB1*), que codifica per una proteïna transmembrana localitzada a la part subapical dels fotoreceptors, la qual participa en la formació de les unions adherents entre aquests i les cèl·lules de Müller (van de Pavert et al. 2004). L'usherina (*USH2A*) es troba localitzada preferentment a la regió periciliar de la membrana plasmàtica i és causant de formes sindròmiques i no sindròmiques de RP i CRD (Liu et al. 2007). Altres gens com *MERTK*, *C1QTNF5*, *SEMA4A* i *ADAM9*, s'expressen a les cèl·lules de l'epiteli pigmentari, amb les qui els fotoreceptors es troben altament interconnectades. *MERTK*, que és responsable de formes recessives severes de RP, s'encarrega de promoure la fagocitosi circadiana dels discs dels segments externs dels fotoreceptors (Nandrot i Dufour 2010), mentre que *C1QTNF5*, que causa degeneració macular (Taula 2), participa en l'adhesió de l'RPE a la membrana de Bruch (Tu i Palczewski 2012). Finalment, *SEMA4A* i *ADAM9* s'encarreguen de l'adhesió dels fotoreceptors amb l'RPE (Rice et al. 2004, Parry et al. 2009). Recentment, s'han associat a la distròfia de cons i bastons *CDHR1*, un gen de la família de les proteïnes dependents de calci encarregades d'adhesions cèl·lula-cèl·lula (Henderson et al. 2010), i *RIMS1*, responsable de la regulació de l'exocitosi de les vesícules sinàptiques (Sun et al. 2003).

## 5.6 LA TRANSCRIPCIÓ

La localització nuclear de CERKL, demostrada en diversos estudis amb cultius cel·lulars (Rovina et al. 2009, Tuson et al. 2009), sembla suggerir un paper regulador de l'expressió gènica en els fotoreceptors. Fins l'actualitat, s'han descrit 6 gens DR implicats en el control de l'expressió de gens específics de fotoreceptors. Els factors de transcripció *OTX2* i *CRX* són crucials per la diferenciació dels fotoreceptors durant el desenvolupament de la retina i en el seu manteniment en el teixit adult. En concret, *OTX2* participa en la sortida del cicle cel·lular de les cèl·lules multipotents de la retina i activa la transcripció de *CRX*, que al seu torn contribueix a la regulació dels precursors post-mitòtics dels fotoreceptors (Figura 21). *NRL*, *NR2E3* i *RAX2/QRX* són factors de transcripció que activen la transcripció de gens específics dels bastons (Wang et al. 2004, Oh et al. 2008), entre ells la rodopsina. Les cèl·lules que expressen *CRX* però no *NRL* i *NR2E3* esdevenen precursors de cons, en les quals s'activarà l'expressió de gens importants per a la formació dels cons madurs (Oh et al. 2007). Finalment, s'ha identificat *ZNF513* com un presumpte factor de transcripció implicat en la regulació de diversos gens crucials pel funcionament dels fotoreceptors, entre ells les opsines (Li et al. 2010).

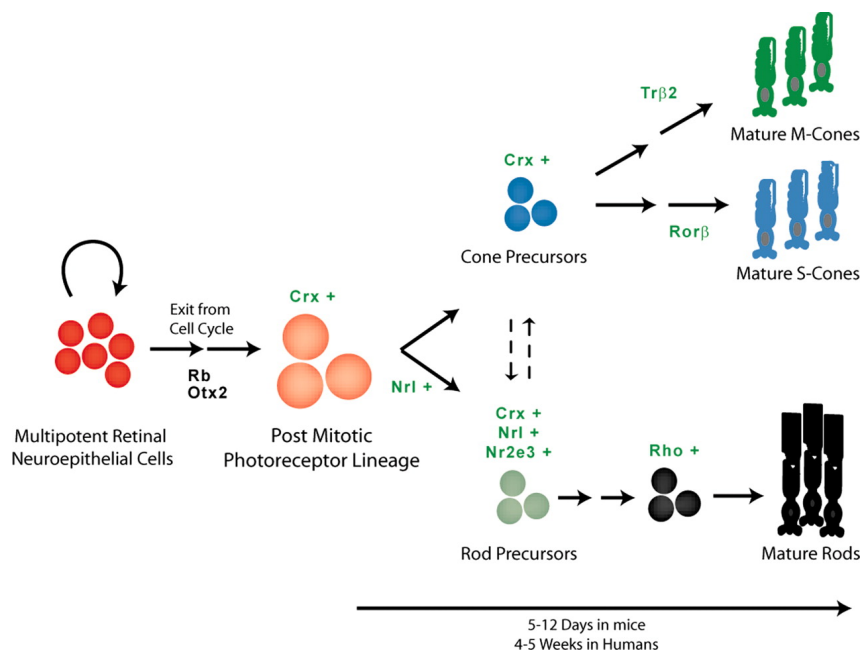


Figura 21. Esquema dels passos proposats per la determinació cel·lular dels fotoreceptors i d'alguns dels principals factors de transcripció que hi intervenen. L'expressió de *OTX2* i *RB* està relacionada amb la sortida del cicle cel·lular de les cèl·lules neuroepitelials multipotents. *CRX* està implicat en la regulació de l'expressió gènica dels precursors dels fotoreceptors post-mitòtics. Les cèl·lules que expressen *NRL* esdevenen bastons, amb la subseqüent expressió de *NR2E3*. Les cèl·lules que només expressen *CRX* esdevenen precursors de cons. Imatge extreta de Oh et al. 2007.

## 5.7 EL PROCESSAMENT DEL mRNA

El processament del mRNA consisteix en l'eliminació de les seqüències intròniques del pre-mRNA per tal de donar lloc al mRNA madur. Aquest mecanisme es duu a terme a l'*spliceosome*, un gran complex ribonucleoproteic (RNP) format per 5 RNA nuclears petits (snRNA) anomenats U1, U2, U4, U5 i U6; conjuntament amb un gran nombre de factors proteics. Inicialment, aquest processat consisteix en la unió de U1 al pre-mRNA; a continuació, s'hi uneix U2; i, finalment, s'hi associa U4/U6:U5 tri-snRNP per tal de formar l'*spliceosome* complet (Wahl et al. 2009). En total s'han identificat fins el present 6 gens DR implicats en el processament del mRNA que codifiquen per proteïnes essencials per la formació del complex d'*splicing*: ***PRPF31***, ***PRPF8***, ***PRPF6***, ***PRPF3***, ***PAP1/RP9*** i ***SNRNP200***. Totes elles són necessàries per l'associació del dúplex U4/U6 i per la posterior formació del complex U4/U6:U5 tri-snRNP (Maita et al. 2005, Mordes et al. 2006, Zhao et al. 2009). Es desconeix com mutacions en aquests factors, els quals s'expressen de manera ubiqüa en tot l'organisme contribuint en una funció tan essencial com l'*splicing*, són responsables de malalties que afecten únicament la retina. Diverses estudis afirmen que la retina conté el nombre més elevat de transcrits processats de tot l'organisme que es deu, en part, a l'activitat dels gens de la família dels PRPFs (Fagnani et al. 2007, Tanackovic et al. 2011). De fet, que tots aquests gens siguin causants de RP d'herència autosòmica dominant (Taula 2) demostra la importància del processament del mRNA en la funció i supervivència dels fotoreceptors. En l'abordatge etiològic de la RP, diversos autors han proposat l'haploinsuficiència, i no la dominància negativa, com la causa molecular de la malaltia provocada pels gens que afecten el processament del mRNA. Diferents estudis en cultius cel·lulars han revelat una reducció en l'expressió dels al·lels patogènics; generalment mutacions nul·les que provoquen la degradació dels transcrits mitjançant el mecanisme de NMD (Abu-Safieh et al. 2006, Rio Frio et al. 2008).

## 5.8 ELS ALTRES GENS DE DISTRÒFIES DE RETINA

En aquest apartat s'hi engloben els gens DR la funció dels quals no encaixa en cap de les categories clàssiques esmentades anteriorment, entre ells tota una sèrie de gens implicats en activitats enzimàtiques diverses del metabolisme dels fotoreceptors, com són ***CA4*** (anhidrasa carbònica), ***DHDDS*** (dedol-PP sintetasa), ***IDH3B*** (isocitrat deshidrogenasa), ***IMPDH1*** (inosina monofosfat deshidrogenasa) i ***NMNAT1*** (nicotinamida-nucleòtid adenililtransferasa). Un altre tipus són els que codifiquen per unitats de canals iònics, ***BEST1***, ***CACNA1F***, ***CACNA2D4***, ***KCNJ13***, ***KCNV2*** i ***TRPM1***, o en són reguladors, ***CABP4***. També existeixen 3 gens DR implicats en el metabolisme dels lípids: ***ELOVL4***, una elongasa d'àcids grassos, ***PITPNM3***, un transportador de fosfolípids, i ***TTPA***, un regulador del transport de la vitamina E fonamental per la peroxidació dels lípids. Per últim, s'han descrit dos gens DR implicats en el plegament i degradació de proteïnes, ***AIPL1***, una xaperona, i ***KLHL7***, un membre del complex E3-ubiquitina lligasa.

Finalment, els gens orfes de funció tanquen aquesta classificació: ***C8ORF37***, ***CERKL***, ***CLRN1***, ***GPR179***, ***HRG4***, ***IMPG2***, ***LRR13***, ***PRCD***, ***RD3***, ***RHBDD2*** i ***SPATA7***. Es tracta de gens que sovint presenten homologies amb altres proteïnes, però que el seu paper en la degeneració dels fotoreceptors és totalment desconegut.

## Introducció

Taula 2. Classificació funcional dels 92 gens implicats en les distròfies de retina. S'indica el tipus de distròfia i l'herència.

Funció	Gen	Proteïna	CD	CRD	CSNB	LCA	MD	RP
Transport ciliar	C2ORF71	Chromosome 2 open reading frame 71						
	CC2D2A	Coiled-coil and C2 containing 2A protein						
	CEP290	Centrosomal protein 290 kDa						
	FAM161A	Family with sequence similarity 161 member A						
	IQCB1	IQ motif containing B1 protein						
	MAK	Male germ-cell associated kinase						
	LCA5	Lebercilin						
	OFD1	Oral-facial-digital syndrome 1 protein						XL
	RP1	RP1 protein						
	RP2	GTPase activating protein for ARL3						XL
	RPGR	Retinitis pigmentosa GTPase regulator	XL				XL	XL
	RPGRIP1	RPGR interacting protein						
	TOPORS	Topoisomerase I binding arginine/serine rich protein						
	TTC8	Tetratricopeptide repeat domain 8						
	TULP1	Tubby-like protein 1						
WDR19	WD repeat domain 19 protein							
Fototransducció	CNGA1	Rod cGMP-gated cation channel alpha subunit						
	CNGB1	Rod cGMP-gated cation channel beta subunit						
	CNGB3	Cone cyclic nucleotide-gated channel beta 3 subunit						
	GNAT1	Rod transducin alpha subunit						
	GRK1	Rhodopsin kinase						
	GRM6	Metabotropic glutamate receptor 6						
	GCAP1	Guanylate cyclase activador 1A						
	GCAP2	Guanylate cyclase activating protein 1B						
	GUCY2D	Guanylate cyclase 2D						
	PDE6A	cGMP phosphodiesterase alpha subunit						
	PDE6B	rod cGMP phosphodiesterase beta subunit						
	PDE6C	cGMP-specific cone phosphodiesterase alpha prime protein						
	PDE6G	cGMP-specific cone phosphodiesterase 6H gamma subunit						
	RHO	Rhodopsin						
	SAG	Arrestin						
Metabolisme del retinol	ABCA4	ATP-binding cassette protein A4						
	LRAT	Lecithin retinol acetyltransferase						
	RBP3/IRBP	Retinol binding protein 3, intersticial						
	RDH12	Retinol dehydrogenase 12						
	RDH5	11- <i>cis</i> retinol dehydrogenase 5						
	RGR	RPE-retinal G protein-coupled receptor						
	RLBP1	Retinaldehyde binding protein 1						
	RPE65	Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein						
Canals iònics i els seus reguladors	BEST1	Bestrophin 1						
	CABP4	Calcium binding protein 4						
	CACNA1F	L-type calcium channel, voltage-dependent, alpha-1F subunit		XL	XL			
	CACNA2D4	L-type calcium channel, voltage-dependent, alpha-2/delta subunit 4						
	KCNJ13	Potassium channel subfamily J member 13						
	KCNV2	Potassium channel subfamily V member 2						
TRPM1	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1							

Funció	Gen	Proteïna	CD	CRD	CSNB	LCA	MD	RP
Estructura	EYS	Eyes shut/spacemaker homolog						
	FSCN2	Retinal fascin homolog 2						
	PROM1	Prominin 1						
	RDS	Peripherin 2						
	ROM1	Retinal outer segment membrane protein 1						
Metabolisme intermediari	CA4	Carbonic anhydrase IV						
	DHDDS	Dehydrololichyl diphosphate synthase						
	IDH3B	NAD(+)-specific isocitrate dehydrogenase 3 beta						
	IMPDH1	Inosine monophosphate dehydrogenase 1						
	NMNAT1	Nicotinamide nucleotide adenyltransferase 1						
Transcripció	CRX	Cone-rod homeobox						
	NR2E3	Nuclear receptor subfamily 2 group E3						
	NRL	Neural retina lucine zipper						
	OTX2	Orthodenticle homeobox 2 protein						
	RAX2	Retina and anterior neural fold homeobox 2						
	ZNF513	Zinc finger protein 513						
Interaccions cel·lulars	ADAM9	ADAM metallopeptidase domain 9 protein						
	C1QTNF5	C1q and tumor necrosis-related protein 5 collagen						
	CDHR1	Cadherin-related family member 1						
	CRB1	Crumbs homologue 1						
	MERTK	C-mer protooncogen receptor tyrosine kinase						
	RIMS1	Regulating synaptic membrane exocytosis 1						
	SEMA4A	Semaphorin 4A						
	USH2A	Usherin						
Processament del mRNA	PAP1/RP9	PIM1-kinase associated protein 1						
	PRPF3	Human homolg of yeast pre-mRNA splicing factor 3						
	PRPF6	Human homolg of yeast pre-mRNA splicing factor 6						
	PRPF8	Human homolg of yeast pre-mRNA splicing factor 8						
	PRPF31	Human homolg of yeast pre-mRNA splicing factor 31						
	SNRNP200	Small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa						
Degradació	AIPL1	Aryl dyrocarbon receptor protein-like 1						
	KLHL7	Kelch-like 7 protein						
M. dels lípids	ELOVL4	Elongation of very long chain fatty acids						
	PITPNM3	Phosphatidylinositol transfer membrane-associated family member 3						
	TTPA	Alpha-tocopherol-transfer protein						
Funció desconeguda	C8ORF37	Chromosome 8 open reading frame 37						
	CERKL	Ceramide kinase-like protein						
	CLRN1	Clarin-1						
	GPR179	G protein-coupled receptor 179						
	HRG4	Human retinal gene 4						
	IMPG2	Interphotoreceptor matrix proteoglycan 2						
	LRIT3	Leucine-rich repeat immunoglobulin-like transmembrane domains protein 3						
	PRCD	Progressive rod-cone degeneration protein						
	RD3	Retinal degeneration 3						
	RHBDD2	Rhomboïd domain containing 2						
	SPATA7	Spermatogenesis associated protein 7						

## 6. MODELS ANIMALS EN L'ESTUDI DE LES DR

A part de l'humà, les distròfies de retina afecten altres espècies animals. Actualment disposem de mutacions naturals i mutants transgènics de diverses espècies que han esdevingut eines molt valuoses tant per a l'estudi de la patogènesi com pel desenvolupament de teràpies. Durant moltes dècades, una gran part de la recerca en les DR s'ha basat en l'estudi de models animals que, en alguns casos, han resultat mimetitzar la patologia humana, no només genèticament sinó també fenotípicament.

Entre models naturals i manipulats genèticament, existeixen més d'un centenar d'animals disponibles per a l'estudi de prop del 65% de gens causants de distròfies de retina. Bàsicament, es tracta de models manipulats genèticament on el ratolí és, amb diferència, el model més utilitzat (Figura 22). Aquests rosegadors presenten una sèrie d'avantatges respecte la resta de mamífers: el seu temps generacional és molt curt, són molt prolífics i s'adapten fàcilment a la vida en els estabularis, fet que permet controlar les variabilitats ambientals durant l'experimentació. El seu genoma està molt ben establert; presenta més d'un 90% d'homologia amb l'humà. A més, existeixen sistemes molt eficients de cultiu de cèl·lules embrionàries pluripotents (cèl·lules ES) que permeten una fàcil manipulació genètica per a la generació de transgènics (Rivas i Vecino 2009). No obstant, darrerament, el peix zebra ha esdevingut un model molt emprat en la generació de *knockdowns* per a l'estudi de les distròfies visuals. Els principals tipus cel·lulars i l'estructura de l'ull es troben altament conservats amb l'humà i, a més, la transparència de l'embrió i el seu ràpid desenvolupament permeten l'observació a temps real de l'evolució de la patologia (Lieschke et al. 2007).

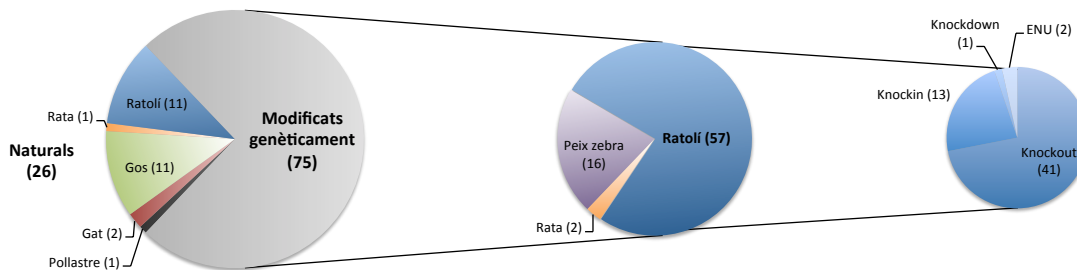


Figura 22. Classificació dels models animals disponibles per a l'estudi de les distròfies de retina segons el mètode d'obtenció del model i l'espècie animal. De dreta a esquerra, en el primer diagrama es categoritzen els models en "Naturals", indicant el tipus d'animal, o "Modificats genèticament". En el segon, s'especifica l'espècie dels animals modificats genèticament. Finalment, en el tercer diagrama s'indica el tipus de tècnica usada per l'obtenció dels ratolins transgènics. A grans trets, s'observa com la major part de models disponibles per a l'estudi de les DR són principalment ratolins transgènics *knockout*. Entre parèntesi, s'indica el nombre de models en cada cas.

A la Taula 3 (pàgina 42) es recullen els diferent models animals, naturals i induïts, disponibles actualment per a l'estudi de les distròfies de retina.

## 6.1 MODELS ANIMALS NATURALS

Actualment, existeixen més d'una vintena de models, sobretot gossos i ratolins, que presenten degeneració retinal deguda a mutacions naturals. A més, periòdicament, se'n reporten de nous per part del *The Jackson Laboratory*. La importància d'aquests models rau en diversos aspectes; en primer lloc, han suposat una gran font de gens candidats ja que malgrat en un primer terme la cerca de la mutació en els animals afectes pot ser una tasca llarga i laboriosa, un cop identificada pot ser ràpidament testada en humans, sovint amb resultats positius. A més, aquests models permeten l'estudi, d'una banda, dels mecanismes pels quals es desencadena la degeneració de la retina i, de l'altra, de l'efecte concret de la mutació en la biologia cel·lular del fotoreceptor. Finalment, també permeten l'experimentació de teràpies pel tractament i prevenció d'aquestes distròfies (Chader 2002).

### 6.1.1 Models murins naturals

Als anys 20 Keeler va descriure el primer mamífer DR, un ratolí que presentava una degeneració ràpida i severa dels bastons amb només una petita illa de cèl·lules funcionals al centre de la retina a P21 (Keeler 1924). Aquest ratolí, anomenat *rodless* (*r*) va ser descrit posteriorment per Brückner com a *retinal degeneration* (*rd*) (Brückner 1951), però no va ser fins als anys 90 quan es va identificar la causa d'aquest fenotip: una mutació sense sentit (Y347X) al gen de la subunitat  $\beta$  de la fosfodiesterasa dels bastons (*Pde6b*) (Bowes et al. 1990). Des d'aleshores, aquest model anomenat finalment ***rd1*** ha esdevingut un dels més utilitzats per a l'estudi de la RP d'herència autosòmica recessiva. Existeix un altre model murí, ***rd10***, amb una mutació en aquest mateix gen (R560C). En aquest cas la degeneració dels fotoreceptors és més lenta i tardana, esdevenint un millor model a l'hora d'aplicar teràpies experimentals (Chang et al. 2007).

A finals dels 70s es va descriure el model ***rds*** o ***rd2***, anomenat *retinal degeneration slow* per presentar una degeneració retinal més lenta que en el cas del ratolí *rd* (***rd1***) (Sanyal et al. 1980). Aquest animal era portador d'una mutació nul·la al gen de la periferina (*Prph2/Rds*) i mancava de segments externs en els seus fotoreceptors. En els últims anys, s'han esmerçat molts esforços a rescatar la funció d'aquest *knockout* natural i, de fet, injeccions subretinals d'AAV recombinants que expressen Rds han permès la correcta generació d'OS en aquests animals (Ali et al. 2000, Sarra et al. 2001).

En total, existeix més d'una desena de models murins naturals afectes de DR ja que als models esmentats anteriorment se l'hi sumen els identificats en els últims anys pels gens *Rd3* (***rd3***), *Nr2e3* (***rd7***), *Crb1* (***rd8***), *Rpgr* (***rd9***), *Rpe65* (***rd12***), *Cep290* (***rd16***), *Cacna2d4* (***c.2367insC***) i *Pde6c* (***cpfl1***) (Taula 3).

## Introducció

Taula 3. Models animals naturals i manipulats genèticament en l'estudi de les distròfies de retina. Per cada gen, s'indiquen l'herència, l'espècie animal, el tret més característic del fenotip i els autors.

Gen	Model animal	Fenotip	Referència
ABCA4 <sup>f</sup>	Ratolí, KO	Retard en l'adaptació a la foscor. Augment de tot- <i>trans</i> -retinal. Acumulació de lipofuscina.	Weng et al. 1999
ADAM9 <sup>f</sup>	Ratolí, KO	Cap fenotip aparent.	Weskamp et al. 2002
AIPL1 <sup>d,r</sup>	Ratolí, KO	Degeneració ràpida amb gliosi massiva de les cèl·lules de Müller.	Dyer et al. 2004
	Ratolí, KD	Reducció dels nivells de PDE. Retard en la recuperació després de flaixos de llum.	Liu et al. 2004
BEST1 <sup>d</sup>	Ratolí, KI	Cap fenotip aparent.	Iacovelli et al. 2011
C2ORF71 <sup>f</sup>	Gos, N	Degeneració progressiva i lenta	Downs et al. 2012
	Peix zebra, KD	Reducció de la mida de l'ull. Escurçament dels OS dels fotoreceptors. Defectes en la visió.	Nishimura et al. 2010
CA4 <sup>d</sup>	Ratolí, KO	No s'han realitzat estudis morfològics a la retina.	Shah et al. 2005
CACNA2D4 <sup>f</sup>	Ratolí, c.2367insC, N	Pèrdua de bastons mentre els cons romanen intactes fins les 6 setmanes.	Wycisk et al. 2006
CC2D2A <sup>f</sup>	Peix zebra, KO	Escurçament dels OS. Deslocalització de les opsines i acumulació de vesícules al CC.	Bachmann-Gagescu et al. 2011
	Ratolí, rd16, N	A P18 els ERGs mostren disfuncions dels fotoreceptors. Degeneració de l'OS. ONL més prima.	Chang et al. 2006
CEP290 <sup>f</sup>	Gat, rdAc, N	Als 5-8 mesos els ROS són anormals, després degeneren els cons. Ceguesa total als 4 anys.	Narfstrom et al. 2009
	Peix zebra, KD	Defectes visuals. Cos corbat, vesícula de Kupffer reduïda, retards en el transport de melanosomes.	Baye et al. 2011
CERKL <sup>f</sup>	Ratolí, KO	Cap fenotip aparent.	Graf et al. 2008
CNGB1 <sup>f</sup>	Ratolí, KO	ERGs sense resposta per bastons. En un segon estadi, degeneren també els cons.	Huttel et al. 2005
CNGB3 <sup>f</sup>	Ratolí, KO	Densitat de cons reduïda amb els OS desorganitzats. Increment d'apoptosi.	Ding et al. 2009
	Gos, N	Absència de la funció dels cons. Acromatòpsia. Ceguesa diürna.	Sidjanin et al. 2002
CRB1 <sup>f</sup>	Ratolí, KO	Als 3-9 mesos la integritat de les membranes dels fotoreceptors es troba alterada.	van de Pavert et al. 2004
	Ratolí, KI	C249W. La proteïna es localitza normalment. Membrana externa dels fotoreceptors anormal.	van de Pavert et al. 2007
	Ratolí, rd8, N	La degeneració s'inicia al mes i culmina a l'any. ERGs alterats a les 16 setmanes.	Mehalow et al. 2003
CRX <sup>d</sup>	Ratolí, KO	Fotoreceptors sense OS. ERGs sense resposta per cons i bastons.	Furukawa et al. 1999
	Gat, Rdy, N	Pèrdua completa de fotoreceptors a les 17 setmanes.	Curtis et al. 1987
	Peix zebra, KD	Mida de l'ull i cervell reduïda. Increment d'apoptosi. Defectes en la laminació de la retina.	Shen i Raymond 2004
DHDDS <sup>f</sup>	Peix zebra, KD	OS molt curts o inexistents. Reducció de la mida de l'ull.	Züchner et al. 2011
FSCN2 <sup>d</sup>	Ratolí, KI	208delG. Degeneració deguda a problemes en el manteniment/elongació dels OS.	Yokokura et al. 2005
GCAP1 <sup>d</sup>	Ratolí, KO	Retina normal. Fotoreceptors més sensibles al calci.	Markino et al. 2012
	Ratolí, KI	E155G. Retina normal a 3 mesos. Acumulació de cGMP. Pèrdua progressiva de cons.	Buch et al. 2011
GCAP2 <sup>d</sup>	Ratolí, KO	Retina normal. Bastons més sensibles als flaixos de llum, retard en la recuperació.	Markino et al. 2008
GUCY2D <sup>d</sup>	Ratolí, KO	Pèrdua de la funció dels cons a les 5 setmanes. Anomalies funcionals dels bastons.	Yang et al. 1999
	Pollastre, rd, N	Degeneració a partir dels 7 dies, des del centre cap a la perifèria de la retina.	Ulshafer et al. 1984
IMPDH1 <sup>d</sup>	Ratolí, KO	Degeneració lenta i progressiva amb els PhR intactes als 12 mesos.	Aherne et al. 2004
IQCB1 <sup>f</sup>	Peix zebra, KD	Defectes en el desenvolupament de l'ull.	Schafer et al. 2008
LCA5 <sup>f</sup>	Ratolí, KO	Degeneració ràpida i primerenca de la retina.	Boldt et al. 2011
LRAT <sup>f</sup>	Ratolí, KO	Pèrdua de cons. El doble KO <i>Gnat1/Lrat</i> no té resposta de cons als ERGs.	Maeda et al. 2009
MAK <sup>f</sup>	Ratolí, KO	Desenvolupament normal. Degeneració ràpida i progressiva de la retina.	Omori et al. 2010
MERTK <sup>f</sup>	Ratolí, KO	Ràpida degeneració dels fotoreceptors. Resposta escotòpica baixa als ERGs.	Camenisch et al. 1999
	Rata, RCS, N	Pèrdua completa de l'ONL als 70 dies. Respostes reduïdes als ERGs.	Strauss et al. 1998
NR2E3 <sup>d,r</sup>	Ratolí, KO	Producció anormal de cons. Pèrdua de nuclis a l'ONL.	Webber et al. 2008
	Ratolí, rd7, N	Degeneració lenta i progressiva. Producció anormal de cons.	Akhmedov et al. 2000
NRL <sup>d,r</sup>	Ratolí, KO	Pèrdua completa dels bastons. Funció dels cons normals.	Mears et al. 2001
OFD1 <sup>x</sup>	Ratolí, KO	Cap fenotip aparent.	Ferrante et al. 2006
	Peix zebra, KD	Fusió incompleta de la coroides.	Ferrante et al. 2009
PDE6A <sup>f</sup>	Ratolí, ENU	Degeneració ràpida dels fotoreceptors. Activitat PDE minvada. Variabilitat fenotípica elevada.	Sakamoto et al. 2008
	Gos, rcd3, N	Atròfia retinal progressiva.	Petersen-Jones et al. 1999
PDE6B <sup>f</sup>	Ratolí, rd1, N	Degeneració ràpida i severa que s'inicia a P10. Pèrdua de bastons.	Pittler i Baehr 1991
	Ratolí, rd10, N	Respostes de la funció dels fotoreceptors indetectables als 2 mesos als ERGs.	Chang et al. 2007
PDE6C <sup>f</sup>	Gos, rcd1, N	ERGs alterats a les 16 setmanes.	Schmidt, 1985
	Ratolí, cpfl1, N	L348fsX362. Degeneració ràpida dels cons amb pèrdua de funció. Acromatòpsia.	Chang et al. 2009
PDE6G <sup>f</sup>	Ratolí, KO	Dímer PDE- $\alpha/\beta$ sense activitat catalítica. Degeneració ràpida.	Tsang et al. 1996
	Ratolí, KI	W70A. Nictalopia estacionària.	Salchow et al. 1999

Gen	Model animal	Fenotip	Referència
PRCD <sup>f</sup>	Gos, N	Degeneració lenta i progressiva. Anormalitats en la renovació dels discs dels OS.	Aguirre et al. 1982
PRPF3 <sup>d</sup>	Ratolí, KO	<i>Prpf3</i> <sup>-/-</sup> mort abans dels 14 dpf. <i>Prpf3</i> <sup>+/-</sup> sense fenotip aparent.	Graziotto et al. 2008
	Ratolí, KI	T494M. Depòsits amorfs entre RPE i membrana de Bruch. Funció dels bastons alterada.	Graziotto et al. 2011
	Peix zebra, KO	Cap fenotip aparent.	Graziotto et al. 2008
PRPF8 <sup>d</sup>	Ratolí, KI	H2309P. Depòsits amorfs entre RPE i membrana de Bruch. Funció dels bastons alterada.	Graziotto et al. 2011
	Ratolí, KO	Depòsits amorfs entre RPE i membrana de Bruch. Funció dels bastons alterada.	Graziotto et al. 2011
PRPF31 <sup>d</sup>	Ratolí, KI	A216P. Cap fenotip aparent en els heterozigots. <i>Prpf31</i> <sup>-/-</sup> són letals embrionaris.	Bujakowska et al. 2009
	Peix zebra, KD	Dosis baixes de MO comporten reduccions del nistagme optocinètic, dosis altes desencadenen malformacions severes amb increment de letals embrionaris.	Linder et al. 2010
PROM1 <sup>d,r</sup>	Ratolí, KO	Defectes en la formació dels discs, morfogènesi dels OS i correcta localització dels pigments visuals. Anomalies en la fototransducció.	Zacchigna et al. 2009
RB3/IRBP <sup>f</sup>	Ratolí, KO	Disminució del número de nuclis de l'ONL. Resposta fotòpica en els ERGs minvada.	Liou et al. 1998
RD3 <sup>d</sup>	Ratolí, rd3, N	A les 3 setmanes s'observa degeneració retinal.	Friedman et al. 2006
	Gos, rcd2, N	OS dels fotoreceptors són inexistent. Als 16 dies la resposta en els ERGs es troba alterada.	Kukekova et al. 2009
RDH12 <sup>d,r</sup>	Ratolí, KO	Cap fenotip aparent.	Kurth et al. 2007
RDH5 <sup>f</sup>	Ratolí, KO	Acumulació de <i>cis</i> -retinoids a l'RPE. Degeneració lenta dels fotoreceptors.	Jang et al. 2001
RDS <sup>d</sup>	Ratolí, KI	R172W. Estructura de cons i bastons anormal. Pèrdua de funció dels cons.	Ding et al. 2004
	Ratolí, rd2, N	Degeneració lenta a partir de les 3 setmanes. L'ONL pràcticament desapareix als 12 mesos.	Travis et al. 1989
RGR <sup>f</sup>	Ratolí, KO	Cap fenotip aparent. Disminució de la concentració de RHO i isòmers retinals.	Chen et al. 2001
	Ratolí, KO	Morfologia anormal dels bastons. Absència de bastons funcionals.	Humphries et al. 1997
	Ratolí, KI	P23H. Longitud dels OS dels bastons reduïda. Mort progressiva dels fotoreceptors.	Naash et al. 1993
	Ratolí, KI	P347S. Pèrdua progressiva de nuclis de l'ONL. ERGs alterats.	Li et al. 1996
RHO <sup>d,r</sup>	Ratolí, KI	Q344X. Deslocalització de la RHO. Anomalies en la fototransducció.	Sung et al. 1994
	Rata, KI	P23H. Respostes anormals dels bastons en els ERGs a les 4 setmanes.	Machida et al. 2000
	Rata, KI	S334X. Degeneració a partir de P15. Aprimament de l'ONL.	Green et al. 2000
	Gos, N	Als 13 mesos les respostes en els ERGs són anormals.	Kijas et al. 2002
RLBP1 <sup>r</sup>	Ratolí, KO	Sense evidències de degeneració. Retard en la recuperació post- fotoactivació.	Saari et al. 2001
ROM1 <sup>d</sup>	Ratolí, KO	Discs dels fotoreceptors altament desorganitzats. Apoptosi dels bastons.	Clarke et al. 2000
RP1 <sup>d,r</sup>	Ratolí, KO	Retina alterada a partir de P7. Via senyalització JNK compromesa.	Liu et al. 2005
RP2 <sup>x</sup>	Peix zebra, KD	Defectes en la laminació de la retina, absència d'OS i mida de l'ull reduïda.	Shu et al. 2011
	Ratolí, KO	Els cons degeneren molt ràpid. A les 4 setmanes ERGs anormals.	Rohrer et al. 2003
RPE65 <sup>r</sup>	Ratolí, KI	Anomalies en el metabolisme de la RHO i en la morfologia dels fotoreceptors.	Samardzija et al. 2008
	Ratolí, rd12, N	Canvis estructurals a la retina amb resposta en els ERGs disminuïda.	Pang et al. 2005
	Gos, N	A les 5 setmanes els OS dels bastons són anormals.	Veske et al. 1999
	Ratolí, KO	Degeneració de cons i bastons. Localització ectòpica de la RHO en el soma i la sinapsi.	Hong et al. 2000
RPGR <sup>x</sup>	Ratolí, rd9, N	Desenvolupament normal. Degeneració lenta.	Thompson et al. 2012
	Gos, XLPRA1, N	Als 11 mesos es detecta degeneració de bastons, després de cons.	Zeiss et al. 1999
	Gos, XLPRA2, N	Anormalitats als ERGs evidents a les 5 setmanes.	Zhang et al. 2002
	Peix zebra, KD	Defectes en la laminació de la retina, absència d'OS i mida de l'ull reduïda.	Shu et al. 2010
	Ratolí, KO	ONL més prima. OS desorganitzats. Nuclis picnòtics. Deslocalització de les opsines.	Zhao et al. 2003
RPGRIP1 <sup>r</sup>	Ratolí, ENU	Inexistència dels OS dels fotoreceptors. Degeneració primerenca i severa.	Won et al. 2009
	Gos, N	ROS irregulars i desorganitzats. L'ONL és més prima. Respostes reduïdes en els ERGs.	Curtis i Barnett, 1993
	Peix zebra, KD	Ulls petits. Hidrocefàlia. Curvatura de l'eix del cos.	Gerner et al. 2010
SAG <sup>f</sup>	Ratolí, KO	Desorganització dels OS dels bastons. ERGs anormals pels bastons.	Xu et al. 1997
SEMA4A <sup>d</sup>	Ratolí, KO	Cap fenotip aparent.	Kumanogoh et al. 2005
TOPORS <sup>d</sup>	Ratolí, KO	No s'han realitzat estudis morfològics a la retina.	Marshall et al. 2010
	Peix zebra, KD	Defectes en la laminació de la retina, absència d'OS i mida de l'ull reduïda.	Chakarova et al. 2011
TTC8 <sup>f</sup>	Ratolí, KO	Degeneració dels fotoreceptors.	Tadenev et al. 2011
	Peix zebra, KD	Reducció de la mida dels ulls i cap. Despigmentació.	Tobin et al. 2008
TULP1 <sup>f</sup>	Ratolí, KO	Degeneració retinal primerenca amb mort ràpida dels fotoreceptors.	Ikeda et al. 2000
USH2A <sup>d</sup>	Ratolí, KO	Degeneració dels fotoreceptors progressiva, acompanyada de sordesa.	Liu et al. 2007
	Peix zebra, KD	Fotoreceptors anormals i apoptòtics.	Ebermann et al. 2010
ZNF513 <sup>f</sup>	Peix zebra, KD	Reducció de la mida de l'ull. Retina laminada però absent d'OS.	Li et al. 2010

*d: autosòmic dominant; r: autosòmic recessiu; X: lligat a l'X; KO: knockout; KI: knockin; KD: knockdown; N: natural; ENU: induït amb N-etil-Nitrosurea*

### 6.1.2 Altres models naturals

Les distròfies de retina s'han identificat en altres espècies a part dels ratolins. És el cas dels canins, on Aguirre i els seus col·laboradors n'han caracteritzat més de 10 models (Chader 2002). En la majoria de casos els gens afectats també s'han identificat com a causants de DR en humans. Els gossos ofereixen una avantatge respecte els ratolins; els seus ulls són de mida semblant a la dels humans i això permet utilitzar els mateixos equipaments per l'observació oftalmològica (Tao et al. 2002). En gossos s'han identificat mutacions patogèniques en les subunitats  $\alpha$  i  $\beta$  de la fosfodiesterasa de bastons (*PDE6A* i *PDE6B*) i en *C2ORF71*, *RPGR*, *RPGRIP1* i *RHO*, entre d'altres.

En gats, només s'han descrit dues formes de distròfies de retina: un model autosòmic recessiu de degeneració de bastons i cons (rdAc), degut a una mutació al gen *Cep290* (Menotti-Raymond et al. 2007); i un autosòmic dominant d'aparició primerenca (Rdy) causat per la deleció d'un nucleòtid al gen *Crx* (Menotti-Raymond et al. 2010). Els globus oculars dels gats són fisiològica i anatòmicament semblants als dels humans i, a més, experimenten menys inflamació intraocular que els gossos després d'una cirurgia, esdevenint un bon model d'experimentació en teràpia gènica i transplantaments (Chader et al. 2002).

També s'han descrit casos de models naturals de DR en pollastre, els quals presenten una retina amb una proporció de cons semblant a l'humana (Semple-Rowland i Lee 2000); i en rata, la qual té un temps generacional curt i és tan prolífica com el ratolí, però presenta una avantatge respecte aquest, els seus ulls són força més grans i simplifica les manipulacions quirúrgiques i les avaluacions electroretinogràfiques.

## 6.2 MODELS ANIMALS MANIPULATS GENÈTICAMENT

Els models naturals són de gran utilitat però són limitats. Per aquesta raó, en els últims anys i gràcies a les noves tècniques d'enginyeria genètica, ha incrementat de manera notòria el nombre d'animals transgènics per a l'estudi de les DR. Es tracta sobretot de ratolins ens els quals o bé s'ha produït la disrupció de gens candidats, o bé s'han introduït mutacions específiques descrites en humans (Hafezi et al. 2000).

Un cop identificades les primeres mutacions DR, de seguida es van produir intents per tal de generar animals transgènics portadors d'aquestes. L'any 1992 es va descriure el primer ratolí transgènic, el mutant P23H del gen de la rodopsina creat per Olsson (Olsson et al. 1992). Actualment, existeixen més d'una cinquantena de ratolins transgènics per a l'estudi de les DR, la majoria d'ells *knockout* (75%), alguns *knockin* (23%) i un únic model *knockdown* (Figura 20, Taula 3).

### 6.2.1 Model murí de *Cerkl*

L'any 2008, Graf i col·laboradors van publicar un model murí deficient pel gen *Cerkl* en el qual s'havia deletat l'exó 5 -on s'havia descrit anteriorment la primera mutació en humans (R257X)- que codifica per una part del domini DAGK i pel domini d'unió a ATP (Graf et al. 2008). D'aquesta manera, la

possible funció de Cerkl com a ceramida quinasa específica de retina es veuria compromesa i els autors hipotetitzaven que el model murí podria presentar un augment de Cer a la retina, comportant l'apoptosi dels fotoreceptors i el desenvolupament de la RP.

Els animals *Cerkl*<sup>-/-</sup> van resultar ser totalment viables i fèrtils, sense cap afectació òbvia a la retina, la qual es trobava totalment formada i laminada. A més, els estudis lipídòmics de les retines d'aquests mutants no van revelar cap diferència en els nivells de Cer i C1P respecte els animals salvatges, de manera contrària als resultats obtinguts en les retines del model *Cerk*<sup>-/-</sup>. Aquests resultats argumentaven, una vegada més, en contra de la funció de CERKL com a quinasa. L'any 2008, quan es va generar aquest model, només es coneixia una isoforma de *Cerkl* murina, mentre que actualment s'ha observat que l'exó 5 és un dels exons més freqüentment delecionat durant la maduració dels mRNAs d'aquest gen. Potser per aquesta raó, aquests ratolins no mostraven cap fenotip aparent ja que es tractava més aviat d'un model *knockdown* que no pas d'un *knockout*.

### 6.2.2 Models murins de *Gcap1* i *Gcap2*

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, recentment s'han proposat dos *partners* proteics de CERKL també implicats en distròfies de retina: *GCAP1* i *GCAP2*. Les GCAPs són proteïnes que actuen durant la fototransducció activant les guanilat ciclastes. En condicions de llum, la concentració de calci disminueix degut al tancament dels canals iònics dependents de cGMP i això afavoreix l'intercanvi iònic Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> a les GCAPs, que deixen d'estar inhibides i activen les guanilat ciclastes (RetGCs) per tal de regenerar els nivells de cGMP i així tornar a l'estat de repòs inicial, recuperant la sensibilitat a la llum i a canvis d'intensitat d'aquesta (Makino et al. 2008).

La *GCAP1* s'expressa principalment a cons, mentre que la *GCAP2* a bastons. Encara que *GCAP1* és causant d'adCD i adCRD, i *GCAP2* és responsable d'adMD i adRP, estudis en models murins *knockout* per aquests gens no han mostrat cap tipus de degeneració retinal. A més, en ambdós models es mantenen els nivells normals de RetGCs així com d'altres proteïnes implicades en la fototransducció, a excepció de la *GCAP2* que es veu incrementada a mode compensatori en el cas del mutant *Gcap1*<sup>-/-</sup>; i de la recoverina (proteïna encarregada de perllongar l'activitat de la rodopsina fotoactivada) que es veu disminuïda en un 20% en el cas dels animals *Gcap2*<sup>-/-</sup>. Estudis més en detall mostren que l'activitat de les RetGCs dels transgènics *Gcap1*<sup>-/-</sup> es veu lleugerament incrementada amb una major sensibilitat al calci. En conseqüència, la recuperació als flaixos de llum és més ràpida en els KO, indicant que en absència de *GCAP1*, *GCAP2* és capaç de mantenir la regulació de les RetGCs. En el cas de *Gcap2*<sup>-/-</sup>, la recuperació als flaixos de llum és més lenta en els animals KO respecte als WT. A més, els bastons dels mutants són més sensibles a aquests flaixos i tendeixen a saturar-se abans i a menors intensitats (Markino et al. 2008, Markino et al. 2012). Malauradament, i de la mateixa manera que el model *Cerkl*<sup>-/-</sup>, en cap dels dos models es recrea el fenotip observat en els pacients, que en aquests ratolins es presenta molt lleu.

### 6.2.3 Models en peix zebra


En els últims anys el peix zebra ha esdevingut un model molt utilitzat en l'estudi de les malalties visuals. En el cas de les distròfies de retina, ja existeixen més d'una quinzena de models, la majoria *knockdown* (vegeu Taula 3).

L'any 2004 es va publicar el primer model DR en peix zebra, un *knockdown* de *crx*. Els animals presentaven ulls més petits amb problemes de laminació a la retina. L'estudi a fons d'aquest model revelava una nova funció del gen durant el desenvolupament embrionari, en la regionalització del primordi òptic i en l'inici de la retinogènesi. El bloqueig de l'expressió de *crx* comportava un retard en la sortida dels precursors de fotoreceptors del cicle cel·lular, causant anomalies en la diferenciació de la retina. A més, es va comprovar que *crx* regulava la transcripció de dos altres gens DR: *irbp* i *otx2* (Shen i Raymond 2004).

En el cas dels gens implicats en ciliopaties, els models murins sovint han fracassat a l'hora de mimetitzar el fenotip observat en els pacients. En aquests casos, el peix zebra s'ha utilitzat com a alternativa i, per aquesta raó, existeixen tants models en aquest grup de gens en particular: *c2orf71*, *cc2d2a*, *cep290*, *iqcb1*, *ofd1*, *rp2*, *rpgr*, *rpgrip1*, *topors*, *ttc8* i *ush2a* (Estrada-Cuzcano et al. 2012). Cal remarcar que el fenotip obtingut en aquests mutants és força solapant; el *knockdown* de qualsevol dels ortòlegs provoca microoftàlmia acompanyada d'una pèrdua dels segments externs dels fotoreceptors i, en alguns casos, defectes en la laminació de la retina.

Un model de peix zebra ben establert és el de *prpf31*, implicat en el processament del mRNA, on es va generar un *knockdown* en el qual dosis altes de morfolino provocaven malformacions severes i, fins i tot, la mort, mentre que dosis més baixes desencadenaven defectes visuals. Les retines dels mutants presentaven anomalies en els segments externs dels fotoreceptors. Anàlisi del transcriptoma dels ulls d'aquests animals van demostrar que la deficiència de Prpf31 afectava als mRNAs específics de retina. A més, es va observar un fenomen compensatori en els mutants, ja que l'expressió d'altres factors d'*splicing* es trobava elevada respecte els animals control (Linder et al. 2010).

La generació de models *knockdown* en peix zebra és una tasca relativament ràpida i fàcil, i econòmicament abordable. De fet, les últimes publicacions de nous gens DR han anat sovint acompanyades de la descripció fenotípica d'aquests models, és el cas de *znf513* i *dhhds*, la qual ha permès obtenir pistes clau en la relació d'aquests gens amb la degeneració de la retina (Li et al. 2010, Züchner et al. 2011).



# Objectius



# OBJECTIUS

---

Les distròfies de retina engloben un conjunt de patologies caracteritzades per la degeneració dels fotoreceptors i les cèl·lules de l'epiteli pigmentari. Es tracta de malalties amb una elevada heterogeneïtat genètica i al·lèlica. Actualment, s'han descrit més de 180 *loci*, que expliquen poc més del 50% dels casos, i els quals de manera individual poden causar diferents retinopaties. Aquests fets dificulten el diagnòstic genètic, expliquen els coneixements parcials sobre les relacions genotip-fenotip i, encara avui, posen de manifest les mancances conceptuals per conèixer a fons les bases moleculars i cel·lulars d'aquestes patologies.

El nombre de gens implicats en les distròfies de retina augmenta any rere any, però la contribució d'aquests a la degeneració de la retina es desconeix en la majoria dels casos. La importància dels estudis funcionals rau en la possibilitat d'identificar dianes moleculars per aplicar teràpies, la major part de les quals probablement dependran de la via cel·lular afectada o del tipus de mutació.

En el grup en el qual em vaig incorporar per realitzar aquest treball de tesi doctoral, es va identificar un nou gen responsable de retinosi pigmentària, més tard conegut també com a causant de distròfia de cons i bastons, el gen *CERKL*. Una de les línies principals del grup era el diagnòstic genètic i en una família afecta de RP es va descriure una nova mutació al gen *RP2*. Per demostrar la patogenicitat d'aquesta nova variant nucleotídica calien estudis funcionals. De fet, amb aquest treball vaig establir el meu primer contacte amb el complex món de la funció gènica, però atès que el cos experimental més important de la tesi s'ha dedicat a *CERKL* (objectius 1, 2 i 3), l'estudi funcional de *RP2* es presenta com a 4t objectiu. Partint de les premisses anteriors i de l'experiència prèvia del grup en aquestes línies de recerca, ens vàrem proposar:

1. La caracterització dels productes transcripcionals del gen *CERKL* i la mutació més prevalent, R257X
  - 1.1 L'anàlisi de l'expressió i *splicing* alternatiu de *CERKL* en vertebrats
  - 1.2 L'estudi de les isoformes de mRNA a la retina humana i murina
  - 1.3 L'estudi de la freqüència i patogenicitat de la mutació R257X en famílies espanyoles
2. La generació i caracterització de models animals de RP per silenciament o deleció de *CERKL*
  - 3.1 La caracterització del fenotip d'un model *knockout* de ratolí
  - 3.2 La construcció i caracterització del fenotip d'un model *knockdown* de peix zebra
3. L'aproximació funcional de *CERKL*
  - 3.1 L'anàlisi de la localització subcel·lular de *CERKL* en cèl·lules en cultiu i a la retina
  - 3.2 L'estudi dels dominis funcionals de *CERKL*
4. Els estudis funcionals *in vivo* i *in vitro* de la variant c.1073-9T>A de *RP2*





# Resultats



## INFORME DE LA DIRECTORA

La memòria de la Tesi Doctoral “Models *in vivo* i *in vitro* per a l’estudi de gens causants de distròfies de retina: *CERKL* i *RP2*” presentada per Marina Riera Gibernau, es presenta en un compendi de 4 publicacions. La participació de la doctoranda és la que es detalla a continuació:

**ARTICLE 1:** *High transcriptional complexity of the retinitis pigmentosa CERKL gene in human and mouse.* Alejandro Garanto\*, Marina Riera\*, Esther Pomares, Jon Permanyer, Marta de Castro-Miró, Florentina Sava, Josep F Abril, Gemma Marfany i Roser González-Duarte. **Investigative Ophthalmology and Visual Science 52: 5202-5214, 2011.** Índex d’impacte (2011): 3.597 (Q1) \*contribució equivalent al treball

La doctoranda, Marina Riera, ha contribuït substancialment al treball experimental i per això comparteix coautoría amb el primer signant. La seva participació ha consistit en realitzar tota la part experimental relacionada amb l’estudi de *CERKL* en humans. La doctoranda ha realitzat els assajos de RT-PCR i 5’ i 3’ RACE, ha analitzat les seqüències, ha cercat els promotors, ha realitzat els clonatges i els assajos de traducció *in vitro*. A més, ha participat activament en la discussió de les dades i la redacció del treball.

**ARTICLE 2:** *Targeted knockdown of Cerkl, a retinal dystrophy gene, causes mild affectation of the retinal ganglion cell layer.* Alejandro Garanto, Javier Vicente-Tejedor, Marina Riera, Pedro de la Villa, Roser González-Duarte i Gemma Marfany. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease 1822: 1258-1269, 2012.** Índex d’impacte (2011): 5.387 (Q1)

La doctoranda ha contribuït en aquest treball en el disseny i l’obtenció d’un anticòs murí anti-Cerkl, ha participat en la gestió i manteniment de la colònia de ratolins transgènics, en l’obtenció de mostres i l’extracció de RNA de diferents teixits i, en col·laboració amb l’Alejandro Garanto, en el disseny i l’anàlisi de la tècnica de *real-time* RT-PCR realitzada a partir de mostres de retina WT i KO. Endemés, ha contribuït a la discussió i redacció de l’article.

**ARTICLE 3:** *CERKL knockdown causes retinal degeneration in Zebrafish.* Marina Riera, Demian Burguera, Jordi Garcia-Fernàndez i Roser González-Duarte. **PLOS ONE (pendent de publicació, 2013).** Índex d’impacte (2011): 4.092 (Q1)

La doctoranda ha realitzat la major part del treball experimental que apareix en aquest article. Ha dut a terme l’anàlisi d’expressió i de promotors de *cerkl* durant el desenvolupament embrionari de peix zebra, l’estudi del gen en diferents teixits adults, els clonatges dels cDNAs i les transfeccions en cultius cel·lulars, la generació i manteniment dels animals *knockdown*, l’estudi del fenotip, els assajos *in vivo* d’apoptosi cel·lular i l’obtenció i la realització de crioseccions pels experiments de tinció Hematoxilina-Eosina, d’immunohistoquímica i d’hibridació *in situ*. Ha participat molt activament en la discussió de les dades i en la redacció del treball.

**ARTICLE 4:** *An intronic single point mutation in RP2 causes semidominant X-linked Retinitis Pigmentosa.* Esther Pomares\*, Marina Riera\*, Joaquín Castro-Navarro, Ángeles Andrés-Gutiérrez, Roser González-Duarte, Gemma Marfany. **Investigative Ophthalmology and Visual Science 50: 5107-5114, 2009.** Índex d’impacte (2009): 3.431 (Q1) \*contribució equivalent al treball

## Resultats

La doctoranda ha estat la responsable de les proves funcionals *in vivo*, *in vitro* i *in silico* necessàries per demostrar la patogenicitat d'una nova variant nucleotídica identificada a l'intró 3 del gen *RP2*. Per aquesta raó, comparteix coautoria amb la primera signant. La seva contribució ha consistit en l'anàlisi de l'impacte de la mutació en l'*splicing* del gen mitjançant l'ús de programes de predicció *on line*, conjuntament amb l'estudi de l'expressió del gen *RP2* per RT-PCR de mostres de sang de pacients i dones portadores, així com en la identificació i descripció de les isoformes generades en cada cas, que varen ser quantificades mitjançant la tècnica de la *real-time* RT-PCR. Finalment, la doctoranda va comprovar la patogenicitat de la mutació *in vitro*, gràcies al disseny i construcció de minigens i la seva transfecció en cèl·lules en cultiu. La seva contribució en la discussió de les dades i redacció del treball va ésser molt important.

Barcelona, 10 d'abril de 2013

Roser González-Duarte

## CAPÍTOL 1

Caracterització transcripcional de gen *CERKL* i de la mutació més prevalent, R257X

### PUBLICACIÓ 1

*“High transcriptional complexity of the retinitis pigmentosa CERKL gene in human and mouse”*

### MATERIAL SUPLEMENTARI

Taules i figures suplementàries de la Publicació 1

### RESULTATS SUPLEMENTARIS

El mecanisme *nonsense-mediated decay* com a causa molecular de retinosi pigmentària en les famílies portadores de la mutació R257X de *CERKL*



**PUBLICACIÓ 1****TÍTOL**

“*High transcriptional complexity of the retinitis pigmentosa CERKL gene in human and mouse*”

**AUTORS (ANY)**

Alejandro Garanto\*, Marina Riera\*, Esther Pomares, Jon Permanyer, Marta de Castro-Miró, Florentina Sava, Josep F Abril, Gemma Marfany i Roser González-Duarte

\*contribució equivalent al treball

**REFERÈNCIA**

Investigative Ophthalmology and Visual Science 52: 5202-5214, 2011

**RESUM**

*CERKL* és un gen inicialment identificat com a responsable de retinosi pigmentària (RP) i, més recentment, descrit també com a causant de distròfia de cons i bastons (CRD). Per tal d'estudiar les causes de la patogenicitat de les diferents mutacions descrites, ens vàrem proposar realitzar un ampli estudi a nivell transcripcional, tant en humà com en ratolí, enfocat principalment a caracteritzar les isoformes de mRNA i l'ús de promotors alternatius. Es varen utilitzar dues estratègies metodològiques; per una banda, una anàlisi *in silico* exhaustiva del locus i, per l'altre, estudis *in vitro* utilitzant diferents teixits humans i murins, així com diverses línies cel·lulars. L'anàlisi *in silico* va consistir en la cerca d'inicis de transcripció i predicció de metionines iniciadores de traducció mitjançant puntuacions *Kozak*. A més, es va generar una matriu a partir de tots els gens causants de RP i CRD no sindròmica per tal de cercar motius estructurals comuns com a possibles dianes de factors de transcripció específics de retina. Mitjançant RT-PCRs i anàlisis 5' i 3' RACE, es van poder caracteritzar els diferents transcrits d'alguns teixits, especialment a la retina. Els resultats van revelar una gran multiplicitat d'isoformes, la gran majoria descrites per primera vegada: més de 20 transcrits en humà i més de 30 en ratolí. Aquesta gran complexitat transcripcional incloïa un alt grau d'*splicing* alternatiu (que afectava majoritàriament la part 5' del gen) i l'ús de diferents promotors, els quals van permetre la identificació de quatre llocs d'inici de transcripció (TSSs) diferents en cada espècie. En molts casos, l'ús de promotors alternatius hauria comportat la pèrdua de la metionina d'inici. Per aquesta raó, es va analitzar *in silico* i comprovar *in vitro* la capacitat potencial d'altres metionines com a iniciadores de la traducció proteica. Per últim i mitjançant tècniques immunohistoquímiques, es va localitzar *CERKL* murina a la regió perinuclear i citosòlica dels cons. En conclusió, aquesta estratègia combinada va permetre la realització d'un mapa dels transcrits de *CERKL* en cada espècie i va suggerir una regulació molt fina a nivell de la retina i altres teixits, establint una bona base pels estudis de correlació genotip-fenotip.

### **APORTACIÓ PERSONAL AL TREBALL**

La part que he dut a terme en aquesta publicació d'autoria compartida ha consistit en la totalitat de la part experimental i anàlisi corresponent realitzada sobre mostres humanes, que s'ha basat en: a) l'extracció de RNA i la realització de RT-PCRs per caracteritzar els transcrits dels diferents teixits i línies cel·lulars; b) la identificació de les isoformes majoritàries a retina mitjançant RT-PCR semi-quantitativa; c) els assajos 5' RACE per a la cerca de nous promotors a partir de RNA de retina comercial; i d) la construcció plasmídica de diferents isoformes humanes i la seva posterior transfecció en cèl·lules en cultiu per a l'anàlisi de traducció *in vitro*. Finalment, he col·laborat en la redacció i discissió del manuscrit.

# High Transcriptional Complexity of the Retinitis Pigmentosa *CERKL* Gene in Human and Mouse

Alejandro Garanto,<sup>1,2,3,4</sup> Marina Riera,<sup>1,2,3,4</sup> Esther Pomares,<sup>1,2,3</sup> Jon Permanyer,<sup>1,2</sup> Marta de Castro-Miró,<sup>1</sup> Florentina Sava,<sup>1</sup> Josep F. Abril,<sup>1,2</sup> Gemma Marfany,<sup>1,2,3</sup> and Roser González-Duarte<sup>1,2,3</sup>

**PURPOSE.** To shed light on the pathogenicity of the mutations in the retinitis pigmentosa gene *CERKL*, the authors aimed to characterize its transcriptional repertoire and focused on the use of distinct promoters and alternative splicing in human and mouse tissues.

**METHODS.** In silico genomic and transcriptomic computational customized analysis, combined with experimental RT-PCRs on different human and murine tissues and cell lines and immunohistochemistry, have been used to characterize the transcriptional spectrum of *CERKL*. In the mouse retina, *Cerkl* is detected primarily in ganglion cells and cones but can also be observed in rods. *Cerkl* is mainly cytosolic. It localizes in the outer segments of photoreceptors and in the perinuclear regions of some cells.

**RESULTS.** An unexpected multiplicity of *CERKL* transcriptional start sites (four in each species) plus a high variety of alternative splicing events primarily affecting the 5' half of the gene generate >20 fully validated mRNA isoforms in human and 23 in mouse. Moreover, several translational start sites, compatible with a wide display of functional domains, contribute to the final protein complexity.

**CONCLUSIONS.** This combined approach of in silico and experimental characterization of the *CERKL* gene provides a comprehensive picture of the species-specific transcriptional products in the retina, underscores highly tuned gene regulation in different tissues, and establishes a framework for the study of *CERKL* genotype-phenotype correlations. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:5202-5214) DOI:10.1167/iovs.10-7101

Spatiotemporal differential splicing, often related to developmental events or tissue differentiation processes, affects >95% of the human genes, as recently unveiled after massive

sequencing of the human transcriptome.<sup>1,2</sup> Alternative splicing and the use of alternative promoters and transcriptional splice sites are instrumental for the generation of complexity, as proteins with different functions are encoded by the transcript variants produced. Cells can thus deploy a wide array of proteins, all arising from a single genomic sequence.<sup>3,4</sup>

Misregulation of alternative splicing is often at the basis of human disease, given that distortions in the splicing process either directly alter the domains displayed by proteins or, more relevant to pathology, cause frameshifts that are frequently associated with premature stop codons.<sup>5</sup> Therefore, prior knowledge of all the physiologically produced transcripts from a gene of interest is crucial to draw genotype-phenotype correlations in hereditary diseases and to infer the degree of pathologic severity.<sup>6-8</sup> This is even more relevant when considering genetic disorders of the mammalian central nervous system (CNS) and derived neurologic tissues, such as the retina, in which the highest degree of alternative splicing events occurs.<sup>9-11</sup>

Retinitis pigmentosa (RP) is a hereditary neurodegenerative disorder with extremely high genetic heterogeneity. It affects 1:4000 people worldwide, and it is the major cause of nontraumatic adult blindness.<sup>12</sup> Although >45 genes have been identified as causative of RP (Retnet, <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>), approximately 40% of the genetic cases remain unassigned, highlighting the relevance of identifying new candidates because each gene will presumably explain very few cases. The molecular diagnosis becomes even more complex under the light of recent reports that reveal new mutations in known RP genes, which alter retina-specific splicing events either by changing the number of exons included in the mature product or by modifying the relative proportion of the spliced isoforms.<sup>13-15</sup> These findings widen the range of molecular mechanisms underlying tissue-restricted abnormalities, decrease the number of unknown RP genes, illuminate new scenarios for tissue-specific gene function, and emphasize the need for accurate characterization of candidate splicing products, particularly because 70% of the exons in the human genome are tissue specific.<sup>1,16</sup>

Our group first identified *CERKL* as an RP gene<sup>17</sup> by detecting a homozygous nonsense mutation (R257X) that cosegregated in consanguineous Spanish families. *CERKL* was widely expressed, and the highest transcription levels were observed in the retina.<sup>17,18</sup> Interestingly, the R257X mutation was embedded in an alternatively spliced exon; therefore, some of the *CERKL* isoforms were a priori functional in the patients.<sup>19</sup> These results prompted us to undertake a more accurate characterization of the *CERKL* transcripts in human and mouse. Our work unveils an unexpectedly high complexity of the *CERKL* transcripts, particularly at the 5' end of the gene, with alternative first exons, inclusion/exclusion of alternatively spliced exons, intron retention, and additional splice sites.

From the <sup>1</sup>Departament de Genètica, Facultat de Biologia, and the <sup>2</sup>Institut de Biomedicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; and <sup>3</sup>CIBERER, Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain.

<sup>4</sup>These authors contributed equally to the work presented here and should therefore be regarded as equivalent authors.

Supported by Grants SAF2009-08079 (Ministerio de Ciencia e Innovación) and SGR2009-1427 (Generalitat de Catalunya), CIBERER (U718), Fundaluce and ONCE (RG-D) and BFU2010-15656 (GM). AG, MR, and MC-M were in receipt of the fellowships FPI BES-2007-15414, FPU AP2007-00805, and FPI BES-2010-030745, respectively. EP was under contract by CIBERER.

Submitted for publication December 20, 2010; revised March 31, 2011; accepted April 11, 2011.

Disclosure: A. Garanto, None; M. Riera, None; E. Pomares, None; J. Permanyer, None; M. de Castro-Miró, None; F. Sava, None; J.F. Abril, None; G. Marfany, None; R. González-Duarte, None

Corresponding author: Roser González-Duarte, Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avenida Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain; rgonzalez@ub.edu.

Overall, these results, together with the bioinformatics analysis, strongly support the generation of many protein isoforms and the different roles of CERKL in retinal cells and other tissues, and they provide a molecular framework for genotype-phenotype correlations because the location of the mutation in the *CERKL* gene would affect the number and type of transcripts and, hence, be related to the progression and severity of the disease.

## MATERIALS AND METHODS

### Animal Handling, Tissue Dissection, and Preparation of Samples

All animal handling and procedures were performed according to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and the regulations of the animal care facilities at the University of Barcelona. In brief, C57BL/6J mice (Charles River Laboratories, Davis, CA) were euthanized with CO<sub>2</sub> followed by cervical dislocation, and specific tissues and organs were dissected and immediately frozen in liquid nitrogen. Human blood and saliva samples were collected from nonaffected subjects with RP, after they provided informed consent, in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki. Retina and brain total RNA samples were supplied by Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, CA), and liver cDNA was provided by BD Biosciences (San Jose, CA).

### Cell Culture and Constructs

Human embryonic kidney cells 293T (HEK293T, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) and wild-type fibroblasts (kindly provided by Daniel Grinberg and Lluïsa Vilageliu) were grown in DMEM with 4 mM L-glutamine. The human lung adenocarcinoma epithelial cell line (A549; Abcam, Cambridge, MA) was cultured in Ham's F12 L-glutamine (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). Both media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA).

### RNA Extraction and RT-PCR

For total RNA extraction, a tissue kit (High Pure RNA Tissue Kit; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) was used in accordance with the manufacturer's instructions. Human and mouse blood RNA was mixed (RNAlater; Ambion/Applied Biosystems, Foster City, CA) before extraction (RiboPure-Blood Kit; Ambion/Applied Biosystems). Saliva samples were treated as indicated (Oragene/RNA protocol; DNA Genotek Inc., Ontario, Canada), and RNA was extracted from human cultured cells (RNeasy kit; Qiagen, Germantown, MD). RT-PCR assays were performed for human and mouse samples (Mint Kit [Evrogen, Moscow, Russia] or Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit [Roche Diagnostics, Indianapolis, IN]). For tissue expression analysis, all reaction mixtures (50 µL) contained 10 µM each primer pair, 2 µM dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 U polymerase (GoTaq; Promega, Madison, WI). Primer localizations are depicted in Figures 1A2 (human) and 1B2 (mouse), and the sequences are given in Supplementary Table S1, <http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-/DCSupplemental>. *CERKL* was amplified using primers A and B for human and a and b for mouse (120 seconds at 94°C followed by 35 cycles of 94°C for 20 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30/20 seconds). *GAPDH* was used for normalization (120 seconds at 94°C and 30 cycles of 94°C for 20 seconds and 63°C for 120 seconds).

Analysis of the 5' and 3' UTRs of human and murine *CERKL* retina isoforms was performed, using either the Plug adaptor or oligo-d(T) primers (provided in the Mint Kit; Evrogen) paired with suitable *CERKL*-specific internal primers under the indicated PCR conditions. The characterization of alternatively spliced variants and promoters was performed using a combination of the internal primers located in different exons. The primers were designed to share the same amplification conditions: 120 seconds at 94°C followed by 40 cycles of 94°C

for 20 seconds, 58°C for 30 seconds, and 72°C for 90 seconds. All sequences have been submitted to GenBank (accession numbers are shown in Supplementary Tables S2A and S2B, <http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-/DCSupplemental>).

### Transfections and Recombinant Protein Expression and Immunodetection

For protein expression, HEK293T cells (2 × 10<sup>5</sup> cells) were seeded and transfected using reagent (Lipofectamine 2000; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's protocol. The recombinant constructs were obtained by cloning representative human cDNA isoforms (h2, h13, h18 in Figs. 1A and 4A) with and in-frame HA epitope fused at the C terminus into pcDNA 3.1 (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA). After 48 hours, cells were lysed with protein loading buffer ×1 and boiled for 5 minutes. Protein lysates were loaded onto 12% SDS-PAGE gels that were transferred and analyzed by Western blot. Immunodetection was performed with a primary monoclonal anti-HA (1:1000) and HRP-conjugated anti-mouse secondary antibody (1:3000). Tubulin immunodetection was used as a loading control.

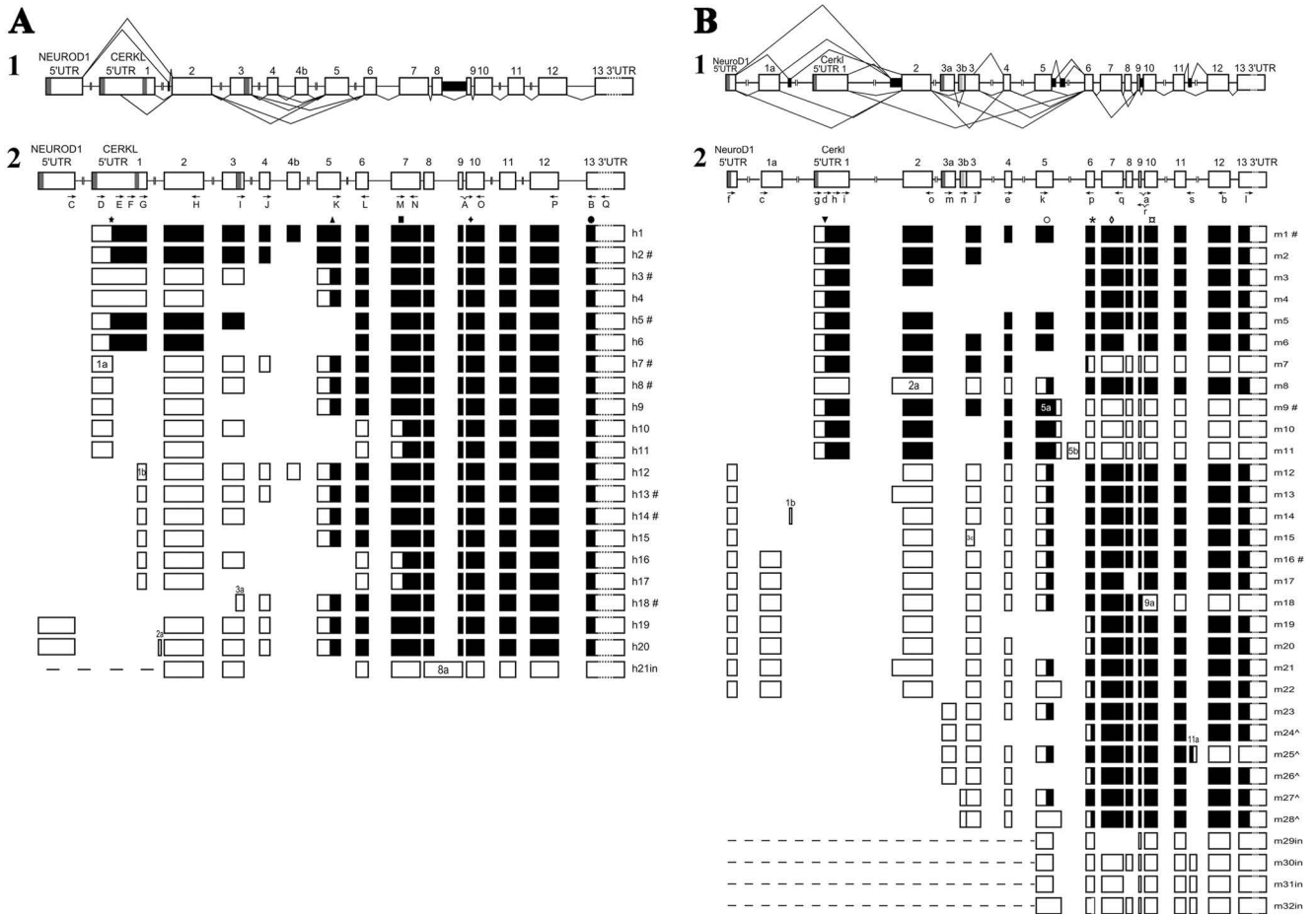
### Immunohistochemistry on Mouse Retina Cryosections

Eyes from 8-week-old C57BL/6J mice were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and 0.5% glutaraldehyde (2 hours at room temperature), cryoprotected in acrylamide, and embedded in OCT (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA). Sixteen-micrometer sections on polylysine-covered slides were used for immunostaining, as described<sup>20</sup> with some modifications. Incubation with peanut agglutinin (PNA) conjugated to Alexa Fluor 647 (40 mg/mL; Invitrogen Life Technologies) and the primary antibodies mouse anti-rhodopsin 1:500 (Abcam), mouse anti-PKCα 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), and preabsorbed rabbit anti-CERKL 1:50, was performed overnight. Subsequently, slides were incubated with the corresponding secondary antibodies (1:300) conjugated to either Alexa Fluor 488, 546, or 568 (Invitrogen Life Technologies). Sections were mounted with reagent (Fluoprep; Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) and photographed with a confocal microscope (SP2; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

### Bioinformatic Analysis of the Genomic Human CERKL Locus

Most of the computational analyses were performed using the genomic sequence of the human *CERKL* locus at chromosome 2 (March 2006 assembly version [NCBI36/hg18]) within the interval 182,029,864 bp to 182,259,440 bp (including the *ITG4* and *NEUROD1* loci), which was retrieved from the UCSC human genome browser.<sup>21</sup> However, for the purpose of comparative genomics and to determine the conservation among human and other vertebrates (such as *Macaca mulatta*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, and *Takifugu rubripes*), precomputed whole genome alignments were analyzed through the VISTA UCSC browser mirror, which provides the VISTA track feature.<sup>22</sup> The syntenic region of the mouse genome was also retrieved. BLASTN and TBLASTX alignments were performed on the syntenic sequences using the NCBI bl2seq algorithm<sup>23</sup> for a more in-depth comparison between human and mouse.

Previously described *CERKL* isoforms were retrieved from several databases: RefSeq,<sup>24</sup> GenBank,<sup>25</sup> dbTSS,<sup>26</sup> and VEGA.<sup>27</sup> Some of the dbTSS transcripts were already mapped on the human *CERKL* genomic region at the VEGA Web site. These sequences, as well as experimentally validated *CERKL* cDNAs (this work), were mapped onto the analyzed sequence interval using Exonerate,<sup>28</sup> following the est2genome model algorithm for easier comparison of all the exonic structures from both the database and experimental evidence (complete visualization is shown in Supplementary Fig. S1, <http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-/DCSupplemental>).



**FIGURE 1.** Alternately spliced *CERKL* isoforms in human and mouse retina. Extremely high complexity of the splicing events in human (**A1**) and mouse (**B1**) *CERKL* transcripts. *Open boxes*: exons. *Filled boxes*: retained introns or cryptic noncoding exons. *Angled lines* above and below the gene structure indicate validated splicing events. Scheme depicting all the human (**A2**) and mouse (**B2**) spliced variants observed in the retina. Exons are indicated as *boxes* and the coding sequence (CDS) for each isoform, considering the higher likelihood of first methionine, is shown in *black*. *Dark gray*: TSS found in retina. *Light gray*: nonretinal TSS. \*Main isoforms in each species. *Arrows*: letters indicate the position and direction of the primers used for PCR reactions (complete list and sequence in Supplementary Table S1, <http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-DCSupplemental>). ^Nonretinal isoforms found in mouse liver and spleen. The scores of the Kozak's motif hits containing putative TIS methionines for human are: ★ 12.003; ▲ 5.248; ■ 8.389; ◆ 5.281; ● 8.852. For mouse they are: ▼ 13.384; ○ 9.620; \*10.662; ◇ 8.389; ✕ 8.863 (the complete list of all Kozak's scores are contained in Supplementary Table S5, <http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-DCSupplemental>).

Although a track for the First-Exon-Finder program<sup>29</sup> on the UCSC genome browser was already available, an additional attempt was performed to predict more CpG islands, promoters, and first exons on the *CERKL* genomic region (cutoff value for the first-exon a posteriori probability [APP] = 0.5, cutoff value for the promoter APP = 0.4, and cutoff value for the promoter APP = 0.4).

Genomic sequences for a set of 49 genes related to RP, classified into 10 distinct functional classes, were downloaded from GenBank: *RHO*, *PDE6A*, *PDE6B*, *CNGA1*, *CNGB1*, *SAG*, *GUCA1B*, and *GUCY2D* (phototransduction); *ABCA4*, *LRAT*, *RPE65*, *RLBP1*, *RGR*, *RDH12*, and *RBP3* (retinol metabolism); *PRPH2*, *PROM1*, *EYS*, and *ROM1* (photoreceptors structure); *CRX*, *NR2E3*, *NRL*, and *OTX2* (transcription factors); *SEMA4A*, *MERTK*, *CRB1*, and *USH2A* (cellular interaction); *PRPF3*, *PRPF8*, *PRPF31*, *RP9*, *SNRNP200* (mRNA processing); *TULP1*, *RPGRIP*, *RPGR*, *RP2*, *FSCN2*, *RP1*, *AIPL1*, *CEP290*, and *LCA5* (transport); *KLHL7* and *TOPORS* (ubiquitin/proteasome pathway); *IMPDH1*, *CA4*, and *IDH3B* (several types of enzymatic activities); and, finally, *RD3*, *SPATA7*, and *PRCD* (unknown function). Up to 10-kbp upstream sequences of these genes were searched for overrepresented motifs by running MEME.<sup>30</sup> The first analysis was performed over the whole set of sequences; then, in the following round, MEME was run separately for the sequences of each functional class. Two sets of

parameters were used to characterize long and short motifs. To search for long motifs, the "anr" model was used, with a minimum width of 8 and a maximum width of 20, and a total of 200 iterations (-mod anr -n motifs 20 -minw 8 -maxw 20 -maxiter 200). To identify the short ones, the same model was applied, but the maximum width was reduced to 10 (-mod anr -n motifs 10 -minw 8 -maxw 10 -maxiter 200). Both sets of parameters were applied to the whole data set analysis and to the split group consisting of 10 different functional classes. For each characterized motif, a log likelihood matrix was derived using two background models, the random model (equiprobability for all four nucleotides) and the model considering the GC content bias (40% GC for the whole *CERKL* genomic sequence, including the neighboring loci). We extended the analysis to the promoters (1 kb upstream) of the cone-rod dystrophy (CRD) genes using the TRANSFAC matrices with particular emphasis on the retina-related transcription factor. The genes were grouped according to the disease to which they contributed most: RP (*RHO*, *PDE6A*, *PDE6B*, *CNGA1*, *CNGB1*, *SAG*, *GUCA1B*, *LRAT*, *RPE65*, *RLBP1*, *RGR*, *RDH12*, *RBP3*, *ROM1*, *EYS*, *NR2E3*, *NRL*, *OTX2*, *MERTK*, *CRB1*, *USH2A*, *PRPF3*, *PRPF8*, *PRPF31*, *RP9*, *SNRNP200*, *TULP1*, *RPGR*, *RP2*, *FSCN2*, *RP1*, *CEP290*, *LCA5*, *KLHL7*, *TOPORS*, *IMPDH1*, *CA4*, *IDH3B*, *RD3*, *SPATA7*, and *PRCD*), CRD (*GUCA1A*, *PITPNM3*, *RIMS1*, *UNC119*, *ADAM9*, *CACNA2D4*, *RAX2*,

*CDHRI*, and *CACNA1F*), and the two retinal disorders (*ABCA4*, *GUCY2D*, *PROM1*, *PRPH2*, *CRX*, *SEMA4A*, *RPGRIP1*, *AIPL1*, and *CERKL*). Unfortunately, no clear pattern of single/clustered transcription factor sites emerged considering any of the three gene groups, either on general or on retina-specific transcription factor matrices (Supplementary Fig. S2, <http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-DCSupplemental>).

In addition to those generated by MEME, a new set of matrices corresponding to a selection of known transcription initiation factors (including TATA, CAAT, USF, INI, SRF, SP1, and TFIIA) was downloaded from TransFac.<sup>31</sup> Retina-related transcription factor matrices (for PAX6, AP1, ZF5, AP2REP, AP2ALPHA, AP2GAMMA, TBP, MAZR, CRX, GATA4, SP3, ETF, KROX, WT1, NR2E3, V-MAF, and WT1) were also gathered from TransFac, Promo,<sup>32</sup> and Jaspar.<sup>33</sup> All the matrices were mapped into the analyzed genomic region of *CERKL* using custom Perl scripts with the specific purpose of defining potential novel alternative transcription starting sites (TSS) for *CERKL* isoforms. The score hits on the genomic sequence were normalized between 0 and 1; then a threshold was defined as the score above 95% of the distribution for all those scores. Only hits of matrices showing a normalized score equal to or greater than the threshold were considered (a summary of those found on the 1 kbp upstream for every reported human and mouse *CERKL* exons that included a TSS is provided on Supplementary Tables S4A (human) and S4B (mouse), <http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-DCSupplemental>).

Putative translation start sites were evaluated using the Kozak matrix<sup>34</sup> under the same terms. Moreover, the ENCODE H3K4Me3 track<sup>35</sup> on the UCSC genome browser was also considered as additional transcriptional evidence, given that histone modification correlates with transcriptionally active sites.<sup>36</sup> The distribution of SNPs across the exons of the *CERKL* gene was analyzed using dbSNP31, over the hg19 database.

## RESULTS

### Comprehensive Identification of Alternatively Spliced *CERKL* Isoforms

Evidence of different alternatively spliced isoforms of *CERKL* have been reported, but a comprehensive prioritized list of the physiologically relevant transcript is still missing.<sup>19,37</sup> Furthermore, its wide tissular expression<sup>17,18</sup> appears to be inconsistent with the tissue-restricted phenotype of *CERKL* mutations because only the retina was affected. In this case, as happens with other retina-associated disease genes, tissue-specific isoforms might have reconciled this apparent paradox.<sup>14</sup>

Thus, we first aimed to exhaustively characterize the *CERKL* alternatively spliced isoforms generated in human and murine retinas and to perform an interspecific comparative analysis. Two different methods for the synthesis of the cDNAs (detailed description in Materials and Methods) were used to replicate the experiments, validate the sequences, and avoid technical biases. For a comprehensive isoform characterization, we performed 5' and 3' RACE reactions to identify initial and terminal UTRs on endogenously expressed retinal transcripts and subsequently used a battery of internal PCR primers (listed in Supplementary Table S1 [<http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-DCSupplemental>] and located in Figs. 1A2 [human] and 1B2 [mouse]) to unveil the combinatorial network of alternative promoters and exons displayed in *CERKL* transcripts. From these data we designed specific primers to identify fully processed transcripts encompassing the first to the last exon and thus depict the complete repertoire of *CERKL* aligned with the genomic primary structure as a means to validate each transcript variant.

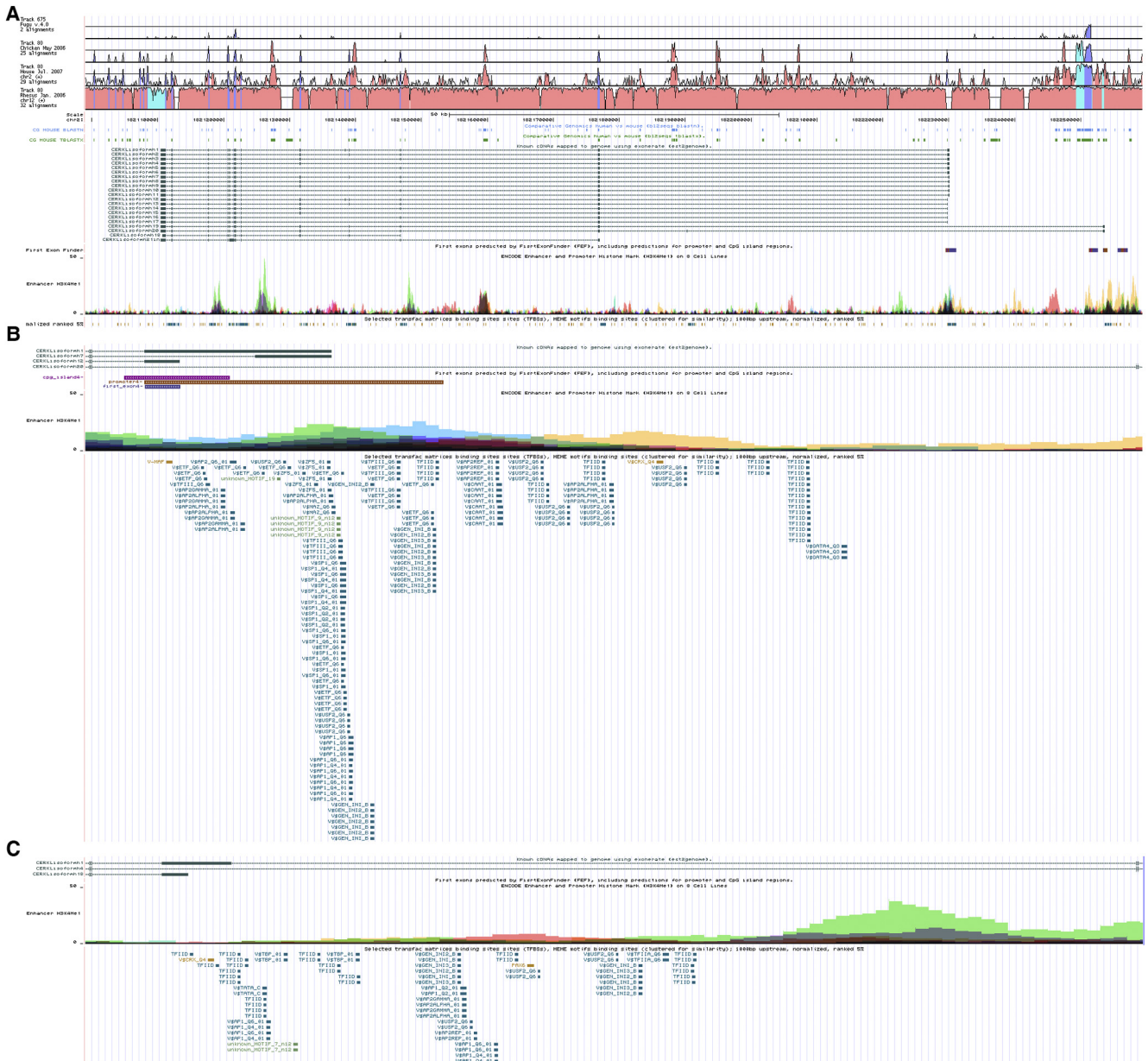
Overall, the retinal *CERKL* isoforms generated by alternative splicing events showed an unexpected complexity because >20 transcripts were identified in human and mouse retinas.

The genomic organization of *CERKL* with the splicing events (depicted as angled lines) and 5'UTRs (gray boxes) identified are shown in Figures 1A (human) and 1B (mouse). The most abundant transcripts are indicated by the # symbol. For each human and mouse transcript, the 3'UTR was unique, although murine transcripts contained a longer 3'UTR than previously reported, pointing to two polyadenylation signals. Notably, in the two species, the 5' UTRs showed an unexpected multiplicity of TSS that contributed to the combinatorial complexity of the mature transcripts. This heterogeneity called for a rational and comprehensive nomenclature of all *CERKL* variants in human and mouse. Therefore, sequences from published reports, databases, and this work were gathered and systematized. Our proposal is presented in Supplementary Tables S2A and S2B (<http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-DCSupplemental>).

In detail, the analysis of the 20 fully validated human transcripts provided solid evidence of four different *CERKL* TSS (Fig. 1A). Eleven transcripts were expressed from the previously reported 5' UTR; two from the starting site of the adjacent upstream *NEUROD1* gene (known to be highly expressed in the CNS and transcribed in the same direction than *CERKL*); six from an internal, previously unknown initiation site within exon 1 (referred to as exon 1b in the text and Supplementary material, <http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-DCSupplemental>); and one started from an internal sequence of exon 3 (referred to as exon 3a). Of note, the TSS of exon 1b was also supported in silico by the First-Exon-Finder, which, among other structural features, mapped a CpG island within this genomic region, and by the clustering of peaks of the H3K4Me3 track, indicative of transcriptionally active chromatin sites (Fig. 2). Yet we cannot rule out that *CERKL* is transcribed from unknown TSS in other tissues. In this context, the UCSC genome browser has recently incorporated an ENCODE track that corresponds to manually annotated genes, based primarily on sequenced full-length cDNAs from dbTSS plus reports from independent sources. Twelve of the 15 ENCODE *CERKL* variants fully overlapped with some retinal transcripts described in this work. Of the remaining three, one (OTTHUMT00000334820) started at a TSS extremely close to the reported *CERKL* 5' UTR and possibly was structurally equivalent; the other two (OTTHUMT00000334817 and OTTHUMT00000334818) started at completely different internal sites, suggesting two additional TSS. If the latter two isoforms were validated, the number of *CERKL* TSS in human would amount to six.

In contrast, in the murine retina, only three *Cerkl* start sites were experimentally identified (Fig. 1B, dark gray): 11 (of 23) fully validated transcripts started from the previously reported *Cerkl* site, 11 from the upstream *NeuroD1* gene (as in human), and the last from the novel exon 3a, located in intron 2. The latter is also supported by the dbTSS database. Moreover, RT-PCR assays performed in a panel of several tissues provided evidence for an additional TSS within intron 2, which generated exon 3b (not found in the retina). A complete list specifying the contribution (presence or absence) of every exon in each *CERKL/Cerkl* isoform is presented in Supplementary Table S3, <http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-DCSupplemental>.

To identify the more abundant transcripts and approach their relative physiological relevance (Figs. 3A [human] and 3B [mouse]), we used a battery of primers, located either at the different TSS or the alternative exons at the 5' of *CERKL*, paired with a unique reverse primer in exon 10 (human) or exon 12 (mouse). The location of the primers is indicated in Figure 3C. For isoform assignment, each amplified product was isolated and sequenced. The RT-PCRs were replicated several

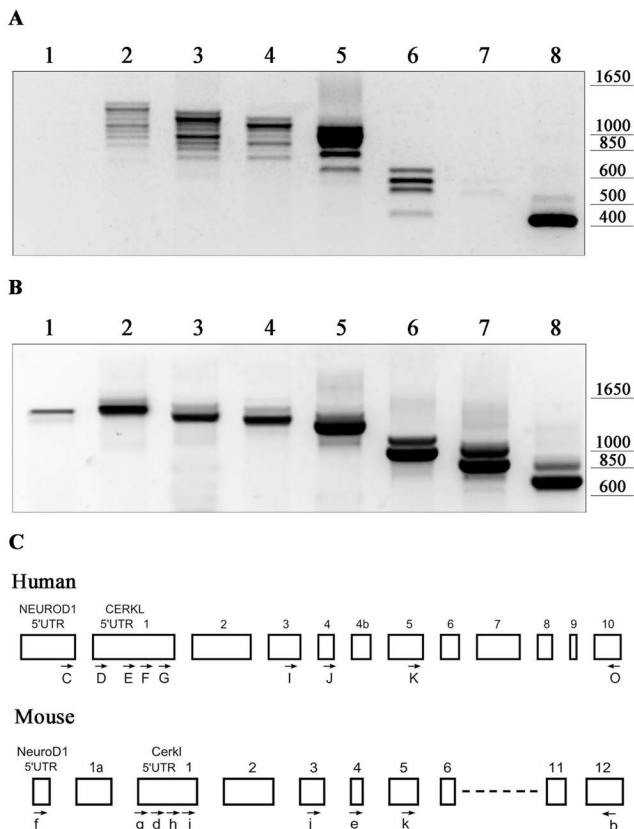


**FIGURE 2.** Summary of annotated and custom feature tracks on the UCSC genome browser. **(A)** An overall view of the whole genomic neighborhood of human *CERKL*, including upstream *NEUROD1* (*ITGA4* downstream gene is shown in Supplementary Fig. S1, <http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-DCSupplemental>). Homology to various species, including mouse, is depicted on the topmost tracks. Exonic structure of all the experimentally validated *CERKL* isoforms described in this article. FirstExonFinder predicted TSS; the ENCODE histone track H3K4Me3, a custom track of hits to different position weight matrices for known and predicted transcription factor binding sites, and some further evidence of transcriptional activity on neural tissues are shown. **(B, C)** Magnifications of the regions around exons 1 and 3, respectively, containing a more detailed view of the TFBS sites. The same track distribution is depicted on all three panels. Matrix hits overlapping homopolymer stretches larger than 5 bp were discarded.

times. The interspecific comparison of the more abundant transcripts in the retina revealed a higher number of *CERKL* variants in human (8 of 20 transcripts, with a comparable level of expression) than mouse (3 of 23 transcripts, with one major variant).

Concerning the *CERKL*/*Cerkl* protein isoforms, our data reveal that the combination of TSS multiplicity with the high number of alternative splicing events affecting the first exons (exons 1–6) generates a complex pattern of mature transcripts that differ at the 5' end but share the 3' moiety (exons 6–13), as shown in Figures 3A (human) and 3B (mouse). The alternative 5' exons encode the nuclear localization signals,<sup>18,38</sup> the

putative pleckstrin homology (PH) domain, and the diacylglycerol kinase (DAGK) signatures.<sup>17,18,38,39</sup> In addition, the human gene includes an in-frame species-specific alternative exon (4b) embedded in the predicted DAGK domain that interrupts the DAGK consensus signature. The comparison of human and mouse *CERKL* mature mRNAs showed that although the number of isoforms is similar, intron retention is more frequent in mouse than in human (Figs. 1A2, 1B2, isoforms m9, m10, m11). These transcripts bear premature stop codons and may be candidates to be degraded by the nonsense-mediated decay mechanisms (NMD) but, if translated, would encode a C-terminal-truncated protein.



**FIGURE 3.** Evaluation of *CERKL* main transcripts. RT-PCR from human (A) and mouse (B) retina total RNA, to identify the main isoforms. (C) Scheme depicting the structure of *CERKL* in human and mouse, with the location of the primers used to generate the PCR reactions. For the sake of clarity, exons not relevant to this assay are not shown. For all amplicons, the same reverse oligonucleotide (human: O; mouse: b) was used, paired with the corresponding forward primers. For human: lane 1, C; lane 2, D; lane 3, E; lane 4, F; lane 5, G; lane 6, I; lane 7, J; lane 8, K. For mouse: lane 1, f; lane 2, g; lane 3, d; lane 4, h; lane 5, I; lane 6, j; lane 7, e; lane 8, k. Primer sequences are provided in the Supplementary Table S1, <http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-DCSupplemental>.

### Evidence for *CERKL* Alternative Translational Initiation Sites

Interestingly, one of the consequences of the use of alternative TSS is that the previously reported initiation Met codon is not always included in the mature transcript. Then, additional translation initiation sites (TIS) should be considered. In silico sequence analyses using motif searches with a Kozak matrix predicted several TIS along the *CERKL* transcripts (Supplementary Table S5, <http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-DCSupplemental>). Of these, only two encoded long peptide sequences, whereas the remaining putative TIS yielded a lower score value or would generate very short peptides. Initiation codons with significant TIS scores are indicated in Figures 1A2 and 1B2. For each isoform, only the longest open-reading frame starting with a high-score Met is depicted (filled boxes).

As proof of principle, we tried to express three human highly expressed isoforms (h2, h13, and h18) harboring different in-frame methionines with a high Kozak score. The h2 encompassed the complete *CERKL* sequence, starting at the previously described 5'UTR, whereas the h13 and h18 cDNAs started at different TSS. The two latter did not con-

tain the first in-frame methionine in exon 1, but they both shared an in-frame Met residue at exon 5 having a high Kozak score. Of note, other out-of-frame methionines located upstream in exon 5 showed comparable Kozak values (Fig. 4A). For each construct the *CERKL* coding sequence was fused at the 3' end to an HA epitope to facilitate protein immunodetection. HEK293T cells were transfected with each construct, and RT-PCR was performed to assess the level of the recombinant *CERKL* transcription. Notably, we observed a high yield of the *CERKL* protein from 2 of 3 constructs (h2 and h18), each starting from the corresponding highlighted high Met score (Figs. 4B, 4C). Indeed, the size of the expressed *CERKL*-HA proteins was in agreement with their expected molecular mass (60 and 32 kDa).

### Exploring the Promoter Landscape of *CERKL* TSS

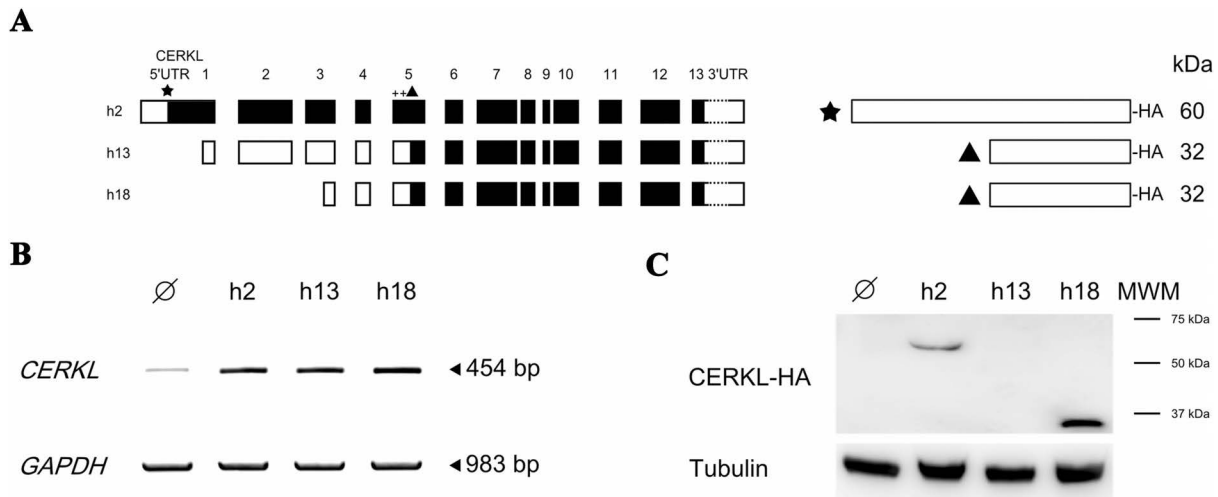
To shed light on the architecture of the *CERKL* promoters and to define in silico potential novel alternative TSS, we aimed to map conserved transcription factor binding sites (TFBS) on the 1-kb upstream region of every human *CERKL* exon. To this end, we used position weight matrices from reported general transcription initiation motifs, retina-related transcription factors, and matrices obtained by MEME after analysis of the 49 promoters of RP genes to underscore conserved retina-specific regulatory motifs (subfunctionalized MEMEs) (for a detailed description of these analyses, see Materials and Methods). The outcome of this search along the upstream sequences of every exon depicted three different scenarios that corresponded to the patterns yielded by exons with a TSS function in retina (NeuroD1, 5'*CERKL* UTR, 1b, and 3a), exons with TSS not found in the retina (corresponding to the starting exons in the ENCODE transcripts OTTHUMT00000334817 and OTTHUMT00000334818), and the remaining internal exons, which are not used as TSS (Table 1).

Notably, a more focused analysis of the target sites of retina-specific transcription factors revealed several hits that are worth mentioning: a high-scoring hit for PAX6, right upstream exon 3, and some significant hits for CRX upstream *NEUROD1*. However, no hits within the 1-kb upstream region of each exon were found for NR2E3 or V-MAF (used to detect NRL-binding sites), although some were scattered along the *CERKL* genomic region. Overall, the evidence points to distinct promoter architecture concerning TSS, probably reflecting tissue-specific expression. Supplementary Tables S4A and S4B (<http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-DCSupplemental>) show the detailed list of TFBS, MEME, and subfunctionalized MEME hits upstream of each exon.

Given that *CERKL* mutations also contribute to CRD, we extended the analysis to the promoters (1 kb upstream) of the CRD genes using the TRANSFAC matrices, with particular emphasis on the retina-related transcription factor. The genes were grouped according to the disease to which they contributed most: RP (already listed), CRD, and a group of genes involved in both retinal disorders. Unfortunately, no clear pattern of single/clustered—general or retina-specific—transcription factor sites emerged in any of the three gene groups (Supplementary Fig. S2, <http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-DCSupplemental>).

### Genomic Conservation of the *CERKL* Region among Vertebrates

VISTA tracks on Figure 2 clearly outline evolutionary conservation of the *CERKL* syntenic regions among vertebrates (human, *Homo sapiens*; rhesus chimp, *Macaca mulatta*; mouse, *Mus musculus*; chicken, *Gallus gallus*; and fugu, *Takifugu rubripes*). The degree of sequence conservation is high, close to 100% between human and rhesus. Among



**FIGURE 4.** Evidence for additional initiating methionines in alternatively spliced human *CERKL* isoforms. **(A)** Diagram of the three different HA-tagged constructs from isoforms h2, h8, and h13, as well as the structure and molecular mass of the predicted encoded proteins. Methionines showing high Kozak scores are indicated by an *asterisk* (methionine in exon 1) and a *filled triangle* (internal methionine in exon 5), whereas other out-of-frame significantly scored Met are marked with a *cross*. *Filled boxes*: putative CDS. **(B)** RT-PCR showing expression of the *CERKL* constructs in transfected HEK293T cells. Lower endogenous *CERKL* levels were also detected in nontransfected cells ( $\emptyset$ ). *GAPDH* gene was used for normalization. **(C)** *CERKL*-HA-fused proteins were immunodetected with an anti-HA monoclonal antibody.  $\alpha$ -Tubulin was used as a loading control.

tetrapods, the average degree of conservation is above 70% for all exons but drops significantly in introns and intergenic regions. However, exon 4b could be an innovation in the ape lineage leading to humans because it is unique to the human genome. The comparison with *fugu* reveals an expected lower degree of conservation because only *NEUROD1* exons rank above 70% whereas most *CERKL* exons (2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, and 12) and *ITGA4* exons (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 19, 20, and 21) range between 50% and 70% similarity. Surprisingly, the *CERKL* exon 1 was among the least conserved. These results agreed with those obtained from bl2seq comparisons between human and mouse syntenic regions both at the nucleotide (BLASTN) and the translated (TBLASTX) levels. Thus far, no evidence supporting additional exons for *CERKL* apart from those described in this work could be obtained.

### **CERKL Expression in a Collection of Human and Mouse Tissues**

Semiquantitative RT-PCR analysis of *CERKL* expression was performed in a collection of tissues and cell lines of human and mouse, with a pair of primers located in the exons shared by all isoforms (forward in exon 9 and reverse in exon 13 in human; exon 12 in mouse; see Figs. 1A2 and 1B2 for locations; details are given in Materials and Methods). The results are shown in Figures 5A and 5C (human) and 5B and 5D (mouse). At least three independent replicates were performed and quantified for each tissue. *GAPDH* expression was used for normalization.

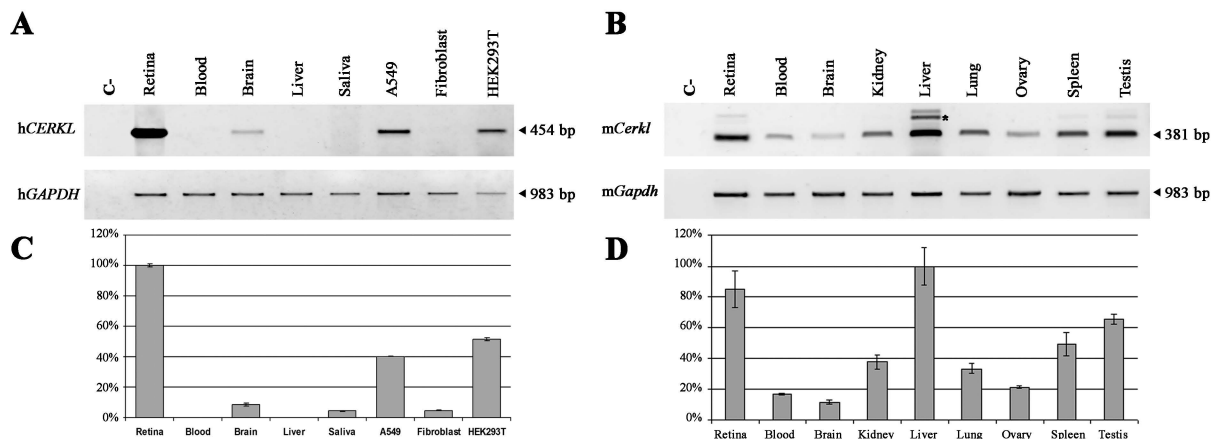
In humans, the retina was by far the tissue in which *CERKL* expression was the highest. In fact, among the other tissues, only the brain showed some detectable expression (at levels below 10% of those in retina). Sequence analysis of the brain transcript revealed that gene expression was driven by the *NEUROD1* TSS (data not shown). Of interest for future functional studies, some human cell lines showed detectable levels of *CERKL* transcription, as is the case with HEK293T and A549 (Fig. 5C).

In mouse, *Cerkl* was also highly expressed in the retina, although the liver showed even slightly higher levels of expression (Fig. 5D). Sequence analysis of the murine liver isoform (marked with an asterisk) showed that it corresponded to m30in variant. This isoform would generate a prematurely truncated protein because it retained a noncoding fragment of intron 11. Other mouse tissues, such as testis and spleen, also showed high to moderate levels of *Cerkl* expression.

As mentioned, in addition to the reported mouse *Cerkl* promoter (heretofore, UTR), retinal transcripts were produced from the *NeuroD1* promoter and an internal TSS in intron 2 (named 3a). Direct sequencing of RT-PCRs from other tissues led us to identify another TSS, 3b, also within intron 2. We performed RT-PCR assays to assess the relative contribution of these TSS in the retina: UTR, *NeuroD1*, 3a and 3b to *Cerkl* expression (Fig. 6). Tissular comparison showed a wide range of expression from each TSS: the *Cerkl* UTR contribution was indeed major in the retina, moderate in the kidney, faint in the brain, and undetectable in the blood and spleen. In addition, in

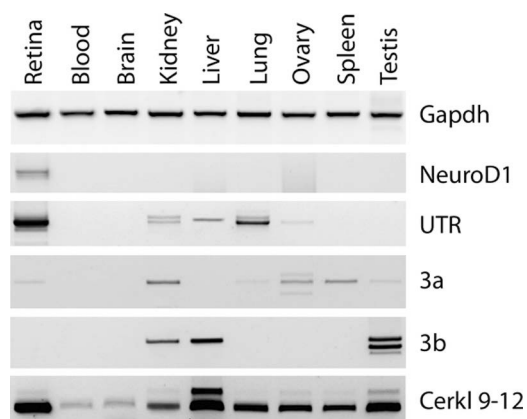
**TABLE 1.** Distribution of Motifs among 1 kbp Upstream of Every *CERKL* Exon Showed a Differential Pattern, Depending on the Kind of Exon

Scenario	Transfac Motifs	MEME Motifs	Subfunctionalized MEME Motifs	TSS Type
1	>40	0	<5	Retinal TSS ( <i>NEUROD1</i> , 1/1a, 1b, and 3a)
2	<35	≈10	>75	Nonretinal TSS (OTTHUMT00000334817 first exon and OTTHUMT00000334818 first exon)
3	≈25	0	<5	No TSS exons



**FIGURE 5.** *CERKL* semiquantitative expression analysis in human and mouse tissues. *CERKL* expression identified by RT-PCR in several tissues and cell lines of human (A) and mouse (B) origin. Semiquantitative analysis of all *CERKL* transcripts in human (C) and mouse (D). At least three replicates were performed. *GAPDH* expression was used for normalization. Maximum *CERKL* levels were arbitrarily set as 100% (retina in human, liver in mouse). *CERKL* was amplified using primers A and B in human and primers a and b in mouse, as located in Figures 1A2 and 1B2. The amplicon size is indicated in each case. The asterisk in the murine liver sample corresponds to the alternative isoform m30in. Primer sequences are provided in Supplementary Table S1, <http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-DCSupplemental>. Notably, the primers used for the amplification of *CERKL* transcript were located in the common region at 3' of the gene; therefore, the bands observed are the result of the transcripts produced from all TSS in each tissue.

agreement with previous reports, *NeuroD1*-driven expression was tissue restricted and was observed only in the retina in our panel. In contrast, the 3a TSS-driven transcript was expressed more widely but showed very low levels in the retina. Although the 3b TSS was silent in the mouse retina, it was the most active in the liver (Fig. 6). Isoforms m24 to m28 in Figure 1B, which started at either 3a or 3b TSS, were isolated and sequenced in the spleen and liver but were undetectable in the retina. Of note, in some tissues, the RT-PCRs specific for these four promoters did not explain the total *Cerkl* transcriptional levels (as revealed by the amplification of the 9 to 12 exon region common to all isoforms), again pointing to additional TSS.



**FIGURE 6.** Tissue-specific *Cerkl* promoter in adult mice. RT-PCRs were performed on several murine samples to determine the active promoters in each tissue. Forty-five cycle amplifications were carried out using the same reverse oligonucleotide in exon 12 and different forward primers located in each TSS identified (*NeuroD1* UTR, *Cerkl* UTR, 3a, and 3b) as well as exon 9 to amplify the common region. *Gapdh* was used to normalize between samples. Primer location is depicted in Figure 1B, and sequences are listed in Supplementary Table S1, <http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-DCSupplemental>.

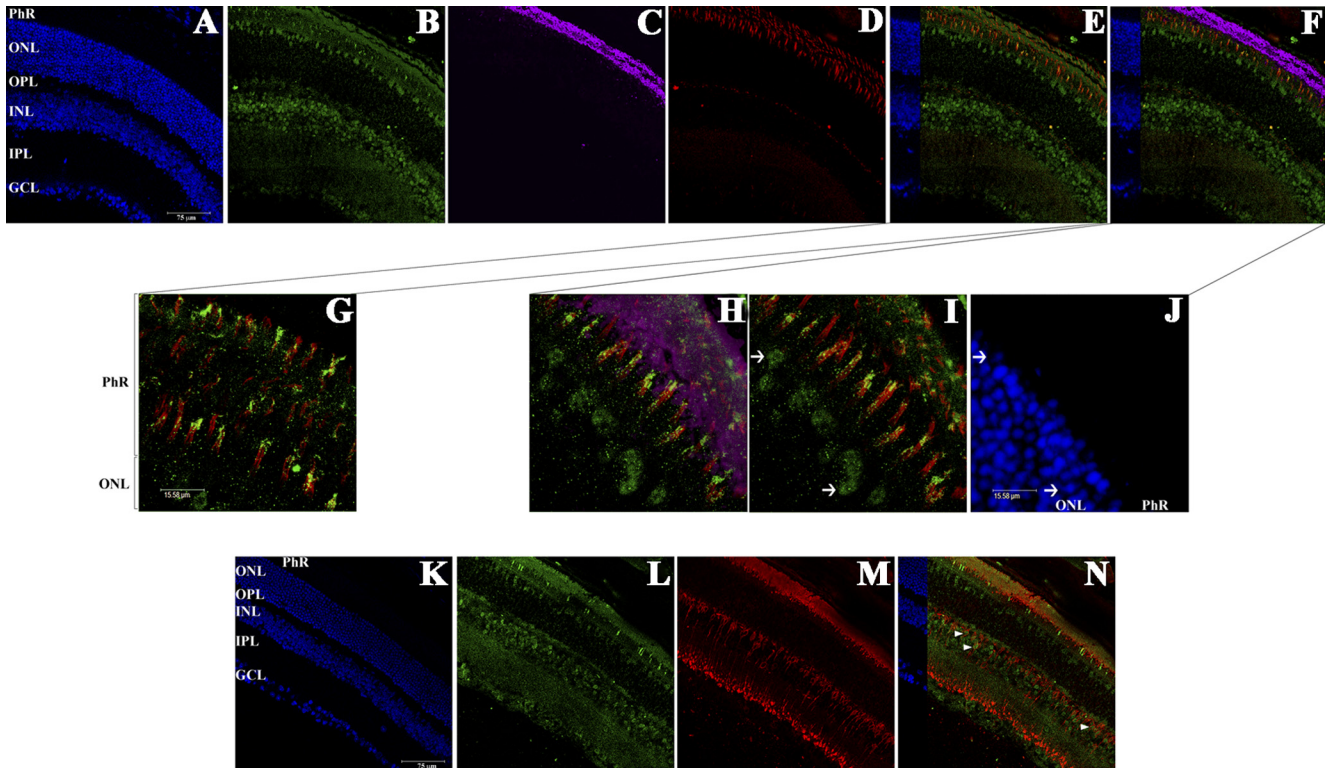
### Cerkl Localization in Mouse Retina by Immunohistochemistry

Previous results based on in situ mRNA hybridization showed that *Cerkl* was expressed mainly in the ganglion cell layer, though a fainter level of expression was detected in other retinal layers, including photoreceptors.<sup>17</sup> To accurately assess the localization of the *Cerkl* protein in the retina, fluorescent immunohistochemistry using different cell-specific antibodies and markers was performed on serial sagittal cryosections of adult mouse retinas (2 months old). An in-house rabbit polyclonal anti-*Cerkl* antibody raised against an exon 2 peptide sequence was affinity purified and preabsorbed before use. Double coimmunodetection with this polyclonal anti-*Cerkl* antibody and either anti-rhodopsin (specific for rods) or anti-PKC $\alpha$  (which primarily labels bipolar cells and rods), plus counterstaining with DAPI (nuclei) and Alexa Fluor 647-conjugated PNA (which labels cones) were performed in parallel to allow a more detailed localization (Fig. 7).

*Cerkl* expression was found at the ganglion cell layer (GCL), in the photoreceptors (PhR), and in some cell bodies at the outer nuclear layer (ONL) and inner nuclear layer (INL) (Fig. 7). Magnification of the photoreceptor cell layer showed a strong immunodetection of *Cerkl* in cones and, faintly, in rods. Of interest, *Cerkl* localized primarily in the outer segments of both types of photoreceptors, as shown by its colocalization with rhodopsin (rods) and cone (Figs. 7H, 7I) staining. In addition, *Cerkl* showed perinuclear staining in some cell bodies at the ONL, extremely close to the photoreceptor layers, probably corresponding to cones (Figs. 7I, 7J, white arrows). Concerning other neuronal retinal types, *Cerkl* was detected in a population of bipolar cells (white arrowheads in Fig. 7N) as well as in other cell types at the INL, as yet undetermined.

### DISCUSSION

One of the major breakthroughs from interspecific sequence comparisons of whole genomes is that the complexity of a particular organism depends not only on the number of genes but also on the diversity of the proteins produced and the regulation of transcription. An increasing amount of evidence

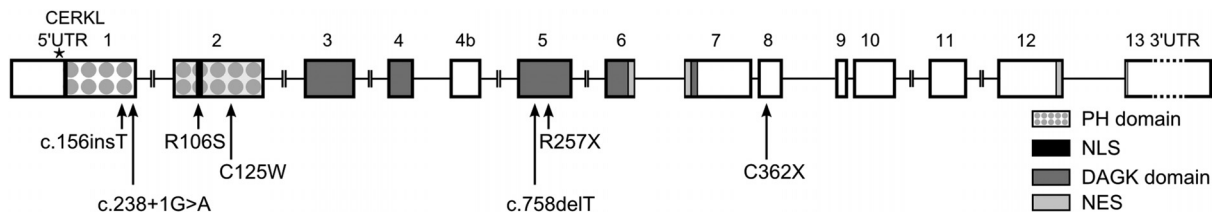


**FIGURE 7.** Immunohistochemistry on mouse retina cryosections. (A–J) Localization of Cerkl in photoreceptor cells. Nuclei are stained with DAPI (blue, A); Cerkl (B) and Rhodopsin (C) proteins are detected in green and magenta, respectively; cones appear in red (D) using PNA staining. Two merged images (E, F) and the magnification of some sections show clear localization of Cerkl in cones (yellow, G) and, more faintly, in rods, colocalizing with rhodopsin (H). Although Cerkl localizes mainly in the outer segments, some perinuclear staining could be also observed in the nuclei of the cones at the ONL, indicated by white arrows (I, J). (J) DAPI counterstaining of the nuclei. (K–N) Expression of Cerkl in other retinal layers. Nuclei are stained with DAPI (blue, K), Cerkl protein is detected in green (L), bipolar cells and rods expressing PKCa are labeled in red (M). Cerkl is expressed in the ganglion cells (GCL), some cells in the INL and ONL, and in the photoreceptors. The merged image (N) shows expression of Cerkl in some bipolar cells (white arrowheads) while confirming localization in rods. Scale bars show magnifications.

in the human genome supports that alternative splicing is more the rule than the exception because >95% of the multiexon genes undergo alternative splicing events, often related to developmental or tissue differentiation processes and differential physiological functions. Many bioinformatic efforts are now being devoted to decipher “the splicing code,” which is intended to characterize the regulatory splicing strategies on a genome-wide scale to predict the specific transcripts from every gene.<sup>40,41</sup> However, these in silico predictions must be substantiated in vivo to identify the physiologically relevant isoforms, their regulation, and eventually their contribution to disease. Within this framework, we have combined both in vivo and in silico approaches to analyze the expression of *CERKL*, a retinitis pigmentosa gene of an as yet unknown function. Our data show unexpectedly high transcriptional complexity in human and mouse tissues arising from the combination of tissue-specific promoters and alternative splicing

events, particularly in the retina. A large multiplicity of retina transcripts has also been reported for other genes, such as *RPGR*, *RPGRIP1*, and *CPEB3*<sup>42–44</sup>. In agreement with these results, a recent accurate transcriptional characterization focused on the PRPF gene family (proteins associated with spliceosome formation and responsible for retinal dystrophies) showed that the processed pre-mRNA levels were highest in the retina than in other tissues and organs. Their results pointed to a particularly increased splicing activity at the base of the high multiplicity of retinal transcripts and called for sophisticated quality control mechanisms.<sup>45</sup>

This high repertoire of *CERKL* transcript and protein isoforms suggests distinct roles for the alternatively displayed domains. The first two exons of *CERKL* encode a PH domain and two nuclear localization signals, whereas exons 3 to 7 encompass the DAGK domain<sup>17–19,38,39</sup> (Fig. 8). Notably, the use of the different promoters and 5'UTRs affects the inclu-



**FIGURE 8.** Scheme of the reported causative mutations on the *CERKL* gene. The location of the mutations identified thus far is shown on a diagram of the *CERKL* protein. The *CERKL* domains described by either sequence homology (PH, pleckstrin; DAGK, diacylglycerol kinase domain) or functional analysis (NLS, nuclear localization signals; NES, nuclear export signals) are also depicted.

sion/exclusion of the first exons in the final transcript and generates variability at the N-terminal peptide moiety, with a potential impact in the protein function, which supports a finely tuned regulation of the 5' splicing events. In contrast, the exons encoding the C-terminal domains are maintained in all isoforms, even in the transcripts from nonretinal tissues, arguing in favor of a basic function.

The comparison between human and mouse retina major *CERKL* isoforms reveals higher complexity for the human transcripts. In fact, the most abundant isoforms are species-specific (except for h2 and m1, which are structurally equivalent). For example, the *NeuroD1* promoter contributes to the highly expressed isoforms in mouse, whereas its relevance in the human adult retina appears to be minor. This holds true for the least abundant isoforms (e.g., h1, h12, h15-h17 and m5, m7, m8, m10, m11, m13) (Fig. 1A2, 1B2). Interspecific differences in the levels of expression and identification of species-specific isoforms have also been reported for other visual disorder genes, such as *IMPDH1*, *OPAI1*, and *PRPF31*, suggesting distinct functional requirements for each species.<sup>46-48</sup> Remarkably, one-third of the murine isoforms (12 of 32) compared with 1 of 21 human isoforms are produced by missplicing (with partial retention of intron sequences). Most of these misspliced transcripts would encode a truncated protein, unless degraded by NMD. Other reports analyzing human versus murine transcripts identified other retinal dystrophy genes with preferential or unique intron retention in the mouse, among them *RPGR* (intron 14),<sup>49</sup> *RPGRIP1* (intron 13),<sup>42</sup> and *PRPF31* (intron 7).<sup>48</sup> If extended to other genes, these results would argue in favor of either a more precise splicing machinery or a less permissive mRNA integrity control, in human, at least in retina; even though it has been shown that relevant splicing events associated with NMD remain conserved through mammalian genomes, reflecting a common clearance mechanism of transcripts that might compromise cell viability.<sup>50</sup>

One of the relevant findings of our work is the use of tissue-specific TSS in mouse. Among the tissues analyzed, the *NeuroD1* promoter was only active in the retina, where the reported *Cerkl* UTR promoter also showed the highest transcriptional activity. Instead, the additional alternative internal promoters were highly expressed in nonneuronal tissues (Fig. 6, liver, testis, kidney). The combination of different promoters and shared splicing events in both species hindered isoform quantification by real-time RT-PCR (which relies on small probes) to evaluate their contribution to the *CERKL* transcript population. Thus, a relative quantification by specific amplification of each isoform was performed (Figs. 3, 5, 6). Of note, the retina is the tissue in which higher expression and greater display of *CERKL* transcript variability is observed. In addition to the multiplicity of promoters and alternative splicing events, another layer of complexity is provided by other in-frame methionines, which direct the synthesis of shortened *CERKL* protein isoforms, with a downstream start in exon 5. In vitro experimental evidence strongly supports this starting Met in the h18 isoform, though no expression could be detected for the h13 variant. Whether this apparent discrepancy could be explained by other upstream out-of-frame methionines in h13 (not present on the h18 alternative 5'UTR exons) that affect the translational initiation complex formation remains to be elucidated (Fig. 4). Although the *CERKL* function is as yet undetermined, such a high repertoire of transcripts and proteins, while making functional assignment a real challenge, hints at a very crucial role in retinal cell survival. Indeed, in a more general view, these results open new scenarios for the human proteome complexity associated with a multiplicity of isoforms.

The in silico analysis of binding sites for transcription initiation factors across the *CERKL* genomic neighborhood (approximately 230 kbp) revealed a high number of hits (>15,000). However, they were not randomly distributed but were clustered just upstream of *ITGA4*, *NEUROD1*, and *CERKL* canonical TSS. If we focus on the retina-specific TFBS, no significant scores for OTX2 or NR2E3 could be found upstream of the promoters of these genes. In contrast, binding sites for CRX, PAX6, and NRL upstream of *NEUROD1* TSS, for NRL in *CERKL* exon 1b, and for PAX6 and CRX upstream of exon 3 TSS were identified. These results provide evidence for retina-specific regulatory enhancers close to *CERKL*. Overall, the differential patterns observed for the in silico predicted enhancers, the TSS experimentally confirmed in the retina, and the identification of nonretinal transcriptional products clearly support a highly tuned, tissue-specific regulation of *CERKL* expression.

Notably, *Cerkl* immunohistochemistry showed high expression in cones and moderate expression in rods, ganglion cells, and other retinal INL cell types. A specific perinuclear staining was observed at the INL and ONL. Hitherto, *CERKL* mutations have been associated with both conventional RP and CRD. Regarding this clinical heterogeneity, our findings of expression in cones and rods are consistent with the two clinical entities but also highlight the need to establish a more accurate scenario. Therefore, full characterization of the transcriptional map of isoforms, the type and location of the mutations, the accurate subcellular localization of proteins, and the action of modifier genes is required to comprehend the contribution of *CERKL*/*CERKL* variants to retinal degeneration disorders.

To establish a more precise relationship between mutations and the relative pathogenicity of each isoform, the distribution of SNPs along the coding gene structure was analyzed in silico. A priori, a homogeneous distribution of both mutations and SNPs should be expected when all the exons and encoded domains contribute equally to function. The results of this analysis showed that not all the domains harbored the same frequency of SNPs because some showed higher SNP frequencies than the observed average, whereas others were devoid of polymorphic variants, thus suggesting differential selection pressures (Supplementary Fig. S3, <http://www.iovs.org/lookup/suppl/doi:10.1167/iovs.10-7101/-/DCSupplemental>). For instance, the alternately spliced exons that encompassed the DAGK domain contained fewer SNPs, whereas the exons that encoded the pleckstrin homology domain showed more SNPs than average. The biological meaning of this differential distribution remains to be assessed.

Meanwhile, as more mutations are being identified, a genotype-phenotype correlation pattern is emerging (Fig. 8, Table 2). The first pathogenic variant described, p.R257X—a nonsense homozygous mutation in exon 5—generates a truncated protein that abrogates the putative DAGK domain. Interestingly, only 1 of the 8 major isoforms remains unaffected after alternative splicing. The phenotype associated with this variant ranges from canonical RP to more severe CRD features.<sup>53</sup> Another RP-associated mutation, p.R106S, is localized in 1 of the 2 putative nuclear localization signals, probably compromising its import and function in the nucleus.<sup>55</sup> However, all other protein domains remain unaltered, in accordance with a moderate RP phenotype. Other alleles are associated with more severe retinal disorders, with clear cone-rod dystrophy features and early macular degeneration. One of them, c.238+1G>A,<sup>37</sup> affects the splicing of the first intron, abrogating the generation of the putative protein isoforms produced from exon 1 and 1b. Thus, only the isoforms starting in exon 3 or the spliced variants of exon 1a would be produced. The other mutation, p.C125W<sup>54</sup> (also affecting the conformation of the protein isoforms encoded from the methi-

TABLE 2. Genotype-Phenotype Correlations of Reported *CERKL* Mutations

Mutation*/Exon	Protein Domain/Molecular Effect	Allelic Status	Major Affected Isoforms (Fig. 1A)	Phenotype†	Allele Frequency among CERKL Reported Mutations n (%)	References
p. R257X/exon 5	Lipid kinase/protein truncated	Homozygous and compound heterozygous	7 of 8 (h2, h3, h7, h8, h13, h14, h18)	RP, with some patients showing phenotypes closer to CRD; peripheral pigment deposits plus macular dystrophy	30/40 alleles (20 families or patients) (~75%)	Tuson et al., <sup>17</sup> Pomares et al., <sup>51</sup> Avila-Fernandez et al., <sup>52</sup> Aleman et al., <sup>53</sup> Littink et al. <sup>54</sup> ‡
c.238+1G>A/intron 1	Pleckstrin homology/abrogates splicing	Homozygous	5 of 8 (h2, h3, h5, h13, h14)	Mixed features of RP and CRD, with early macular degeneration	2/40 alleles (~5%)	Auslender et al. <sup>37</sup>
p.R106S/exon 2	Nuclear localization signal/compromises nuclear import	Homozygous	3 of 8 (h2, h3, h5)	RP features (bone-spicules) with CRD leading to peripheral and central vision deficit	2/40 (~5%)	Ali et al. <sup>55</sup>
c.156_157ins/exon 1	Pleckstrin homology/frameshift and protein truncation	Compound heterozygous with C.758delt	3 of 8 (h2, h3, h5)	NC	1/40 (~2.5%)	Tang et al., <sup>56</sup>
c.758delt/exon 5	Lipid kinase/frameshift and protein truncation	Compound heterozygous with C.156_157/ins	7 of 8 (h2, h3, h7, h8, h13, h14, h18)	NC	1/40 (~2.5%)	Tang et al., <sup>56</sup>
p.C362X/exon 8	Unknown function/protein truncated	Compound heterozygous with P.r257x	All isoforms (h2, h3, h5, h7, h8, h13, h14, h18)	NC	1/40 (~2.5%)	Aleman et al. <sup>53</sup>
p.C125W/exon 2	Pleckstrin homology/evolutionarily conserved residue	Homozygous	3 of 8 (h2, h3, h5)	CRD (with central scotoma and macular atrophy, retinal thinning)	2/40 (~5%)	Littink et al., <sup>54</sup>

\* The isoform cDNA used for reference is NM\_201548.4, corresponding to isoform h2 (Fig. 1A). NC, not considered due to heterozygosity.

† Only the phenotype for homozygous allelic combination is considered of value in genotype-phenotype correlations. NC, not considered.

‡ The reported mutation p.R283X, considered as novel in this study, corresponds to the already reported p.R257X variant (this difference is due to the isoform cDNA taken as reference—NM\_001030311.2 and NM\_201548.4, respectively).

online in exon 1), changes an evolutionarily conserved cysteine residue of the pleckstrin domain. Three other clearly pathogenic alleles, two frameshifts (by indels) and a nonsense mutation, have also been reported, but their association with particular features is hindered by their compound heterozygous status. Indeed, this is an ongoing task.

Our comprehensive approach, by characterizing a high number of isoforms expressed in a single tissue, provides an exhaustive transcriptional picture on a hitherto fragmentary collection of data and builds a reference framework to assess the severity of new mutations. Considering the high number of *CERKL* isoforms, undertaking accurate analysis for localization or functional specificity, or both, at the subcellular level remains a key challenge to understand the contribution of this gene to retinal degeneration.

### Acknowledgments

The authors thank Andrés Mayor (Fundaluce, Hospital Central de Asturias) for the generous support; Ana Méndez-Zunzunégui (IDIBELL, Universitat de Barcelona) for generous support and technical advice on the use of eye cryosections; and the ENCODE project for making publicly available, through the UCSC Genome browser, the H3K4Me3 and the GENCODE manual gene annotations (including VEGA) tracks.

### References

- Sultan M, Schulz MH, Richard H, et al. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science*. 2008;321:956-960.
- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet*. 2008;40:1413-1415.
- Nilsen TW, Graveley BR. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*. 463:457-463.
- Licalosi DD, Darnell RB. RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. *Nat Rev Genet*. 2010;11:75-87.
- McGlinchy NJ, Smith CW. Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense? *Trends Biochem Sci*. 2008;33:385-393.
- Tazi J, Bakkour N, Stamm S. Alternative splicing and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792:14-26.
- Raponi M, Baralle D. Alternative splicing: good and bad effects of translationally silent substitutions. *FEBS J*. 2010;277:836-840.
- Ward AJ, Cooper TA. The pathobiology of splicing. *J Pathol*. 2010;220:152-163.
- Xu X, Liu Y, Weiss S, Arnold E, Sarafianos SG, Ding J. Molecular model of SARS coronavirus polymerase: implications for biochemical functions and drug design. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:7117-7130.
- McCullough RM, Cantor CR, Ding C. High-throughput alternative splicing quantification by primer extension and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:e99.
- Licalosi DD, Darnell RB. Splicing regulation in neurologic disease. *Neuron*. 2006;52:93-101.
- Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet*. 2006;368:1795-1809.
- Beit-Ya'acov A, Mizrahi-Meissonnier L, Obolensky A, et al. Homozygosity for a novel ABCA4 founder splicing mutation is associated with progressive and severe Stargardt-like disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:4308-4314.
- Schmid F, Glaus E, Cremers FP, Kloeckener-Gruissem B, Berger W, Neidhardt J. Mutation- and tissue-specific alterations of RPGR transcripts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:1628-1635.
- Riazuddin SA, Iqbal M, Wang Y, et al. A splice-site mutation in a retina-specific exon of BBS8 causes nonsyndromic retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet*. 2010;86:805-812.
- Wang Y, Juranek S, Li H, Sheng G, Tuschl T, Patel DJ. Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature*. 2008;456:921-926.
- Tuson M, Marfany G, Gonzalez-Duarte R. Mutation of *CERKL*, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26). *Am J Hum Genet*. 2004;74:128-138.
- Bornancin F, Mechtcheriakova D, Stora S, et al. Characterization of a ceramide kinase-like protein. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1687:31-43.
- Tuson M, Garanto A, Gonzalez-Duarte R, Marfany G. Overexpression of *CERKL*, a gene responsible for retinitis pigmentosa in humans, protects cells from apoptosis induced by oxidative stress. *Mol Vis*. 2009;15:168-180.
- Mendez A, Lem J, Simon M, Chen J. Light-dependent translocation of arrestin in the absence of rhodopsin phosphorylation and transducin signaling. *J Neurosci*. 2003;23:3124-3129.
- Rhead B, Karolchik D, Kuhn RM, et al. The UCSC Genome Browser database: update. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:D613-D619.
- Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, Rubin EM, Dubchak I. VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:W273-W279.
- Tatusova TA, Madden TL. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett*. 1999;174:247-250.
- Pruitt KD, Tatusova T, Klimke W, Maglott DR. NCBI Reference Sequences: current status, policy and new initiatives. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:D32-D36.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. *GenBank Nucleic Acids Res*. 2009;37:D26-D31.
- Wakaguri H, Yamashita R, Suzuki Y, Sugano S, Nakai K. DBTSS: database of transcription start sites, progress report 2008. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:D97-D101.
- Harrow J, Denoeud F, Frankish A, et al. GENCODE: producing a reference annotation for ENCODE. *Genome Biol*. 2006;7(suppl 1):S41-S49.
- Slater GS, Birney E. Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics*. 2005;6:31.
- Davuluri RV, Grosse I, Zhang MQ. Computational identification of promoters and first exons in the human genome. *Nat Genet*. 2001;29:412-417.
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:W202-W208.
- Matys V, Fricke E, Geffers R, et al. TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:374-378.
- Messeguer X, Escudero R, Farre D, Nunez O, Martinez J, Alba MM. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics*. 2002;18:333-334.
- Portales-Casamar E, Thongjuea S, Kwon AT, et al. JASPAR: the greatly expanded open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:D105-D110.
- Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res*. 1987;15:8125-8148.
- Celniker SE, Dillon LA, Gerstein MB, et al. Unlocking the secrets of the genome. *Nature*. 2009;459:927-930.
- Ruthenburg AJ, Allis CD, Wysocka J. Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell*. 2007;25:15-30.
- Auslender N, Sharon D, Abbasi AH, Garzoni HJ, Banin E, Ben-Yosef T. A common founder mutation of *CERKL* underlies autosomal recessive retinal degeneration with early macular involvement among Yemenite Jews. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:5431-5438.
- Inagaki Y, Mitsutake S, Igarashi Y. Identification of a nuclear localization signal in the retinitis pigmentosa-mutated RP26 protein, ceramide kinase-like protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343:982-987.
- Rovina P, Schanzer A, Graf C, Mechtcheriakova D, Jaritz M, Bornancin F. Subcellular localization of ceramide kinase and ceramide kinase-like protein requires interplay of their pleckstrin homology domain-containing N-terminal regions together with C-terminal domains. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791:1023-1030.
- Barash Y, Calarco JA, Gao W, et al. Deciphering the splicing code. *Nature*. 2010;465:53-59.
- Tejedor JR, Valcarcel J. Gene regulation: Breaking the second genetic code. *Nature*. 2010;465:45-46.

42. Lu X, Ferreira PA. Identification of novel murine- and human-specific RPGRIP1 splice variants with distinct expression profiles and subcellular localization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:1882-1890.
43. Neidhardt J, Glaus E, Barthelmes D, Zeitz C, Fleischhauer J, Berger W. Identification and characterization of a novel RPGR isoform in human retina. *Hum Mutat.* 2007;28:797-807.
44. Wang XP, Cooper NG. Characterization of the transcripts and protein isoforms for cytoplasmic polyadenylation element binding protein-3 (CPEB3) in the mouse retina. *BMC Mol Biol.* 2009;10:109.
45. Tanackovic G, Ransijn A, Thibault P, et al. PRPF mutations are associated with generalized defects in spliceosome formation and pre-mRNA splicing in patients with retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet.* 2011;20:2116-2130.
46. Spellacy CJ, Daiger SP, Sullivan LS, et al. Characterization of retinal inosine monophosphate dehydrogenase 1 in several mammalian species. *Mol Vis.* 2007;13:1866-1872.
47. Akepati VR, Muller EC, Otto A, Strauss HM, Portwich M, Alexander C. Characterization of OPA1 isoforms isolated from mouse tissues. *J Neurochem.* 2008;106:372-383.
48. Tanackovic G, Rivolta C. PRPF31 alternative splicing and expression in human retina. *Ophthalmic Genet.* 2009;30:76-83.
49. Kirschner R, Rosenberg T, Schultz-Heienbrok R, et al. RPGR transcription studies in mouse and human tissues reveal a retina-specific isoform that is disrupted in a patient with X-linked retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet.* 1999;8:1571-1578.
50. de Lima Morais DA, Harrison PM. Large-scale evidence for conservation of NMD candidature across mammals. *PLoS One.* 5:e11695.
51. Pomares E, Marfany G, Brión MJ, et al. Novel high-throughput SNP genotyping cosegregation analysis for genetic diagnosis of autosomal recessive retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. *Hum Mutat.* 2007;28:511-516.
52. Avila-Fernandez A, Riveiro-Alvarez R, Vallespin E, et al. CERKL mutations and associated phenotypes in seven Spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:2709-2713.
53. Aleman TS, Soumitra N, Cideciyan AV, et al. CERKL mutations cause an autosomal recessive cone-rod dystrophy with inner retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:5944-5954.
54. Littink KW, Koenekoop RK, van den Born LI, et al. Homozygosity mapping in patients with cone-rod dystrophy: novel mutations and clinical characterizations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:5943-5951.
55. Ali M, Ramprasad VL, Soumitra N, et al. A missense mutation in the nuclear localization signal sequence of CERKL (p.R106S) causes autosomal recessive retinal degeneration. *Mol Vis.* 2008;14:1960-1964.
56. Tang Z, Wang Z, Wang Z, et al. Novel compound heterozygous mutations in CERKL cause autosomal recessive retinitis pigmentosa in a nonconsanguineous Chinese family. *Arch Ophthalmol.* 2009;127:1077-1078.



*Supplementary Material for the article:*

## **High transcriptional complexity of the retinitis pigmentosa *CERKL* gene in human and mouse**

Alejandro Garanto, Marina Riera, Esther Pomares, Jon Permanyer, Marta de Castro-Miró, Florentina Sava, Josep F Abril, Gemma Marfany and Roser González-Duarte

Supplementary Table S1

Supplementary Table S2

Supplementary Table S3

Supplementary Table S4 ([www.iovs.org/content/52/8/5202/suppl/DCSupplemental](http://www.iovs.org/content/52/8/5202/suppl/DCSupplemental))

Supplementary Table S5 ([www.iovs.org/content/52/8/5202/suppl/DCSupplemental](http://www.iovs.org/content/52/8/5202/suppl/DCSupplemental))

Supplementary Figure S1 ([www.iovs.org/content/52/8/5202/suppl/DCSupplemental](http://www.iovs.org/content/52/8/5202/suppl/DCSupplemental))

Supplementary Figure S2

Supplementary Figure S3



**Table S1. Sequences of human and mouse CERKL primers used in PCR reactions.**

Name	Forward primer sequence (5' → 3')	Name	Reverse primer sequence (5' → 3')
GAPDH Fw	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGG	GAPDH Rv	CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC
<b>Human</b>			
<b>Tissue expression</b>			
A	AATCTGACTGTAATGATCAATGGC	B	GAAACAATTACATGTTACTTTGGAATC
<b>Isoforms</b>			
C	CGCAGGCGTCAGGCGCATAG	H	AACCATATGTCACAGTGGTCTTC
D	CTGGACGCGGCTAGAGCTGG	L	GTTGCAGTTATCACATGAGGAAC
E	CTGGAGGAGGCGCAGGAAC	N	CCTTAACAACAGCAAAATCTCTCCG
F	CTGTGCCTCCGGCGTGTTA	O	CAAGGAATTGCCATAATGCTGAC
G	CAGTTGTGACGTGGTGCTGAG	P	GACCTCTGATGCAACTTCCATTAAGTCAC
I	GAACCTCTGTTGAAGCTTGCA	Q	CCCCTGTCAGATCAGCAGCA
J	TGTGAACTCCAGGGATTTGATG		
K	CAGCTTCCACTTGGCTTAATAC		
M	CGACGTCTGCACCTTCAGCACCG		
<b>Mouse</b>			
<b>Tissue expression</b>			
a	CTGACTGTGGTGGTCACTGG	b	GAACCTCTGATGCAGCTTCC
<b>Isoforms</b>			
c	ATCCCCAGGTTTGAACAATTC	o	GAACCTCTGATGCAGCTTCC
d	GGAGACGCAGGAGCCGGG	p	GATGGTTGCAGTCACCACGTG
e	TGACGAATGTGAACTCCGAGG	q	CATCGGTATTTCTCTGCCAGAG
f	CGCAGAAGGCAAGGTGTCC	r	GTCAGATTCTGCAGATCTCTGTG
g	TGTAGCCACACTTCCTTCCCA	s	CCAGGTGGAGGAACAGCAATG
h	GTTTTGCTGCGTGGCATCTTC		
i	GACGCATCCAGCCCGAGC		
j	TACGAGAAGGTGGAGCCTCTG		
k	CTCTCGTTGGAGCAGAGCTTC		
l	TGGAGGAAGCCTGGAAGAAATG		
m	CTGGGAGGAAGTGGGGTTTG		
n	TGAGTGGGATATTCTGATGGAC		

**Table S2.A - Accession numbers for human *CERKL* transcripts.**

Article nomenclature	Genbank nomenclature	Accession Number	mRNA length (bp)	Correspondance with previous isoforms
CERKL h1	2	NM_001030311.2	2482	shorter 3' UTR end
CERKL h2	1	NM_201548.4	2404	shorter 3' UTR end
CERKL h3	6	NR_027690.1	2340	shorter 3' UTR end
CERKL h4	5	NR_027689.1	2208	shorter 3' UTR end
CERKL h5	4	NM_001030313.2	2197	shorter 3' UTR end
CERKL h6	3	NM_001030312.2	2065	shorter 3' UTR end
CERKL h7	10	HQ426666	2193	
CERKL h8	11	HQ426667	2129	
CERKL h9	12	HQ426668	1997	
CERKL h10	13	HQ426669	1986	
CERKL h11	14	HQ426670	1854	
CERKL h12	15	HQ426671	2193	
CERKL h13	16	HQ426672	2115	
CERKL h14	17	HQ426673	2051	
CERKL h15	18	HQ426674	1919	
CERKL h16	19	HQ426675	1908	
CERKL h17	20	HQ426676	1776	
CERKL h18	21	HQ426677	1486	
CERKL h19	9	AJ697857	2273	
CERKL h20	22	HQ426678	2440	
CERKL h21in	23	HQ426679	1541 (incomplete)	The sequence found partially corresponds to CERKL 8 (AJ697855 )
	7	NM_001160277.1		not found in this work

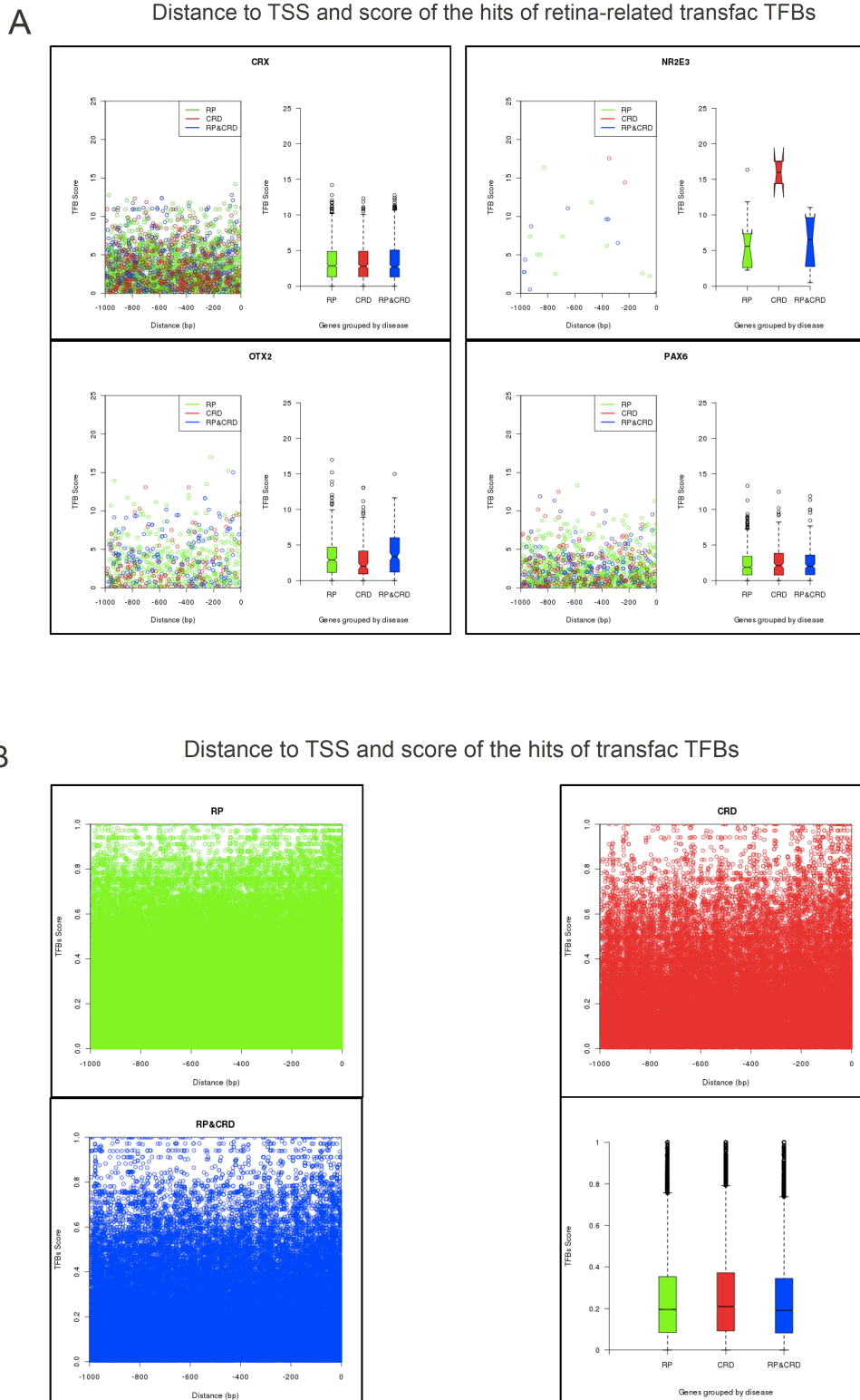
**Table S2.B - Accession numbers for mouse *Cerkl* transcripts.**

Article nomenclature	Genbank nomenclature	Accession Number	mRNA length (bp)	Correspondance with previous isoforms
CERKL m1	1	HQ426680	1930	Same as NM_001048176 with a longer 3'UTR (255bp)
CERKL m2	2	HQ426681	1723	
CERKL m3	3	HQ426682	1591	
CERKL m4	4	HQ426683	1348	
CERKL m5	5	HQ426684	1798	
CERKL m6	6	HQ426685	1870	
CERKL m7	7	HQ426686	1787	
CERKL m8	8	HQ426687	2061	
CERKL m9	9	HQ426688	2077	
CERKL m10	10	HQ426689	1945	
CERKL m11	11	HQ426690	2147	
CERKL m12	12	HQ426691	1729	
CERKL m13	13	HQ426692	1860	
CERKL m14	14	HQ426693	1770	
CERKL m15	15	HQ426694	1683	
CERKL m16	16	HQ426695	1902	
CERKL m17	17	HQ426696	1842	
CERKL m18	18	HQ426697	1987	
CERKL m19	19	HQ426698	1695	
CERKL m20	20	HQ426699	1759	
CERKL m21	21	HQ426700	2033	
CERKL m22	22	HQ426701	2049	
CERKL m23	23	HQ426702	1512	A partial sequence (BY078014) was described
CERKL m24	24	HQ426703	1305	
CERKL m25	25	HQ426704	1669	
CERKL m26	26	HQ426705	1369	
CERKL m27	27	HQ426706	1456	
CERKL m28	28	HQ426707	1603	
CERKL m29in	29	HQ426708	966	
CERKL m30in	30	HQ426709	1361	
CERKL m31in	31	HQ426710	1301	
CERKL m32in	32	HQ426711	1508	





**Supplementary Fig. S2: Analysis of the TFBS in RP and CRD promoters.** (A) The distribution, scores and mean values of the matches for CRX, NR2E3, OTX2 and PAX6 TFBS matrices are depicted as scatter and box-plots. Genes were grouped by disease and each color represent each pf the three different gene groups as follows: RP genes (in green), CRD genes (in red), and the genes responsible for both diseases (in blue). (B) The distribution, scores and mean values of the matches (values normalized to 1) for all the analyzed Transfac matrices were analyzed together within the same three groups.



**Supplementary Fig. S3.** Distribution of SNPs throughout the *CERKL* genomic region. Along the 160165 bp encompassing the complete *CERKL* gene, 1088 SNPs have been reported. Only 69 of those are located within exons and 8 correspond to pathogenic reported mutations (highlighted in green). Exons with more SNPs than mean are highlighted in red, whereas those with no SNPs –or less SNPs than mean– are shown in blue.

	hg19 End	hg19 Start	hg19 Size	hg19 N mut	hg19 N SNF	hg19 SNPs/Kb	
5'UTR_NeuroD1/5'UTR_CERKL2	182545156	182545381	226	0	3	13,274	
NeuroD1	182542517	182543587	1071	0	5	4,6685	
3'UTR_NeuroD1	182541194	182542516	1323	0	16	12,094	
5'UTR_CERKL	182521734	182521851	118	0	1	8,4746	
<b>Exon1</b>	<b>182521496</b>	<b>182521733</b>	<b>238</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>16,807</b>	
Exon1a	182521703	182521733	31	0	0	0	
<b>Exon1b</b>	<b>182521496</b>	<b>182521562</b>	<b>67</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>29,851</b>	
ExonVega1	182514687	182514804	118	0	2	16,949	
ExonVega2	182514307	182514463	157	0	0	0	
Exon2a	182481982	182482148	167	0	2	11,976	
<b>Exon2</b>	<b>182468564</b>	<b>182468806</b>	<b>243</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>16,461</b>	
Exon3a	182438480	182438529	50	0	0	0	
Exon3	182438480	182438611	132	0	0	0	
Exon4	182430785	182430848	64	0	0	0	
Exon4b	182430160	182430237	78	0	1	12,821	
<b>Exon5</b>	<b>182423293</b>	<b>182423435</b>	<b>143</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>13,986</b>	
Exon6	182414361	182414435	75	0	0	0	
Exon7	182413407	182413584	178	0	0	0	
<b>Exon8</b>	<b>182413272</b>	<b>182413331</b>	<b>60</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<b>Exon8_intron8_exon9</b>	<b>182412549</b>	<b>182413331</b>	<b>783</b>	<b>1</b>	<b>20</b>	<b>25,543</b>	All intronic SNPs
Exon9	182412549	182412574	26	0	0	0	
Exon10	182412345	182412453	109	0	0	0	
Exon11	182409427	182409523	97	0	1	10,309	
Exon12	182403819	182403991	173	0	2	11,561	
Exon13	182402911	182402971	61	0	0	0	
3'UTR_CERKL	182402471	182402910	440	0	4	9,0909	
PH domain			480		8	16,667	
NLS-1 domain			36		0	0	
NLS-2 domain			36		2	55,556	
NES-1 domain			30		0	0	
NES-2 domain			36		1	27,778	
DAGK domain			459		2	4,3573	
CERK domain			216		1	4,6296	
					14		
Genomic region analyzed	160165						
SNPs analyzed	1088						
SNPs within exons	69						
SNP density (mean)	6,79299472						
Pathogenic mutations	8						
<b>Exons with mutations</b>							
<b>Exons with more SNPs than mean</b>							
<b>Exons with less SNPs than mean</b>							
<b>SNPs within UTRs</b>	24	11,3906028					
<b>SNPs within exons</b>	45	10,9196797					



## CAPÍTOL 1. RESULTATS SUPLEMENTARIS

El mecanisme *nonsense-mediated decay* com a causa molecular de retinosi pigmentària en les famílies portadores de la mutació R257X de *CERKL*

## ANTECEDENTS

L'any 2004 el nostre grup va descriure el gen *CERKL* com a causant de retinosi pigmentària autosòmica recessiva (arRP) en una família consanguínia espanyola (P2), on tots els afectes eren portadors en homozigosi d'una mutació sense sentit (R257X) situada a l'exó 5 del gen (Tuson et al. 2004). Posteriorment, la mutació va ser identificada en dues altres famílies espanyoles no emparentades, E1 i E3, afectes també d'arRP (Tuson et al. 2004, Pomares et al. 2007). Més recentment, el grup ha identificat la mateixa mutació en dues famílies arRP catalanes, 98RE i 1LM, i també l'ha trobada en heterozigosi en una pacient d'una família espanyola, 1DG. En aquest darrer cas no s'ha pogut identificar l'altra variant al·lèlica. Els pedigrís de totes aquestes famílies es recullen a la Figura 23. La mutació R257X també ha estat identificada per altres grups en un total de 9 famílies espanyoles més. A partir d'aquestes dades, *CERKL* es presenta com un dels gens arRP més freqüents a l'estat espanyol (Ávila-Fernández et al. 2008, Ávila-Fernández et al. 2010). També s'ha descrit en dues famílies d'origen europeu i canadenc (Aleman et al. 2009 i Littink et al. 2010).

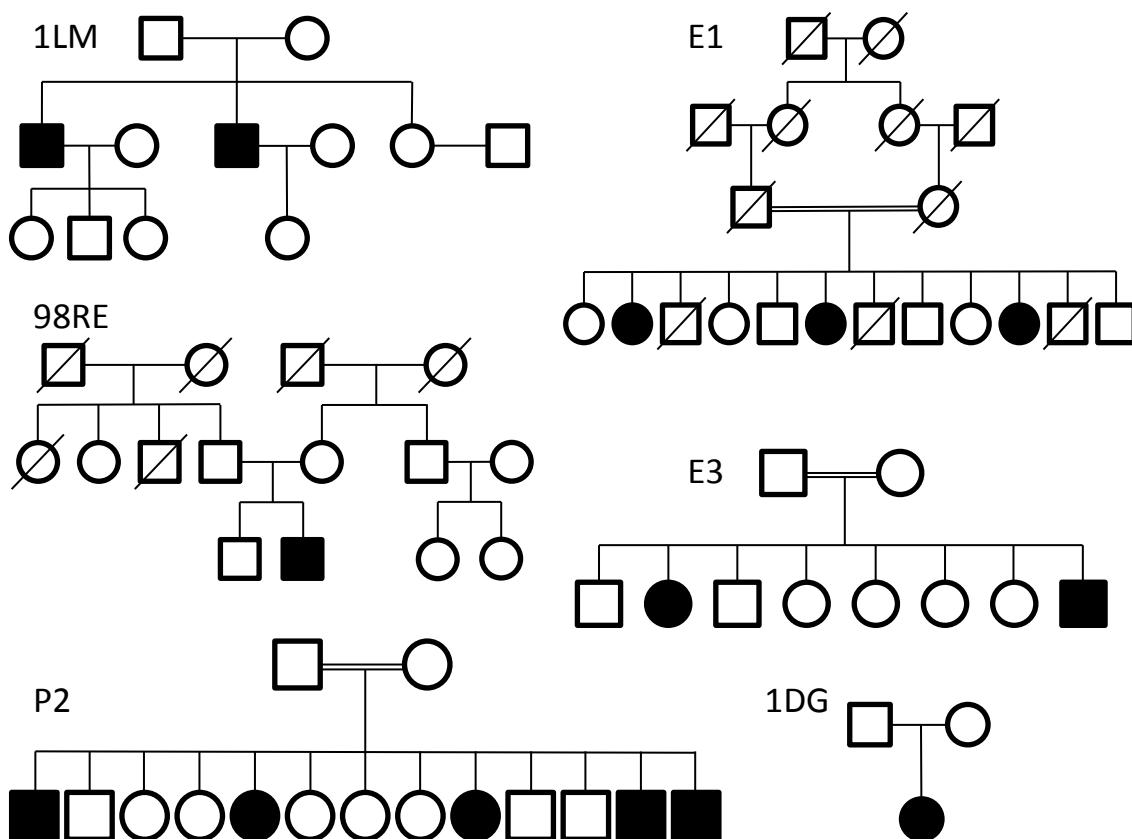


Figura 23. Pedigrís de les famílies arRP on el grup ha identificat la mutació R257X de *CERKL*. Els individus afectes de les famílies 1LM, 98RE, P2, E1 i E3 presenten R257X en homozigosi, mentre que la pacient de la família 1DG la presenta en heterozigosi.

En relació a la mutació R257X ens vàrem proposar, d'una banda, esbrinar la causa de l'elevada freqüència de la mutació R257X a la població espanyola i determinar un possible efecte fundador mitjançant anàlisis haplotípiques d'individus afectes de les diferents famílies, utilitzant marcadors intra- i intergènics de *CERKL*. D'altra banda, ens vam plantejar estudiar l'impacte molecular de la mutació R257X, ja que es troba a un exó que pateix *splicing* alternatiu que no queda inclòs en algunes de les isoformes del gen. Atès que l'expressió del gen en teixits com la sang o la saliva humana és molt baixa, vàrem construir un minigen amb la mutació per tal d'analitzar-ne *in vitro* la patogenicitat.

## MATERIAL I MÈTODES

### Anàlisis haplotípiques mitjançant genotipatge de marcadors de tipus SNP

Es van escollir marcadors de tipus SNP tenint en compte la seva informativitat i la seva posició respecte *CERKL*. Es van dissenyar oligonucleòtids flanquejants a la posició de cada SNP per tal d'amplificar-ne la regió mitjançant reaccions de PCR en, com a mínim, un individu afecte de cada família. Els SNPs escollits, la freqüència de l'al·lel minoritari (MAF) i les seqüències dels oligonucleòtids s'indiquen a la Taula 4. Tots els productes amplificats es van resoldre en un gel d'agarosa, es van purificar i seqüenciar.

Taula 4. SNPs, MAFs i seqüències dels oligonucleòtids utilitzats per amplificar cadascun dels SNPs.

SNP	MAF	Primer sequence 5' -> 3'	
		Forward	Reverse
rs1473295	0,476	GGGAAAAGGCTAGGTAGCGA	CCTCTGCAGCTGGGTCTTT
rs6433926	0,207	GCCACATATCCCATAGCTTCTG	GTGTACCACCAATGATTTGCTG
rs1449255	0,332	AGCACCTCCGTCTGACACTA	TGCAAGTGTTACTGCTTCAAGT
rs1047307	0,318	AGAGAGCTGTGGCCGAATTT	CTGAGAGGCCTGTGTTGGAC
rs155107	0,304	GACGGCAGCAGTGGTCAATA	GCAGTTTCATGGAGTTCAGCA
rs10184153	0,317	CTGATGACTTTGGCTAAGGTTT	CTATAGACTTCATCACTGAAGTG
rs2077783	0,380	CAACCAACACTTGGCCTTCTT	TGCTTTTGCATGCCCAAATGT
rs720453	0,379	GAACTAAGCCAATTCTTCTCAG	TAGAAATGTGCGGTAGATCTTG

MAF: minor allele frequency

### Construcció del minigen de *CERKL*

Per dur a terme l'anàlisi *in vitro* de l'efecte de la mutació R257X, es va construir un minigen dels 13 exons de *CERKL* (Figura 24). Tenint en compte que l'exó 5, on es troba la mutació, i els exons 3 i 4 pateixen *splicing* alternatiu, es van afegir les regions intròniques flanquejants (140-210 pb) d'aquests exons i també l'intró 6 sencer. Un total de set fragments van ser amplificats mitjançant reaccions de PCR utilitzant oligonucleòtids amb dianes de restricció els quals, posteriorment, van ser clonats seqüencialment al vector pcDNA 3.1. A més, per tal de diferenciar l'expressió de *CERKL* del minigen de l'endògena del gen de les cèl·lules en cultiu, es va afegir la seqüència de l'epítoc de l'hemaglutinina (HA) davant de *CERKL*. Un cop finalitzada la construcció plasmídica, es va realitzar una mutagènesi dirigida per tal d'introduir la mutació R257X; CGA->TGA.

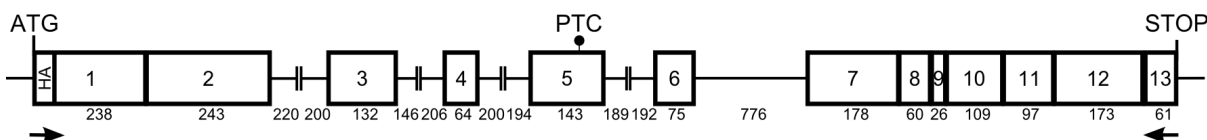


Figura 24. Esquema del minigen de *CERKL* clonat al vector pcDNA 3.1. S'indiquen les mides (en pb) de les regions intròniques flanquejants, així com la dels exons. La mutació R257X, la qual provoca l'aparició d'un codó stop prematur (PTC), s'assenyala a l'exó 5. També s'assenyala l'epítip HA i la posició dels oligonucleòtids utilitzats per amplificar el cDNA del minigen (fletxes).

### *Cultius cel·lulars, transfecció i tractaments*

Per tal de realitzar l'anàlisi *in vitro* de la patogenicitat de la mutació R257X es van utilitzar cèl·lules HEK293T, sembrades en DMEM suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS), 100 U/ml de penicil·lina i 100 µg/ml d'estreptomicina. Els minigens silvestre (WT) i mutant (MUT) van ser transfectats mitjançant *Lipofectamine 2000*<sup>TM</sup> (Life Technologies), seguint el protocol del fabricant. A les 24 h post-transfecció es va realitzar el tractament amb 500 µg/ml cicloheximida (CHX), un inhibidor químic de la traducció i del mecanisme de NMD, durant 4 h a 37 °C. Pels tractaments amb antibiòtics aminoglicòsids, utilitzats per tal d'afavorir la supressió de la terminació (*ribosomal readthrough*) del codó mutat R257X, es van utilitzar diferents dosis de geneticina (G418) i gentamicina. A les 4 h post-transfecció es va canviar el DMEM de les cèl·lules per medi amb 50, 75 o 100 µg/ml de G418 o bé 500, 700 o 1000 µg/ml de gentamicina.

### *Extracció de RNA i RT-PCR semi-quantitativa*

L'extracció de RNA es va realitzar a partir d'1 ml de cèl·lules HEK293T mitjançant el producte *RNeasy Micro Kit* (Qiagen). La generació del cDNA es va dur a terme utilitzant el *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* (Roche). En ambdós casos es va seguir el protocol recomanat pel fabricant. Un cop obtingut el cDNA es va realitzar una PCR específica per tal d'amplificar l'expressió del minigen, utilitzant un oligonucleòtid situat a l'epítip HA i l'altre a l'exó 13 de *CERKL* (Fw: CGTGCCTGACTATGCCAGCCTG i Rv: TTACTTTGGAATCATTCTTC) (s'indiquen les posicions a la Figura 24, fletxes). El gen *GAPDH* es va utilitzar per tal de normalitzar les mostres (Fw: TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGG i Rv: CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC). Els productes de PCR van ser identificats electroforèticament en un gel d'agarosa i cadascuna de les bandes obtingudes va ser retallada, purificada i seqüenciada. La quantificació de les bandes es va realitzar mitjançant el programa Quantity One (Bio-Rad).

## RESULTATS

### *L'efecte fundador com a causa de l'elevada freqüència de la mutació R257X en la població espanyola*

L'anàlisi del pedigrí de la família P2 ens va permetre identificar l'haplotip lligat a la mutació R257X. En aquest punt ens vàrem plantejar si la resta de famílies diagnosticades compartien la mutació degut a un

efecte fundador, ja que malgrat no existien evidències de parentesc, totes elles eren d'origen espanyol. Per a l'anàlisi dels haplotips es varen seleccionar 9 marcadors de tipus SNP amb elevada informativitat (MAFs de 0,2 a 0,5), situats intra- i intergènics de *CERKL*. Com a mínim un individu afecte de cada família va ser genotipat per cadascun dels polimorfismes. Tots els cromosomes portadors de la mutació R257X van resultar compartir el mateix haplotip de 3 marcadors, abastant unes 252 kb (Figura 25) i, en la majoria de casos, a més, l'haplotip compartit s'estén tant *upstream* com *downstream*. Per exemple, les famílies E3 i P2, així com un dels al·lells de 1LM i 98RE, i també l'al·lel portador de R257X en la pacient de la família 1DG, comparteixen tots els marcadors analitzats (370 kb).

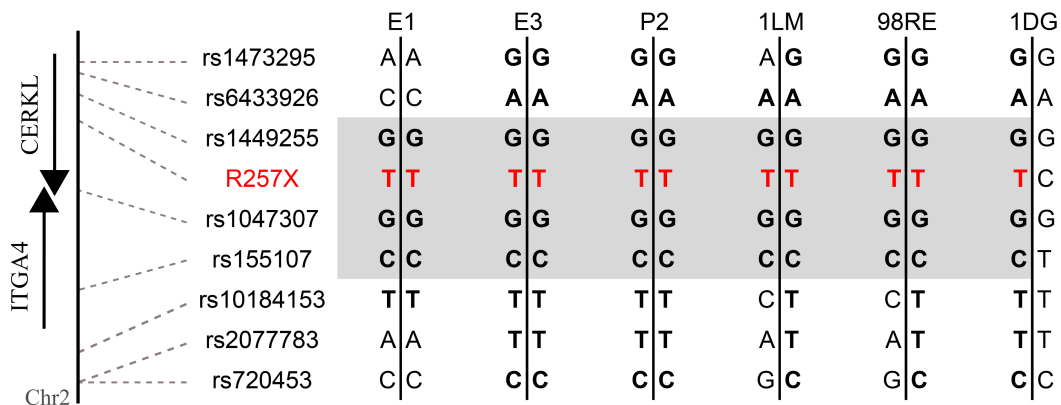


Figura 25. Anàlisi haplotípica del locus RP26 mitjançant marcadors de tipus SNP genotipats en un individu afecte de cada família. La posició relativa dels SNPs respecte el gen *CERKL* es mostra en cada cas. En vermell s'assenyala la mutació R257X. L'haplotip que cosegrega amb la malaltia es troba conservat en les 6 famílies espanyoles (ombregat gris). En alguns individus l'haplotip conservat s'estén a d'altres marcadors (en negra).

La conservació de l'haplotip de la regió flanquejant a R257X suggereix un origen comú per aquesta mutació en la població espanyola, fet que explicaria la seva elevada freqüència. Malgrat 6 famílies no aporten prou poder estadístic per datar l'origen de la mutació, la mida de l'haplotip conservat indicaria un origen antic. Mitjançant aquesta anàlisi, a més, hem pogut identificar l'haplotip de risc, el qual és d'utilitat en estudis de cosegregació basats en SNPs situats intra- i intergènics respecte el gen d'interès, particularment en aquelles famílies amb pedigrís petits, poques generacions i amb un nombre reduït d'individus afectes.

#### L'expressió del minigen dona lloc a diferents isoformes de *CERKL*

Per tal d'estudiar la patogenicitat de la mutació R257X es van construir dos minigens de *CERKL*, el silvestre (WT) i el portador de la mutació (MUT), al vector pcDNA 3.1. La mutació R257X es troba situada a l'exó 5 que juntament amb els exons 3 i 4 presenten *splicing* alternatiu. Per aquesta raó, es van afegir les regions intròniques corresponents de l'intró 2, 3, 4 i 5 (Figura 24). A més, i degut a la importància de l'existència d'unions exó-exó *downstream* del PTC a l'hora d'estimular el mecanisme de NMD, es va introduir també l'intró 6.

Els resultats de les reaccions de RT-PCR van revelar l'expressió de 3 isoformes del minigen: la variant h2 (NM\_201548.4), que inclou tots 13 exons; la variant h6 (NM\_001030312.2), que pateix *splicing* alternatiu i enllaça l'exó 2 directament amb el 6; i la variant h7 (HQ426666), que utilitza un donador d'*splicing* intern situat a l'exó 1 (Figura 26).

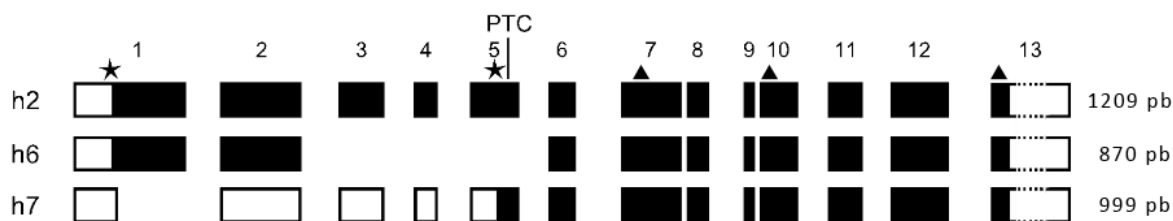


Figura 26. Isoformes aïllades de l'anàlisi d'expressió per RT-PCR del minigen de CERKL en cèl·lules HEK293T. S'indica (en pb) les mides esperades en cada cas. Les caixes simbolitzen els diferents exons i en negre es mostra la pauta de lectura oberta més llarga a partir d'una metionina iniciadora de traducció (TIS) proteica (asteriscs). S'assenyala la mutació R257X que causa l'aparició d'un codó stop prematur (PTC) a l'exó 5. Els triangles simbolitzen altres metionines TIS identificades en estudis *in silico* amb matrius Kozak.

#### La mutació R257X es troba subjecta al mecanisme de NMD

En el cas del minigen WT no es van observar diferències entre les cèl·lules no tractades (*non-treated*, NT) i les tractades amb CHX (Figura 27), ja que les variants h2 i h6 mantenen una pauta de lectura oberta des del primer a l'últim exó. Pel que fa a la variant h7, l'*splicing* entre el donador intern de l'exó 1 (on es situa la metionina d'inici) i l'exó 2 trenca la pauta de lectura i genera PTCs en diversos exons. No obstant, si la traducció comencés a la metionina de l'exó 5, de la qual s'ha comprovat *in vitro* el seu potencial, es generaria una proteïna més curta però amb una pauta de lectura oberta fins l'últim exó, la qual no es veuria sotmesa a NMD i explicaria el fet que s'observin els mateixos nivells d'aquesta isoforma en les cèl·lules no tractades i les tractades amb CHX.

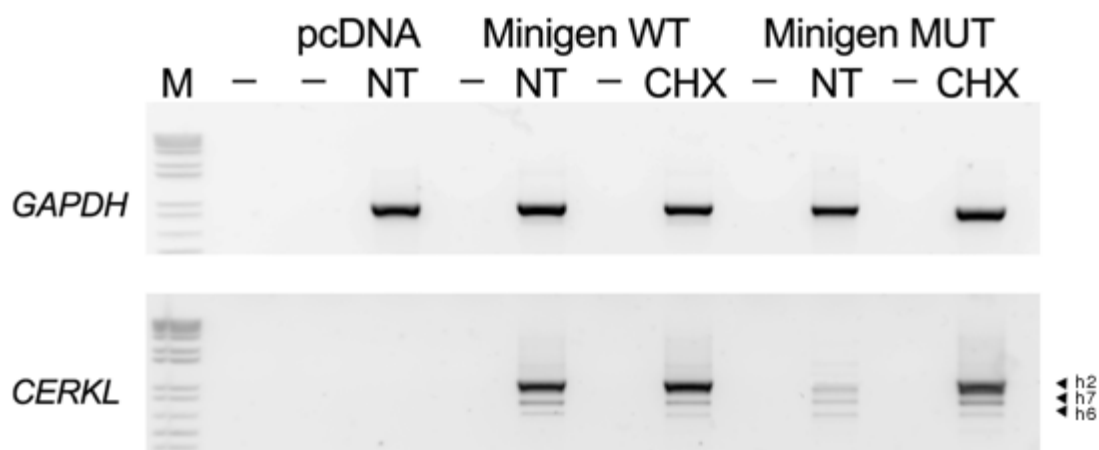


Figura 27. Avaluació de l'expressió per RT-PCR dels minigens silvestre (WT) i portador de la mutació R257X (MUT) en cèl·lules no tractades (NT) i tractades amb cicloheximida (CHX). Com a control negatiu es va transfectar cèl·lules sense no tractades amb el vector buit pcDNA 3.1. L'expressió de *GAPDH* es va utilitzar com a normalitzador de les mostres. L'expressió del minigen va donar lloc a 3 isoformes diferents, h2, h6 i h7. En el cas del minigen MUT, les isoformes h2 i h7 es troben sotmeses al mecanisme de NMD, ja que al tractar les cèl·lules amb CHX es restauen els nivells d'expressió i s'igualen als del minigen WT.

D'altra banda, en el cas del minigen MUT, es va observar una disminució de l'expressió de les isoformes h2 i h7 (Figura 27). Aquestes isoformes es trobarien sotmeses al mecanisme de NMD, ja que en el cas de les cèl·lules tractades amb CHX es restauraven els nivells d'expressió i s'igualaven als del minigen WT. Pel que fa a la variant h6, no es van detectar diferències entre NT i CHX, ja que l'exó 5, on es situa el PTC, no s'hi troba inclòs i, per tant, la mutació R257X no hi té cap impacte. A la Figura 28 es detallen les quantitats relatives de cadascuna de les isoformes en cada cas. Els resultats mostren un nivell de degradació per NMD diferencial entre les isoformes h2 i h7 del minigen MUT. Mentre la isoforma h2 és degradada en gairebé un 70%, la h7 no arriba al 20%. El diferent grau de preservació del transcrit podria ser degut a l'ús de metionines alternatives *downstream* del PTC de l'exó 5 en el cas de la variant h7. Entre d'altres, a l'exó 7 i 10 existeixen metionines potencialment bones iniciadores de traducció (TIS) segons les puntuacions *Kozak* (Figura 26).

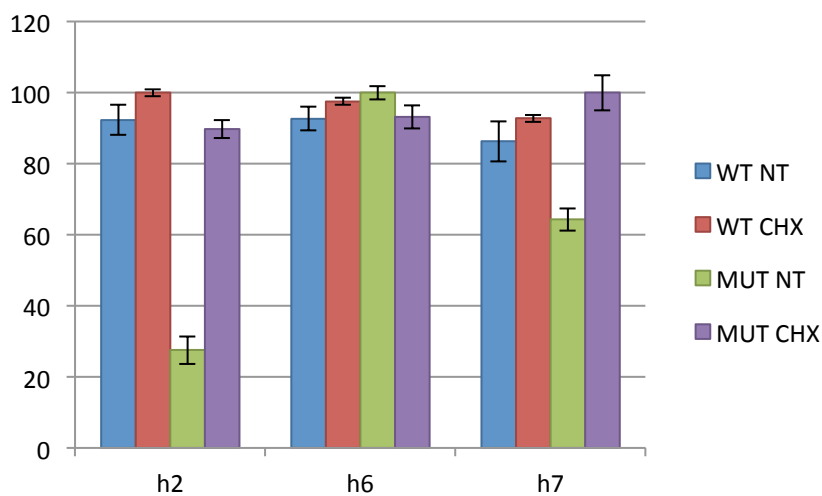


Figura 28. Semi-quantificació de les diferents isoformes (h2, h6 i h7) de *CERKL* obtingudes a partir de la transfecció dels minigens salvatge (WT) i mutant (MUT) en cèl·lules HEK293T no tractades (NT) o tractades amb cicloheximida (CHX). En cada cas, s'ha considerat com el 100% el valor més elevat d'entre les mostres.

En el cas dels pacients, i segons les nostres dades, tots aquells transcrits que continguin l'exó 5 es veurien degradats pel mecanisme de NMD. No obstant, restarien preservades amb major o menor grau aquelles isoformes que mitjançant *splicing* alternatiu es saltin aquest exó, les quals no serien suficients per rescatar la funció normal de *CERKL*.

#### *L'ús d'antibiòtics aminoglicòsids no suprimeix la terminació de la traducció del mutant R257X*

S'han descrit diversos factors que reconeixen els 3 triplets *stop* traduccional, s'hi uneixen i estimulen l'alliberació de la cadena polipeptídica del ribosoma; són els eRFs (*eukaryotic Release Factors*). En condicions normals, la terminació de la traducció en alguns codons *stop* és molt eficient. En algunes ocasions, però, els tRNAs poden aparellar-se amb dues de les tres bases del codó *stop*, competint amb els eRFs i suprimint la terminació (*ribosomal or translation readthrough*). Les bases moleculars responsables d'aquest mecanisme es

troben lluny de ser conegudes. La supressió de la terminació pot ser estimulada mitjançant l'ús d'antibiòtics aminoglicòsids, que promouen la síntesi d'una proteïna sencera anul·lant les mutacions sense sentit. En els últims anys, s'han realitzat diversos estudis sobre la utilització terapèutica d'aquests antibiòtics, encara que la seva eficiència varia substancialment entre les diferents mutacions sense sentit. A més, la complexitat del mecanisme fa difícil predir els resultats del tractament.

En el cas de la mutació R257X i utilitzant l'estratègia del minigen ens vàrem plantejar l'anàlisi de dos antibiòtics aminoglicòsids, la geneticina (G418) i la gentamicina, per tal de comprovar-ne l'eficiència de supressió de la terminació. En cap dels dos casos, i utilitzant diferents concentracions, es va aconseguir rescatar la terminació de la traducció en el cas del minigen MUT (dades no mostrades). Estudis recents han demostrat que la seqüència òptima per la supressió de la terminació inclou una citosina a +4 i un uracil a -1 del codó stop (Floquet et al. 2012), trobant-se una adenosina a +4 i una citosina a -1 en el cas de *CERKL*. Aquestes posicions no es conserven a *CERKL* i potser aquesta és la causa de la no supressió.



## CAPÍTOL 2

### Construcció i caracterització de models animals per a l'estudi de CERKL

#### PUBLICACIÓ 2

*“Targeted knockdown of Cerkl, a retinal dystrophy gene, causes mild affectation of the retinal ganglion cell layer”*

#### MATERIAL SUPLEMENTARI

Taules i figures suplementàries de la Publicació 2

#### PUBLICACIÓ 3

*“CERKL knockdown causes retinal degeneration in Zebrafish”*

#### MATERIAL SUPLEMENTARI

Taules i figures suplementàries de la Publicació 3



## PUBLICACIÓ 2

## TÍTOL

“Targeted knockdown of *Cerkl*, a retinal dystrophy gene, causes mild affectation of the retinal ganglion cell layer”

## AUTORS (ANY)

Alejandro Garanto, Javier Vicente-Tejedor, Marina Riera, Pedro de la Villa, Roser González-Duarte i Gemma Marfany

## REFERÈNCIA

Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Basis of Disease 1822: 1258-1269, 2012

## RESUM

Per tal d'obtenir dades sobre la funció de CERKL i esbrinar la seva contribució a la patogenicitat de les distròfies de retina, ens vàrem plantejar la generació d'un model *knockout* (KO) total a ratolí. La construcció d'aquest model animal va consistir en la deleció d'unes 2.3 kb de la regió genòmica que comprenia el promotor proximal, l'exó 1 i part de l'intró 1 de *Cerkl*. Els ratolins *Cerkl*<sup>-/-</sup> van resultar ser viables i fèrtils, sense cap fenotip aparent a la retina. Estudis més en detall a nivell transcripcional van revelar una expressió entre moderada i basal de *Cerkl* en els animals KO (35% respecte els animals WT), deguda a l'ús de promotors alternatius; entre ells el del gen *NeuroD1*, adjacent a 5' a *Cerkl*, i un parell de promotors interns al voltant de l'exó 3 del propi gen. Hibridacions *in situ* i immunohistoquímiques van revelar que aquesta expressió romanent es concentrava principalment a les cèl·lules fotoreceptores i, de manera més dèbil, a les cèl·lules ganglionars i de la capa nuclear interna. La caracterització morfològica a fons de les retines d'aquests animals van mostrar signes clars i consistents de gliosi i estrès cel·lular, ja que els nivells de la proteïna GFAP, un marcador d'estrès retinal, es trobaven augmentats. A més, assajos de TUNEL van revelar un increment del nombre de cèl·lules apoptòtiques a les retines KO. Finalment, anàlisis semi-quantitatives mitjançant Western-blot utilitzant marcadors de diferents tipus cel·lulars, van mostrar una pertorbació de les cèl·lules ganglionars a les retines dels animals *Cerkl*<sup>-/-</sup>, amb una davallada significativa i no progressiva dels nivells de Brn3a, un marcador d'aquest tipus cel·lular. Pel que fa a les proves electroretinogràfiques, es van observar diferències consistents i repetitives en els potencials oscil·latoris (OPs) dels KO, indicatives d'una possible alteració estructural o funcional de les cèl·lules ganglionars i/o amacrines. En resum, la deleció del promotor i l'exó 1 de *Cerkl* va generar un animal *knockdown* enlloc del *knockout* esperat, en el qual es produïen transcrits amb diverses metionines en pauta a partir de promotors alternatius. L'animal transgènic presentava un fenotip lleu, sense cap afectació òbvia a nivell morfològic, però mostrava un augment consistent d'estrès i apoptosi cel·lular.

### **APORTACIÓ PERSONAL AL TREBALL**

La meva contribució en aquest treball ha estat el disseny i l'obtenció d'un anticòs murí anti-Cerkl. A més, he participat en la gestió i manteniment de la colònia transgènica, en l'obtenció de mostres i l'extracció de RNA de diferents teixits i, en col·laboració amb l'Alejandro Garanto, en el disseny i les anàlisis de la tècnica de *real-time* RT-PCR realitzada a partir de mostres de retina WT i KO.



## Targeted knockdown of *Cerkl*, a retinal dystrophy gene, causes mild affectation of the retinal ganglion cell layer

Alejandro Garanto<sup>a,b,c</sup>, Javier Vicente-Tejedor<sup>d</sup>, Marina Riera<sup>a,b,c</sup>, Pedro de la Villa<sup>d</sup>,  
Roser Gonzàlez-Duarte<sup>a,b,c,\*</sup>, Román Blanco<sup>e,\*\*</sup>, Gemma Marfany<sup>a,b,c,\*\*\*</sup>

<sup>a</sup> Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Spain

<sup>b</sup> Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> CIBERER, Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

<sup>e</sup> Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 November 2011

Received in revised form 10 April 2012

Accepted 11 April 2012

Available online 19 April 2012

#### Keywords:

Knockout model

Retinal dystrophy

Retinitis pigmentosa

Ganglion cell

### ABSTRACT

In order to approach the function of the retinal dystrophy *CERKL* gene we generated a novel knockout mouse model by cre-mediated targeted deletion of the *Cerkl* first exon and proximal promoter. The excised genomic region (2.3 kb) encompassed the first *Cerkl* exon, upstream sequences including the proximal promoter and the initial segment of the first intron. The *Cerkl*  $-/-$  mice were viable and fertile. The targeted *Cerkl* deletion resulted in a knockdown more than a knockout model, given that alternative promoters (unreported at that time) directed basal expression of *Cerkl* (35%). *In situ* hybridizations and immunohistochemistry showed that this remnant expression was moderate in the photoreceptors and weak in the ganglion and inner cell layers. Morphological characterization of the *Cerkl*  $-/-$  retinas did not show any gross structural changes, even at 12 months of age. However, some clear and consistent signals of gliosis and retinal stress were detected by the statistically significant increase of i) the glial fibrillary antigen protein (GFAP) expression, and ii) apoptosis, as detected by TUNEL. Remarkably, consistent non-progressive perturbation (from birth up to 12 months of age) of ganglion cells was supported by the decrease of the Brn3a marker expression as well as the reduced oscillatory potentials in the electroretinographic recordings. In conclusion, the *Cerkl*  $-/-$  knockdown shows a mild retinal phenotype, with increased levels of cellular stress and apoptosis indicators, and clear signs of functional alteration at the ganglion cell layer, but no detectable morphological changes.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Mutations in the *CERKL* gene are associated to autosomal recessive retinal degeneration. First characterized as a Retinitis Pigmentosa (RP) causing gene [1–6], and later also considered to promote Cone-Rod Dystrophy (CRD) [7,8], its classification as a RP or CRD gene is still under question. In fact, although the association of *CERKL* mutations with retinal pathology is clear, we are still at the dark concerning its physiological function and contribution to the progressive photoreceptor degeneration.

*CERKL* [6] was named after the amino acid identity conservation with CERK [9], the reported ceramide kinase enzyme, known to phosphorylate the sphingolipid ceramide to ceramide-1-phosphate (C1P) [10], whose

balance acts as cellular rheostat between apoptosis *versus* survival signaling pathways [11–13]. Although *CERKL* has an intact diacylglycerol kinase domain [6,14], no kinase activity neither on lipids nor proteins, could be assigned after intense studies from many groups [14–16]. Remarkably, overexpression of *CERKL* in cultured cells confers protection against apoptosis caused by oxidative stress injury, providing the first experimental clues on its role in retinal cell protection [16].

Very recently, an accurate assessment of the transcriptional products has unveiled that *CERKL* shows a high repertoire of transcript isoforms due to a combination of extensive alternative splicing plus the use of at least three additional promoters [17]. Adding to the complexity of *CERKL* functional analysis, the protein subcellular localization is extremely dynamic, shifting from the cytoplasm – where it mainly localizes associated to the endoplasmic reticulum and Golgi membranes – to the nucleus, and seldom at the nucleoli [16].

*CERKL* shows a wide tissular expression although the tissues where the expression is highest are retina in humans and retina and liver in mouse [17]. *In situ* mRNA hybridization on mouse retinal sections showed strong *Cerkl* specific expression in the ganglion cell layer (GCL), moderate and interspersed staining in the inner nuclear layer (INL), and

\* Corresponding author. Tel.: +34 934021034.

\*\* Corresponding author. Tel.: +34 918854522.

\*\*\* Corresponding author. Tel.: +34 934021502.

E-mail addresses: [rgonzalez@ub.edu](mailto:rgonzalez@ub.edu) (R. Gonzàlez-Duarte), [roman.blanco@uah.es](mailto:roman.blanco@uah.es) (R. Blanco), [gmarfany@ub.edu](mailto:gmarfany@ub.edu) (G. Marfany).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

faint detection in the inner segment of photoreceptors, whereas immunohistochemistry with antibodies against specific epitopes revealed strong CERKL colocalization with cones, fainter in rods, and moderate at the INL and GCL.

Our group first identified the R257X mutation in CERKL [6], which it is also the most frequent and accounts for more than half of the reported mutated alleles [17]. This mutation is located on exon 5, one of the alternatively spliced exons, and thus some but not all protein isoforms are compromised. To evaluate the phenotype of this mutation, a mouse model in which exon 5 had been excised was constructed [18]. The homozygous exon 5-deleted mice did not show any apparent phenotype in the retina.

In this context, to shed light on CERKL physiological role and the *in vivo* consequences of its mutations, we aimed to generate a full knockout *Cerkl*<sup>−/−</sup> mouse model by targeted deletion of the reported promoter and the first exon, according to the knowledge at that time. However, the use of alternative promoters driving residual transcription in the retina turned our knockout into a knockdown model retaining 30–35% of *Cerkl* mRNA isoforms, all of them lacking the first exon and initiating methionine. The homozygous exon 1-deleted *Cerkl*<sup>−/−</sup> mice show increased levels of retinal stress and apoptosis, and diminished expression of the ganglion cell marker *Brn3a*, but no gross morphological retinal alterations. Most interestingly, the electroretinographic changes observed in the oscillatory potential waveforms are in accordance with the reduced levels of *Cerkl* mRNA and *Brn3a* protein levels in the retina of the KO mice.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animal handling, tissue dissection and preparation of samples

Murine tissue samples were obtained from *Cerkl*<sup>+/+</sup> and *Cerkl*<sup>−/−</sup> C57BL/6J background mice. All procedures were performed according to ARVO statement for the use of animals in ophthalmic and vision research, as well as the regulations of the Animal Care facilities at the University of Barcelona. Animals were euthanized with CO<sub>2</sub> followed by cervical dislocation. Specific tissues and organs were dissected and immediately frozen in liquid nitrogen.

### 2.2. Generation of the knockout *Cerkl*<sup>−/−</sup> mouse model

The strategy, the generation of targeting constructs, initial ES cell screening, breeding, housekeeping and molecular genotyping of all the mice after the G0 generation as well as the crosses to obtain the knockout animal model have been performed in our lab. ES transfection, handling, and the generation of chimeric embryos for the obtention of the founder mouse *Cerkl*<sup>+/−</sup> were performed by GenOway (Lyon, France). A diagram of the targeted locus is depicted in Fig. 1A. In brief, the genomic sequences corresponding to the 5' and 3' flanking regions of the *Cerkl* promoter and exon 1 were amplified from 129/SvPas genomic DNA. These sequences were referred as long (region before exon 1) and short (intron 1) arms of homology (LA and SA). Several sub-cloning steps were performed to obtain the final targeting vector using pPCR-Script SK (+) vector (Stratagene). The first step consisted in the addition of a loxP site into LA. A synthetic exon 1 construct with new restriction sites (GeneArt) was used to clone the amplified SA fragment. A Neomycin resistance gene (NEO) flanked by two FRT and one loxP sites were also introduced into SA. Finally, both homology arms were cloned together and the negative selection cassette, DTA (Diphtheria Toxin A), was added. The resulting targeting vector stretched 15384 bp, was fully validated by sequencing, and was electroporated into 129Sv ES cells. Positive selection was performed 24 h after electroporation by adding geneticin (200 µg/ml), and more than 1000 geneticin-resistant clones were isolated and amplified. After PCR screenings for recombination at the 5' and 3' flanking regions, a total of 14 clones were obtained. Those were characterized by Southern Blot using two different probes, 5'

probe and 3' probe (Fig. 1B). Only 5 clones had recombined at the correct sites. ES positive cells were used for C57BL/6J blastocyst injections and led to the generation of 9 male chimeras displaying a chimerism rate ranging from 50 to 80%. Highly chimeric males (80% chimerism) were mated with C57BL/6J Flp-deleter females to allow the excision of the NEO selection cassette. Pups were genotyped, and those that presented the excision of the cassette were bred with wild-type C57BL/6J. The first generation of floxed mice was obtained by mating 2 heterozygous floxed males with C57BL/6J Cre-deleter females to allow the germline excision of the floxed region. Mice were subsequently bred with C57BL/6J mice for a total of 5 generations and pups were genotyped by PCR from tail or ear samples.

### 2.3. Genotyping by Southern blot and PCR

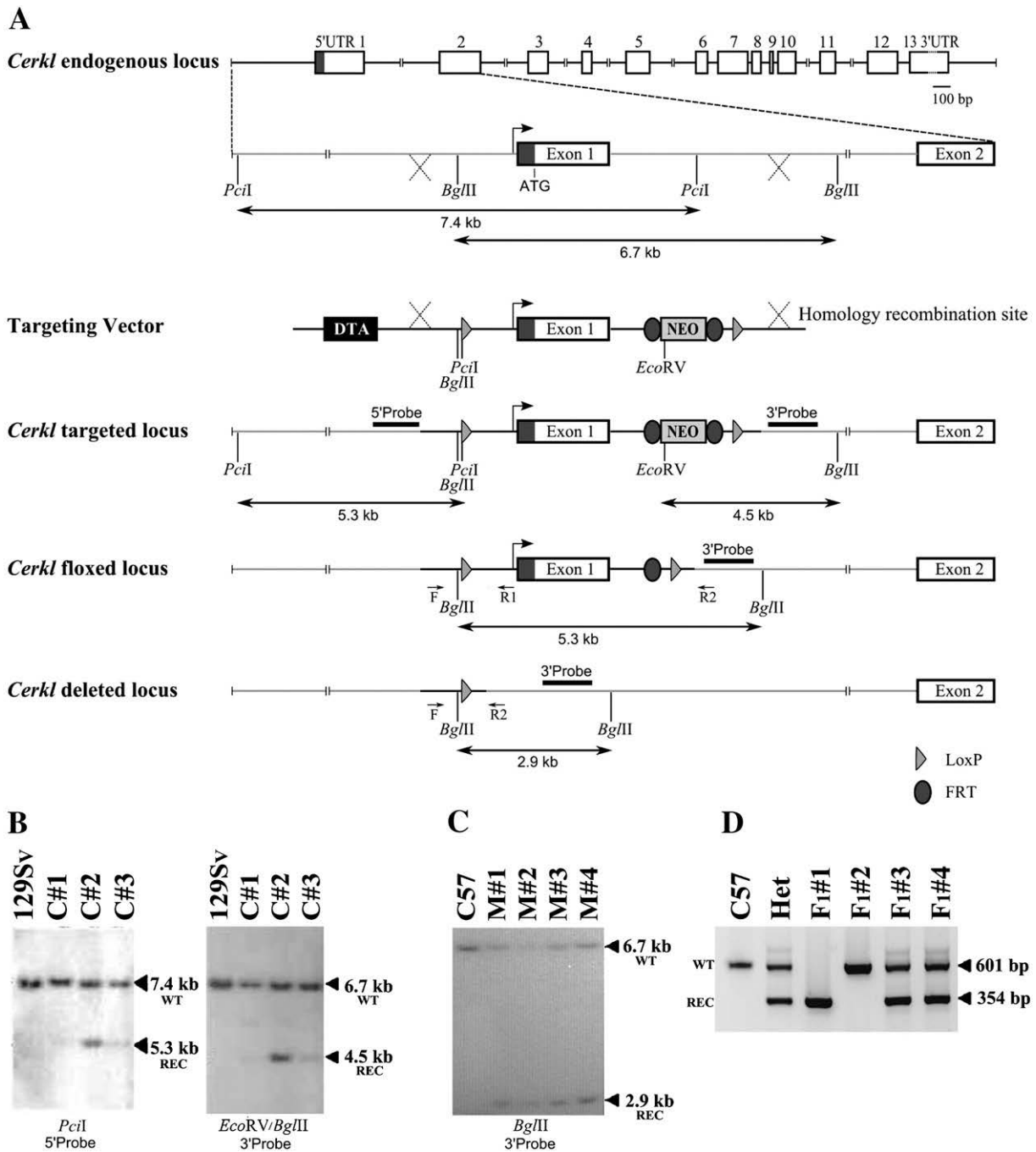
Genomic DNA from ES cells growing after double positive–negative selection was obtained by standard protocols, after a mild lysis, overnight proteinase K digestion and nucleic acid precipitation with ethanol. Ten micrograms of DNA were digested with informative restriction enzymes, separated by agarose electrophoresis and transferred to Nylon membranes. Standard protocols for pre-hybridization, hybridization with <sup>32</sup>P-labeled probes (whose position is indicated in Fig. 1A) were used. Autoradiographic exposition and image acquisition were performed with BioRad Molecular Imager FX Pro Plus (Bio-Rad, Hercules, CA). Three PCR genotyping primers (Fw, Rv1 and Rv2, sequences in Table 1) were used at the same time to allow genotyping of the WT and the floxed alleles in a single reaction (Fig. 1D). The PCR reaction included a first denaturing step of 120 s at 94 °C, followed by 35 cycles of 94 °C for 20 s, 59 °C for 30 s, and 72 °C for 60 s.

### 2.4. RNA extraction and RT-PCRs

Twenty-five milligrams of each frozen mouse tissue were homogenized using a Polytron PT 1200 E homogenizer (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland). For total RNA extraction, High Pure RNA Tissue Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) was used, following the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified using the nanoquant plate in an Infinite 200 microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland).

The RT-PCR assay was carried out with the Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) performed following the manufacturer's protocol, using 200 ng of mouse total RNA. For tissue expression analysis all reaction mixtures (50 µl) contained 10 µM of each primer pair, 2 µM of dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 U of *GoTaq* polymerase (Promega, Madison, WI). A pair of primers was used to amplify mouse *Gapdh* (Table 1) to compare and normalize the samples. Two-step PCR conditions were as follows: 120 s at 94 °C and 30 cycles of 94 °C for 20 s and 63 °C for 120 s. Mouse *Cerkl* expression was detected with primers mRT\_F and mRT\_R (a first denaturing step of 120 s at 94 °C, followed by 35 cycles of 94 °C for 20 s, 60 °C for 30 s, and a final extension step at 72 °C for 20 s). The characterization of the different alternative promoters was performed on cDNAs using a forward primer located in each promoter (NeuroD1\_F, UTR\_F, 3a\_F and 3b\_F) and the same reverse primer in exon 12 mRT\_R (Table 1). Primers were designed to share the melting temperatures and optimized for the same amplification conditions: 120 s at 94 °C followed by 40 cycles of 94 °C for 20 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 90 s. Oligonucleotide sequences are listed in Table 1 and their localization is depicted in Supplementary Fig. 1.

Real-time PCR was performed using the SYBR Green I Master assay in a LightCycler480 (Roche, Indianapolis, IN). Specific primers in different exons were designed to generate an amplicon of approximately 100 bp. Oligonucleotide sequences are listed in Table 1. The expression of *β-2-microglobulin* was used for normalization and comparison to *Brn3a* and *Gfap* target genes. For each real-time PCR reaction, 2 µl of cDNA (diluted 1:5), 1 µM of each primer, 1 × master mix and H<sub>2</sub>O were mixed in a final volume of 10 µl. The reaction was pre-incubated for



**Fig. 1.** Targeting of the *Cerkl* locus. (A) Schematic representation of the *Cerkl* locus (drawn to scale), the region of interest encompassing the proximal promoter and first exon, the targeting vector and the targeted, floxed and deleted loci. *Cerkl* exons, Southern blot probes, restriction sites, oligonucleotides for genotyping are depicted. The targeting vector contained the diphtheria toxin A (DTA) and neomycin resistance (NEO) genes, the latter flanked by two direct FRT target sites (dark gray ellipses). Two direct loxP sites (light gray triangles) are at the boundaries of the proximal promoter, exon 1 and the NEO cassette. Mice carrying the *Cerkl*<sup>neo</sup> allele were crossed to a transgenic CMV-Flp recombinase strain to generate the *Cerkl*<sup>lox</sup> heterozygotes, which were subsequently crossed with a CMV-Cre strain to obtain the *Cerkl*<sup>-/-</sup> chromosome. (B) Southern blot analysis of targeted ES cells. External probes at 5' and 3' were used to verify homologous recombination. Digestion with *PciI* hybridized with the 5' probe showed the WT (7.4 kb) and recombinant (5.3 kb) alleles, whereas digestion with *EcoRV* and *BglII* with the 3' probe produced 6.7 kb (WT) and 4.5 kb (recombinant) bands in clones C# 1, 2 and 3. (C) Southern blot of the *Cerkl*<sup>+/-</sup> mice after the *BglII* digestion. The bands observed correspond to WT (6.7 kb) and KO recombinant (2.9 kb) alleles of 4 different heterozygous mice (M# 1, 2, 3 and 5). (D) PCR analysis of the first generation mice obtained after breeding two *Cerkl*<sup>+/-</sup>. Primers F, R1 and R2 were used in the same PCR reaction. The wt allele produced a band of 601 bp (amplified by F and R1), while the recombinant knockout allele generated a 354 bp band (amplified by F and R2). PCR conditions did not allow the amplification of the band corresponding to the WT allele using the F and R2 primers (2.6 kb).

5 min at 95 °C, then set at 45 cycles in a three-step program: 10 s at 95 °C, 15 s at 62 °C and 10 s at 72 °C. Four replicates were carried out per sample (containing the pooled retinas of at least three different animals), together with their corresponding negative controls. Relative quantification of each gene transcription level was performed using the second-derivative maximum method (LightCycler 480 software, ver. 1.5.0; Roche).

## 2.5. *In situ* hybridization and immunohistochemistry on mouse retina cryosections

Eye cups from 2 to 12 month-old WT and KO mice were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 2 h at room temperature (RT), washed, and cryoprotected in sucrose at 4 °C (successive incubations at 20% for 30 min, 30% for 30 min and 40% sucrose for 12 h). Eye cups were

**Table 1**  
Sequences of *Cerkl* primers used in the PCR reactions.

Name	Forward primer sequence (5' → 3')	Name	Reverse primer sequence (5' → 3')
<i>Cerkl</i> and <i>Gapdh</i> tissue expression			
<i>Gapdh</i> _F	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTGG	<i>Gapdh</i> _R	CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC
mRT_For	CTGACTGTGGTGGTCACTGG	mRT_Rev	GAACCTCTGATGCAGCTTCC
NeuroD1_F	TCAATTTTCCCTTTGTGGAGAC		
UTR_F	TGTAGCCACACTTCTTCCCA		
3a_F	GTTTTGCTGCGTGGCATCTTC		
3b_F	GACGCATCCAGCCCGAGC		
<i>Riboprobes</i>			
Rho_F	GCCCTTCTCCAACGTACAG	Rho_R	GCAGCTTCTGTGCTGTACGG
mRT_For	CTGACTGTGGTGGTCACTGG	mRT_Rev	GAACCTCTGATGCAGCTTCC
<i>Real Time PCR</i>			
$\beta$ 2M_F	GTCTTCTGCTGCTTGTCTCAC	$\beta$ 2M_R	CGTAGCAGTTCAGTATGTTCCG
Gfap_F	CGCTGGAGGAGGATCCCA	Gfap_R	ACATCCATCTCCACGTGGACC
Brn3a_F	CCACCTCCCTGAGCACAAGTA	Brn3a_R	CAGGCTGGCGAAGAGGTTGC
<i>Genotyping</i>			
F	ACACATTAGAAGCCCTGAAGGA	R1	TCITTGTGCTAGCAGTGACC
		R2	TTGCTGTTAATCCAGTTGCTCT

then embedded in O.C.T (Tissue-Tek, Sakura Finetech, Torrance, CA) and sectioned at  $-17^{\circ}\text{C}$ .

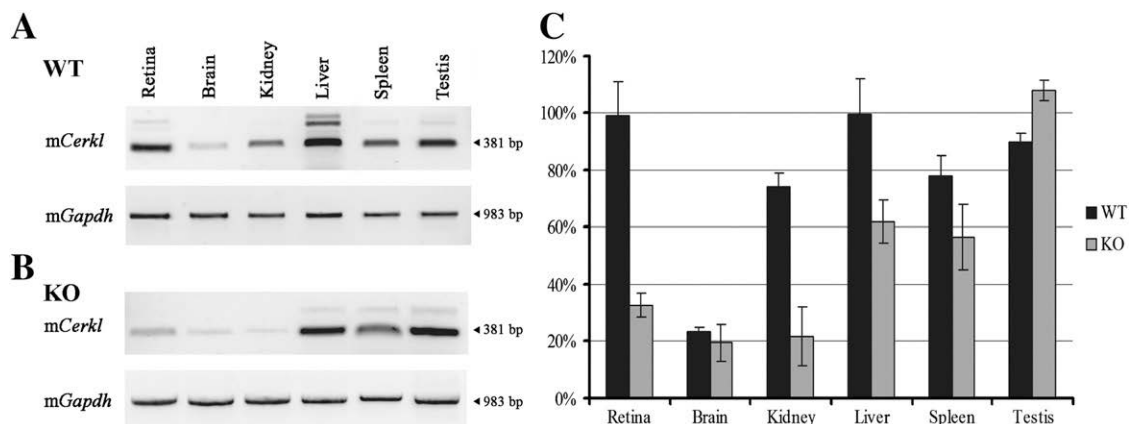
For *in situ* hybridization, 20  $\mu\text{m}$  sections were recovered on poly-lysine covered slides, dried at RT (30 min), rinsed twice with phosphate-buffered saline (PBS) (10 min), treated with 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  proteinase K for 15 min at  $37^{\circ}\text{C}$ , washed twice for 5 min with PBS, and postfixed with 4% PFA. The hybridization was performed as described previously [6] with some modifications: two steps of acetylation with 0.1 M triethanolamine-HCl (pH 8.0) containing 0.25% acetic anhydride and 0.5% were performed (5 min each). The BM Purple AP Substrate (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) reagents were used. Sections were cover-slipped with Fluoprep (Biomérieux, France) and photographed using a Leica DFC Camera connected to a Leica DM IL optic microscope (Leica microsystems, Germany).

For immunohistochemistry, 14  $\mu\text{m}$  sections were recovered on poly-lysine covered slides, dried for 1 h, washed in PBS ( $3 \times 10$  min), and blocked in blocking solution (PBS containing 2% Donkey Serum, 0.2% Triton X-100) at RT (60 min). Incubation with primary antibodies was performed overnight at RT in blocking solution. Sections were rinsed three times in PBS again, followed by incubation with the corresponding secondary antibodies conjugated to either Cy2 or Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) (1:200) at RT (90 min) in blocking solution too. After 3 washes,

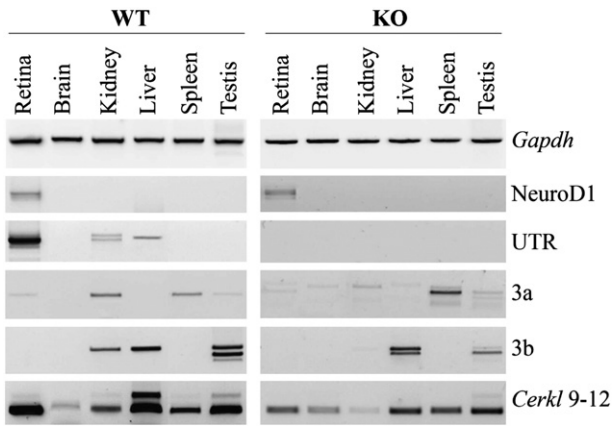
sections were incubated with DAPI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) for 10 min and washed in PBS ( $3 \times 10$  min). Sections were cover-slipped with antifading reagent and photographed with a confocal microscope (LEICA TCS-SP5, Wetzlar, Germany). Primary antibodies and dilutions used were: 1:50 for Goat anti-Brn3a (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA); 1:200 for mouse anti-Rhodopsin (BIOTREND Chemikalien GmbH, Cologne, Germany); 1:200 for rabbit anti-PAX6 (Covance, Princeton, NJ) and rabbit anti-blue Opsin, 1:400 for rabbit anti-red/green opsin (Millipore, Billerica, MA); 1:200 for the homemade rabbit anti-CERKL (previously pre-absorbed) and 1:1000 for mouse anti-Calbindin D (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). GFAP immunostaining was performed as described elsewhere [19] on P60 and P280 WT and KO retina cryosections.

## 2.6. Protein level analysis

Retinas from P60 and P365 WT and KO mice were homogenized in RIPA buffer (50 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.25% Na-Deoxycholate, 1% NP40 plus protease inhibitors). Thirty micrograms of protein were loaded onto 12.5% acrylamide gels. Western blots were performed as described previously [16]. Primary antibodies were used at the following dilutions: 1:8000 mouse anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO); 1:2500 mouse anti-Rhodopsin and 1:2000 mouse anti-



**Fig. 2.** Semi-quantitative expression analysis of *Cerkl* in wild-type and knockout mice. RT-PCR expression in several tissues of *Cerkl*<sup>+/+</sup> (A) and *Cerkl*<sup>-/-</sup> (B) mice, using primers mRT\_F and mRT\_R, located in exons 9 and 12, respectively, and contained in all isoforms. Primer sequences are provided in Table 1. The amplicon size is indicated for each case. (C) Semi-quantitative analysis of *Cerkl* expression in *Cerkl*<sup>+/+</sup> and *Cerkl*<sup>-/-</sup> mice. Maximum wild-type *Cerkl* levels were arbitrarily set as 100% (liver). At least three independent replicates were performed. *Gapdh* expression was used for normalization. Significant decreased expression is observed in all KO tissues except brain.

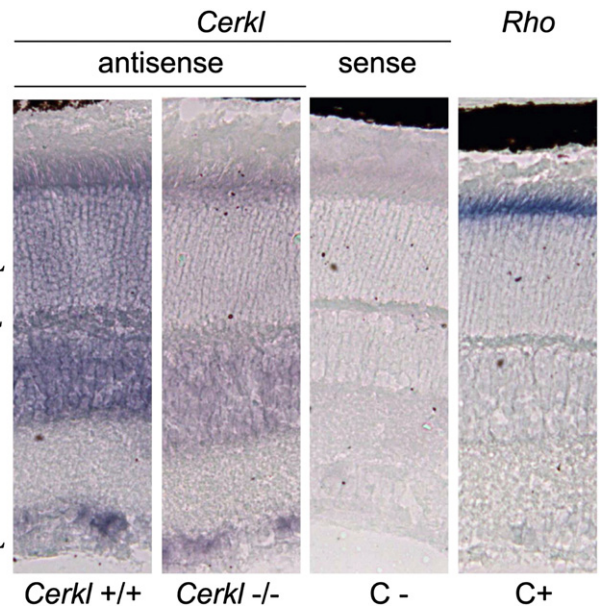


**Fig. 3.** Remnant *Cerkl* expression in the KO mouse is attained by the use of tissue-specific alternate promoters. RT-PCRs were performed on wild-type and KO murine samples to determine the activity of alternate *Cerkl* promoters in different tissues. Different specific forward primers located at each of the transcription start sites previously identified (*NeuroD1* UTR, *Cerkl* UTR, 3a and 3b) were used in combination with the same reverse oligonucleotide in exon 12. Overall *Cerkl* expression was assessed by amplification of a common region to all isoforms (*Cerkl* 9–12). *Gapdh* was used for normalization. Primer sequences are provided in Table 1.

GAPDH (Abcam, Cambridge, UK); 1:2000 mouse anti-PKC $\alpha$ , 1:500 goat anti-RDS, 1:1000 goat anti-Brn3a (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA); 1:2000 rabbit anti-PAX6 (Covance, Princeton, NJ); 1:2500 mouse anti-GFAP, and 1:2000 rabbit anti-green Opsin and anti-blue Opsin (Millipore, Billerica, MA). Alpha-Tubulin and GAPDH levels were used as normalization controls. Semi-quantification of the bands was carried out using the Quantity One Software (Bio-Rad, Hercules, CA). Statistical significance was analyzed by the Mann–Whitney and t-Student tests.

### 2.7. TUNEL analysis

Twelve micrometer thick cryostat sections of P60 animals were rinsed in PBS, fixed in ethanol and acetic acid (2:1) for 5 s at  $-32^{\circ}\text{C}$ , then rinsed with PBS and incubated in PBS with 0.2% Triton X-100 and 0.1% Sodium citrate for 15 min. After washing, retinal sections were incubated in TUNEL buffer (30 mM Tris·HCl pH 7.2, 140 mM sodium cacodylate, 1 mM  $\text{CoCl}_2$ , 0.3% Triton-X-100) for 30 min and terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT) (800 U/ml) and biotinylated dUTP (1  $\mu\text{M}$ ) (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) were added and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$ . The reaction was terminated with  $\text{SCC}\times 1$  buffer and rinsed with PBS. Incubation with goat anti-Brn3a (1:50) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) was performed overnight at room temperature. After washing in PBS, retinal sections were again incubated in a solution containing the secondary antibody anti-goat Cy3 and streptavidin conjugated to Cy2 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, 1:200 each) for 1 h and 30 min at room temperature. The nuclei were counter-stained with DAPI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) and rinsed with PBS. Sections were cover-slipped with antifading reagent and photographed with a confocal microscope (LEICA TCS-SP5, Wetzlar, Germany). A similar protocol was followed for whole-mount preparations.



**Fig. 4.** *Cerkl* *in situ* hybridization on WT and KO mouse P60 retinas. (A) Representative images (equivalent results in at least three independent replicate animals) of *in situ* hybridizations with the antisense *Cerkl* probe on *Cerkl*  $+/+$  (WT) which labels the GCL, INL and more moderately, the inner photoreceptor segment (dark purple staining). Note that the second panel with the *Cerkl*  $-/-$  (KO) retinas shows a much fainter signal in the GCL, INL and the inner photoreceptor segment (light purple staining). Negative control with the sense *Cerkl* probe (C–) and positive control with the antisense *Rhodopsin* probe (C+), which strongly labels the inner photoreceptor segment, are also shown for comparison. PhR— Photoreceptor cell layer; ONL— outer nuclear layer; OPL— outer plexiform layer; INL— inner nuclear layer; IPL— Inner plexiform layer; GCL— ganglion cell layer.

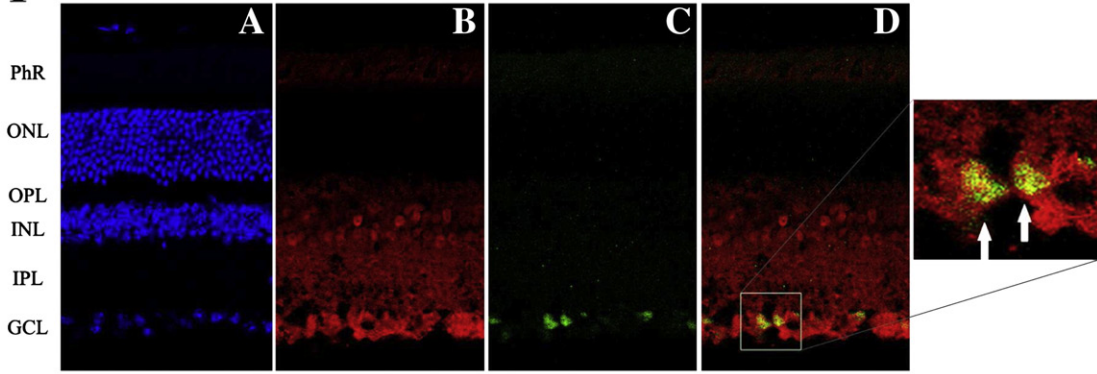
### 2.8. Electroretinography

Prior to ERG recording, mice were adapted to the dark overnight. Then, mice were anesthetized under dim red light by i.p. injecting a solution of ketamine (95 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) and maintained on a heated pad at  $37^{\circ}\text{C}$ . Pupils were dilated by topical application of 1% tropicamide (Alcon, Spain) and flash-induced ERG responses were recorded from both eyes in response to light stimuli produced with a Ganzfeld stimulator. The recording protocol consisted of dark-adaptation for 20 min, after which scotopic ERG, maximum ERG, and dark-adapted oscillatory potentials (OPs) were recorded. After the dark-adapted ERGs, the eyes were light-adapted for 10 min, and the photopic ERG and 30-Hz flicker ERG were recorded. The outcome measures were the response amplitudes and implicit time of each ERG component.

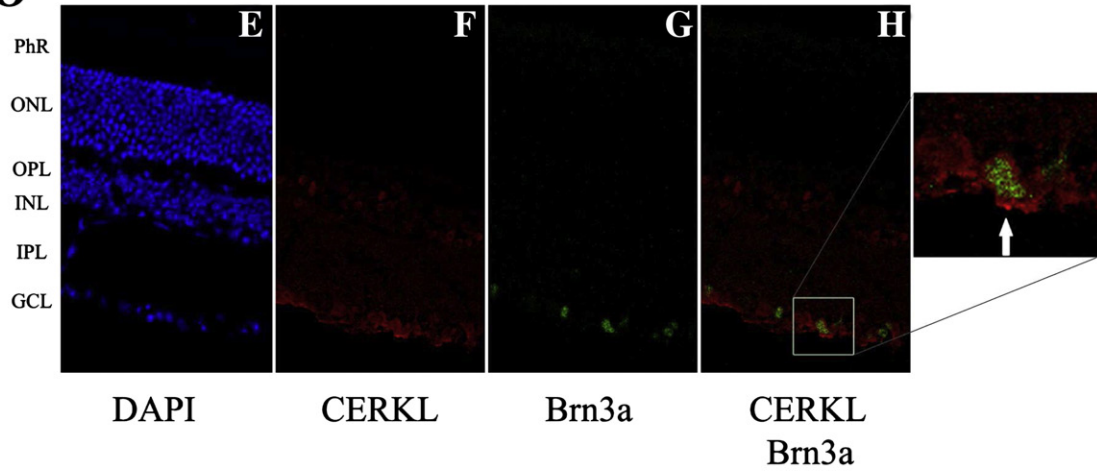
The ERG complied with International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) standards [20]. Kruskal–Wallis and Mann–Whitney *U* tests were used to estimate the level of significance for the difference in the ERG parameters among the study groups as appropriate. The ERG signals were amplified and band filtered between 0.3 and 1000 Hz with a Grass amplifier (CP511 AC amplifier, Grass Instruments, Quincy, MA, USA). Electrical signals were digitized at 10 kHz with a Power Laboratory data acquisition board (ADI

**Fig. 5.** CERKL, Brn3a and Calbindin immunohistochemistry of WT and KO retinas. Fluorescent immunodetection of CERKL, Brn3a (ganglion cell layer marker), Calbindin (amacrine cell marker) and DAPI (nuclear staining) on 14  $\mu\text{m}$  sections from P60 C57BL/6J and *Cerkl*  $-/-$  retinas. Photographs were taken in the central retina for comparison. A–D and I–L) WT retinas. E–H and M–P) KO retinas. The CERKL polyclonal antibody (B, F, J and N) reveals a fainter staining in the GCL, INL and the inner photoreceptor segment in the KO vs the WT retinas. The ganglion Brn3a (C and G) and amacrine Calbindin (K and O) cell markers were used. D, H, L, and P are the corresponding merged images. Magnifications of significant parts of Brn3a/CERKL and Calbindin/CERKL merged images are shown at the most right panels. White arrows indicate colocalization of Brn3a and CERKL in the GCL layer (D and H), and Calbindin and CERKL (L and P) in amacrine cells of INL and GCL. PhR— Photoreceptor cell layer; ONL— outer nuclear layer; OPL— outer plexiform layer; INL— inner nuclear layer; IPL— Inner plexiform layer; GCL— ganglion cell layer.

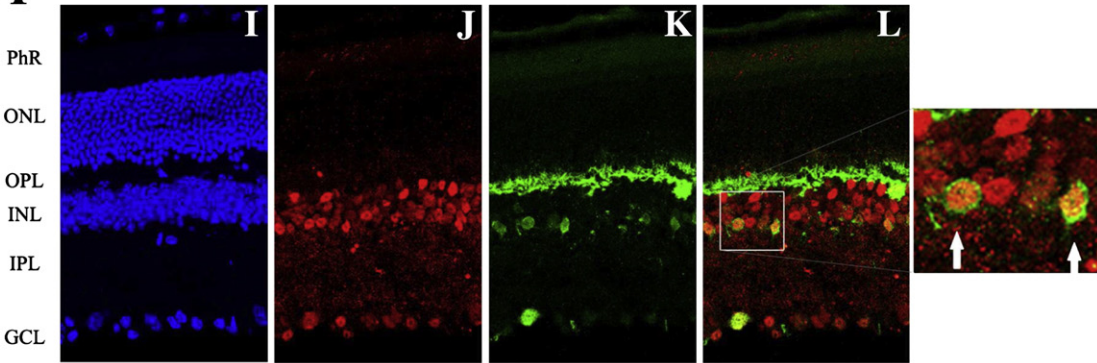
**WT**



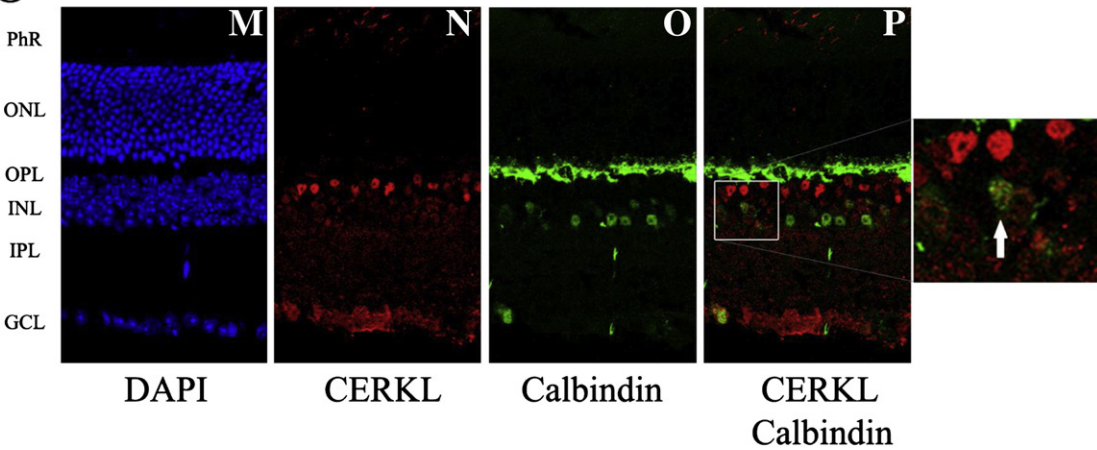
**KO**



**WT**



**KO**



Instruments, CA, USA). Bipolar recordings were obtained using an Ag/AgCl mouse electrode fixed on a corneal lens (Burian–Allen electrode, Hansen Ophthalmic Lab., IA, USA), a reference electrode located in the mouth, and with a ground electrode located on the tail. The electrode was mounted on a coarse micromanipulator for easy positioning over the mouse eye. Impedance of active and reference electrodes were less than 20 k $\Omega$ .

### 3. Results

#### 3.1. *Cerkl* deletion of exon 1 and upstream sequences

The gene targeting strategy resulted in the cre-mediated excision of a genomic region of 2.3 kb encompassing the first *Cerkl* exon and the beginning of the first intron, plus 1.2 kb of upstream sequences that stretched the reported promoter (Fig. 1A). Our strategy included a first step of FLP-mediated excision of the neo<sup>R</sup> selection gene in the 129/Sv ES cultured cells. All the homologous recombination events performed in the ES cells were assessed by Southern blot analysis (Fig. 1B) using informative restriction enzyme sites and probes specific for the 5' and 3' events, depicted in Fig. 1A. Positive clones for the two recombinant events were further confirmed by specific PCR and sequencing, and subsequently used to colonize C57BL/6J blastocysts. Two chimaeric males were obtained and bred to obtain the first heterozygous animals (Fig. 1C), which after successive crosses produced the homozygous null *Cerkl*<sup>-/-</sup> offspring at the expected mendelian ratio (1:4). Genotyping of tail or ear samples from pups was performed by a single PCR assay (primers indicated in Fig. 1A and Table 1) that allowed the simultaneous amplification of the wild-type and floxed knockout alleles (Fig. 1D) (see Material and methods for details).

#### 3.2. Assessment of *Cerkl* expression in knockout animals

To assess the abolishment of *Cerkl* expression in the knockout mice, we performed an RT-PCR assay using primers located at the 3' end of the cDNA, a region common to all the *Cerkl* isoforms reported so far. Contrary to our expectations, the deletion of the reported promoter did not completely abrogate *Cerkl* expression, as a faint band could be observed in retina. These surprising results prompted us to assess the levels of expression in several tissues of the knockout versus the wild-type counterparts (Fig. 2A and B).

A semi-quantitative analysis of these results revealed a 65% decrease of *Cerkl* levels in the KO retinas supporting a knockdown model more than a complete knockout (Fig. 2C). Notably, this decrease in *Cerkl* mRNA levels was not homogenous for all tissues, indicating that other promoters, showing tissue specificity, contribute to the final *Cerkl* levels, which is in agreement with recent results showing that at least 3 additional promoters drive *Cerkl* expression in mouse and human [17].

Moreover, a multiple band pattern was observed in some tissues, such as retina, liver, spleen and testis. These bands were excised and sequenced, and correspond to alternatively spliced transcript isoforms, also in agreement with previous data [17].

Once the different *Cerkl* promoters had been identified, we aimed to assess the contribution of each one to the levels of *Cerkl* expression in the different tissues of the KO mice compared to the wild-type controls. Indeed, as expected by the design of the targeting and the genotyping of the KO mice, no transcripts from the reported *Cerkl* promoter were observed in any tissue (Fig. 3, UTR). Concerning the expression of *Cerkl* in the KO retina, residual transcription from the upstream *NeuroD1* gene and internal *Cerkl* 3a promoters can be detected at similar levels than the WT retinas, accounting for the 30–35% of the total *Cerkl* transcripts (Figs. 2 and 3). The major isoforms in *Cerkl*<sup>-/-</sup> retinas are two transcripts starting at *NeuroD1* and one from the internal 3a promoter, indicated with a symbol (#) in the Supplementary Fig. 1.

Although no compensatory transcriptional activation from the alternative promoters in the KO tissues was detected, moderate transcriptional differences were observed, such as decreased expression in kidney and testis from 3a and 3b, increased expression in spleen, and specific isoform patterns in liver and testis (Fig. 3).

#### 3.3. Morphological analysis of the KO retina

Retinal sections of KO mouse obtained at 2, 4 and 12 months stained with hematoxylin/eosin did not show any gross morphological differences neither in the cell layer organization, nuclei density or photoreceptor outer segment length, when compared to WT animals of the same age (Supplementary Fig. 2A). Nuclear counts after staining with DAPI visualized in the confocal microscopy did not reveal any significant difference in the density and distribution through all the layers at four different retina eccentricities (Supplementary Fig. 2B).

The localization of *Cerkl* expression products was then addressed to assess possible differences in intensity/distribution throughout the retinal cell layers. To this aim, *in situ* mRNA hybridization was performed with a riboprobe against the shared RNA region of all isoforms (stretching exons 8 to 12), using *Rhodopsin* antisense and *Cerkl* sense riboprobes as positive and negative controls, respectively. In agreement with previous findings, WT endogenous *Cerkl* is mainly detected in the GCL, and moderate expression at the inner segment of photoreceptors (PhR) and the INL (Fig. 4). As expected, *Cerkl* mRNA levels is decreased in the retina of the KO mouse, as shown by a considerable decrease in hybridization intensity compared to the WT controls, treated and stained under the same conditions and time (Fig. 4). Notably, the more prominent decrease is observed in the GCL, followed by the INL and much less in the PhR, indicating that there is not a homogeneous decrease in *Cerkl* expression.

#### 3.4. Immunolocalization of CERKL

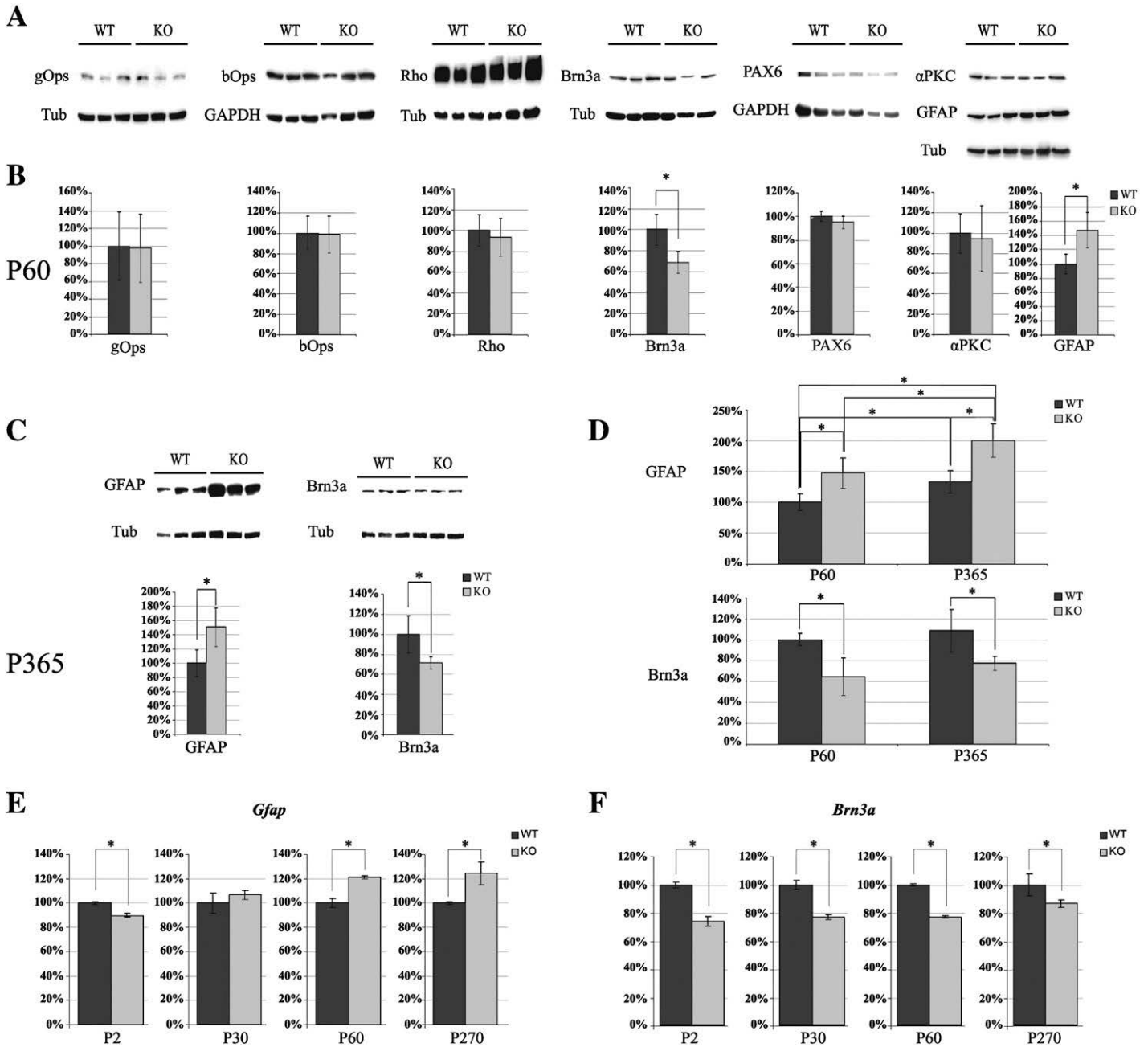
Immunodetection of adult mouse retinas with an in-house anti-CERKL polyclonal antibody (raised against a peptide encoded in mouse *Cerkl* exon 2) indicated that CERKL localized in the GCL, INL, and PhR (Fig. 5). In photoreceptors and INL cells, CERKL was shown to be exclusively located in the cytoplasm and no nuclear staining was observed in these cell types, as it has been described before [21]. A fainter staining in the GCL, INL and the photoreceptor layer with our CERKL polyclonal antibody was observed in the KO retinas. Immunohistochemical stainings using antibodies against Brn3a and Calbindin, specific retinal cell markers, showed cytoplasmic colocalization of CERKL with a population of ganglion and amacrine cells but no apparent change in the number and/or distribution of stained cells (Fig. 5). A similar analysis with the retinal cell marker PAX6 did not show any expression pattern alteration either (Supplementary Fig. 3). *Cerkl*<sup>-/-</sup> mouse retinas did not show any sign of rod and cone degeneration after rhodopsin/opsin immunostaining, even at 12 months of age (data not shown). Besides, the photoreceptor outer segment length (average ~22  $\mu$ m), diameter and density were preserved, consistent with neither photoreceptor degeneration nor apoptosis (data not shown).

Given that no clear signals of apoptosis were detected in the *Cerkl*<sup>-/-</sup> retinas, and that previous results from our group showed that over-expression of CERKL protected cells against oxidative stress injuries [16], we searched for other signals of retinal stress. Glial fibrillary acid protein (GFAP) expression is usually restricted to Müller cell endfeet in the inner limiter membrane [19], but its expression is increased and may extend to other retinal cell layers upon aging and retinal stress. Immunohistochemistry analysis on P60 and P280 WT and KO retinas was performed. Differences in GFAP distribution and expression between WT and KO retinas were very slight, although the expected increase of GFAP with age was clearly detectable in both WT and KO retinas (Supplementary Fig. 4).

3.5. Retinal protein marker expression in KO retinas

To assess the effects of the diminished *Cerkl* expression on several retinal markers, indicative of structural/functional alterations in retinal cell layers, we performed a semi-quantitative immunodetection on Western blots in P60 WT and KO retinal lysates. Markers of the functional status of: cones and rods (green opsin, blue opsin and rhodopsin), ganglion (Brn3a), amacrine/ganglion (PAX6) and bipolar ( $\alpha$ -PKC) cells, and retinal stress (GFAP) were immunodetected and analyzed (Fig. 6A).

Notably, a statistically significant decrease of Brn3a, but not of PAX6 was detected (Fig. 6B), which indicates a perturbed structural/functional status of the ganglion cells, rather than amacrine cells. Moreover, the GFAP expression is clearly increased, revealing higher levels of retinal stress in the *Cerkl*  $-/-$  animals. These results prompted us to analyze the evolution of these altered expression levels with age (Fig. 6C). In one-year (P365) aged animals, the decrease of Brn3a expression remains consistent and at comparable levels than those of P60 mice. Concerning GFAP, relative differences between WT and KO retinas are



**Fig. 6.** Semi-quantification by Western blot of retinal proteins in WT and KO mice. (A) Thirty micrograms of P60 protein lysates of WT and KO mice retinas was immunodetected with antibodies against the green and blue opsins, rhodopsin, GFAP, Brn3a, PAX6 and  $\alpha$ -PKC proteins. Tubulin and GAPDH were used as controls for normalization. (B) Semi-quantified proteins are depicted in the histograms. For each age, WT levels were considered as 100%. Only GFAP and Brn3a showed significant differences (\*  $p < 0.05$ , t-Student). (C) Immunodetection and quantification of GFAP and Brn3a markers in lysates of P365 WT and KO mice retinas. For each age, WT levels were considered as 100%. (D) Expression of GFAP and Brn3a at P60 (100%) and P365 between WT and KO. GFAP levels were increased in aged animals, although the ratio WT/KO appears to be maintained (45–50%) (\*  $p < 0.05$ , t-Student). No statistically significant differences were observed in Brn3a levels between P60 and P365 animals. (E and F) Quantitative RT-PCR assessment of *Gfap* (E) and *Brn3a* (F) transcriptional levels in WT and KO retinas at P2, P30, P60 and P270.  $\beta$ -2-microglobulin levels were used for normalization between samples. For each age, WT levels were considered as 100%. Each value contained the mRNA of at least three different animals, and at least four different replicates were analyzed for each point (\*  $p < 0.05$ , t-Student).

also maintained at the same level (around 50% increase), and indeed, GFAP levels increase proportionally in the two groups due to aging (Fig. 6D).

To further support the decrease of Brn3a and increase of GFAP expression in WT and KO retinas, we assessed the levels of transcription of their corresponding genes by quantitative RT-PCR, including  $\beta$ -2-microglobulin as a normalization control. In addition, to test whether these differences in expression were constitutive or progressive during retinal development until maturation, several earlier time points (postnatal days 2 and 30) were added to the analysis. The transcriptional analyses reinforced the data gathered by protein levels immunodetection. Thus, KO retinas showed a progressive increase of *Gfap* expression (compared to WT retinas), indicative of more vulnerability to retinal stress with age (Fig. 6E). In contrast, the diminished Brn3a transcription levels appear to be a constitutive trait of the KO retinas, as it is already evident as early as in P2 animals, and the difference with the WT retinas is maintained with age (Fig. 6F).

The fact that no differences are observed in the other protein markers analyzed highlights that the effect on Brn3a and GFAP expression is specific and reflects the altered status of the KO retinas.

### 3.6. TUNEL analysis

To assess whether this altered status of the *Cerkl*<sup>-/-</sup> retinas was also reflected in an increase of cell death, the levels of apoptosis were analyzed by TUNEL staining on whole-mount and retinal sections (Fig. 7A and B, respectively). Twelve retinal regions on the whole-mounts were selected for systematic counting and analysis for each eye from a total of three animals in each experimental group. Increased levels of apoptotic cells (more than two-fold) were clearly observed in the KO vs WT retinas (Fig. 7A), and this increase was statistically significant (Fig. 7C,  $p < 0.01$ ). In order to elucidate whether the observed decrease in Brn3a expression correlated with specific death of the Brn3a subset of ganglion cells, co-immunostaining in retina sections was performed (Fig. 7B). Our results show that apoptosis affects some but is not restricted to Brn3a positive ganglion cells, indicating that the *Cerkl*<sup>-/-</sup> retinal perturbation involves different cell types.

### 3.7. Electroretinographic characterization of the KO retinas

The ERG experiments were performed in 10 C57BL/6J and 12 *Cerkl*<sup>-/-</sup> mice, measured four times at 2–3 months of age and at 3 month intervals until the animals reached 12 months. The ERG did not show significant differences between *Cerkl*<sup>-/-</sup> and WT mice through time in response amplitudes and implicit times neither for scotopic ERG, maximum ERG a- and b-waves, nor for photopic single-flash a-wave and 30-Hz flicker ERG. Interestingly, a significant decrease in the amplitudes of oscillatory potentials (OPs) in the *Cerkl*<sup>-/-</sup> mice was observed (Fig. 8). Although the frequency analysis showed no significant differences in the power spectral density at different frequency bands (0–60, 60–120 and 120–180 Hz) (data not shown), most OP components (OP2–OP4) were significantly reduced in amplitude and increased in implicit time in the KO compared with WT animals ( $P < 0.05$ , Mann–Whitney test). These changes were first seen at P60 and remained consistent at P180 and up to P360, but showed no progression. Most interestingly, the OP/a and OP/b ratios in the KO animals did differ significantly compared to amplitudes measured in age-matched wild-type C57BL/6J mice ( $P < 0.05$ , Mann–Whitney test). Together with the same b/a ratio values in both strains, it could be suggested that the neuronal circuitries of the inner retina are moderately affected in this *Cerkl*<sup>-/-</sup> model.

## 4. Discussion

Mutations in human *CERKL* cause progressive retinal degeneration leading to CRD or RP [1–8]. Despite a close structural similarity with *CERK*, all the attempts to characterize its putative lipid kinase enzymatic activity have failed so far [14–16]. Taking into consideration: 1) the high transcriptional complexity of *CERKL*; 2) the large range of protein isoforms, which display different domains; 3) the wide retinal expression pattern of *Cerkl*, not exclusive of photoreceptors; and 4) the highly dynamic nuclear–cytoplasmic protein localization, all together underscore the challenge behind the dissection of the *CERKL* functional role and contribution to retinal dystrophies.

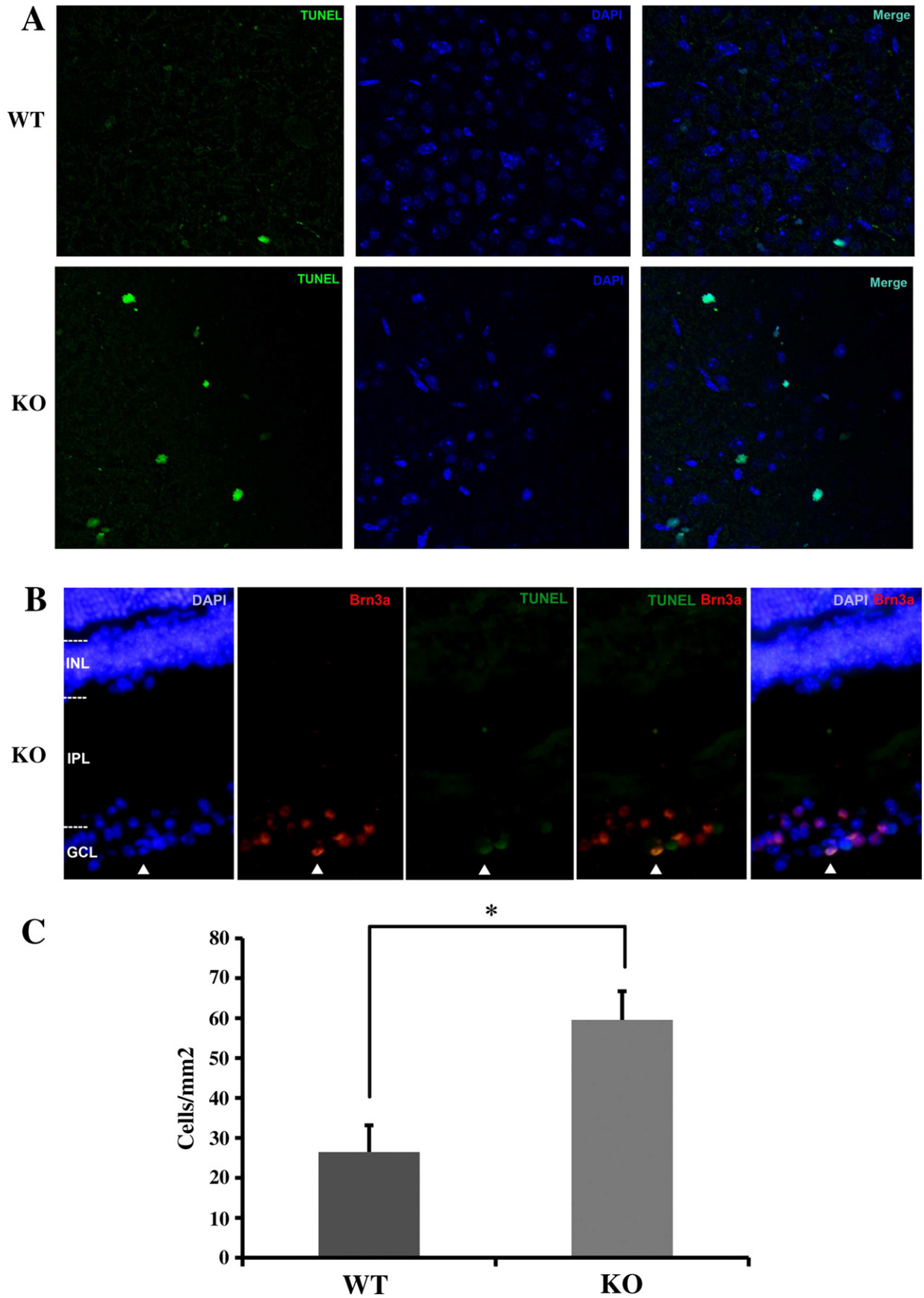
Following the conventional approach for functional analysis of human genes associated to hereditary diseases, we aimed to generate a novel knockout mouse model, *Cerkl*<sup>-/-</sup>. Other authors had previously attempted to emulate the most common mutation allele (R257X) by deleting exon 5, but this model did not show any retinal phenotype nor alterations in the levels of ceramide/C1P in the retina [18]. The lack of ocular phenotype could be explained by the fact that this exon is alternatively spliced and thus, the remaining isoforms could perform some of the *Cerkl* roles [17]. Therefore, we aimed to construct a total knockout model by a loxP/cre-based deletion of the *Cerkl* first exon plus 1.2 kb upstream region that encompassed the proximal promoter and transcriptional initiation site.

Although the gene targeting was successful, *Cerkl* expression could not be completely abrogated. Unfortunately, some basal transcription (around 30–35%) was driven by previously unreported alternative promoters, among them that of *NeuroD1* gene, which accounts for most of the remaining *Cerkl* expression in the KO mice retina. This promoter is located upstream the *Cerkl* gene, transcribes the same DNA strand, and is highly active in the Central Nervous System (CNS). Sequencing revealed that these transcripts started at the 5' UTR first exon of the *NeuroD1* gene, followed by a cryptic intergenic 173-bp exon joined to *Cerkl* exon 2. The fact that this cryptic exon contains several methionines, one of them in frame, supports that some *CERKL* could be present in the KO retina. In this respect, evidences that other *CERKL* initiating methionines could be recognized *in vivo* in other isoforms have already been gathered in human [17]. Indeed, the *Cerkl* isoforms arising from this promoter could explain the mild retinal phenotype, befitting more a knockdown than a knockout model.

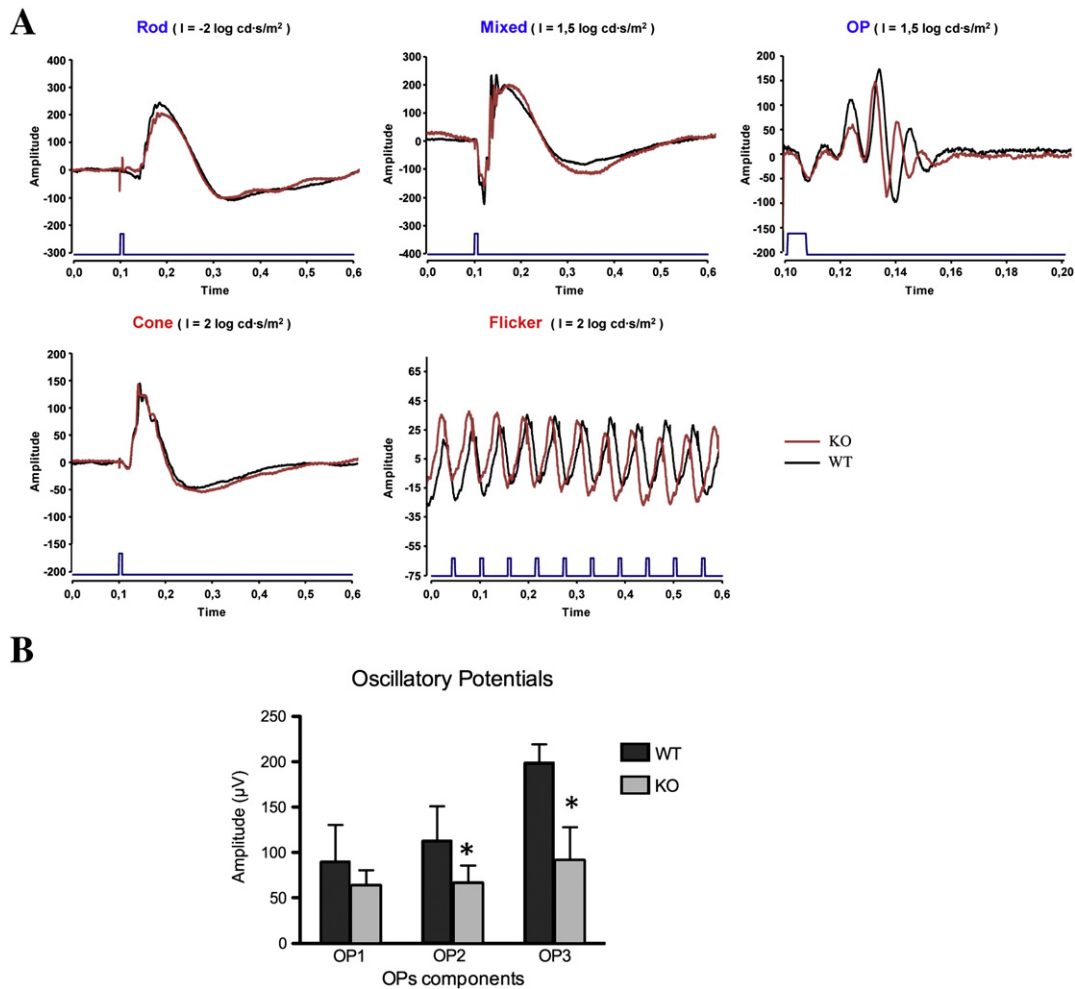
Overall, our results indicate that in the retina the alternative promoters (*NeuroD1* and *Cerkl* 3a and 3b) do not show transcriptional compensatory activity in the KO mice (Fig. 3). However, small differences in the *Cerkl* expression pattern could be detected in other tissues: a slight increase could be detected in testis, and new isoforms were apparent in kidney, liver, and testis. Either the deletion of upstream *Cerkl* sequences or changes in the relative position of the proximal regulatory elements in the floxed allele may account for these differences. Further work is required to assess the validity of these hypotheses.

In our electroretinographic studies, ERG amplitudes and latencies of scotopic a-waves and b-waves, and photopic b-waves in the *Cerkl*<sup>-/-</sup> were not significantly decreased compared to age-matched WT mice, which indicated that the basic pathways of phototransduction and signal transmission in the outer retina were unaffected. However, the consistently observed differences in the OPs (high frequency (90–160 Hz), low amplitude wavelets on the rising edge of the electroretinogram (ERG) b-wave) pointed to functional alterations in the inner plexiform layer (IPL), even though the morphology was preserved.

Multiple cell types in the inner retina – in particular at the IPL [22] – could contribute to OPs, but amacrine and/or ganglion cells are the largest contributors [23,24]. In this context, early and late components of OPs appear to be modulated independently [25,26], and may reflect the functional contribution of these two distinct cell groups. In the KO animals, late OP components (OP3) were significantly reduced in amplitude and increased in implicit time (Fig. 7). Notably, it



**Fig. 7.** Increased apoptosis in the P60 *Cerkl*<sup>-/-</sup> retinas. (A) Nasal region images of TUNEL analyses performed on whole-mount retinas of the *Cerkl*<sup>-/-</sup> (KO) and wild type (WT) animals, focused on the GCL. (B) Double staining of Brn3a and TUNEL positive cells in sections of the *Cerkl*<sup>-/-</sup> (KO) retinas. Arrowheads indicate the colocalization of the different labels in a ganglion cell. Note that neither all TUNEL positive cells are Brn3a positive, nor apoptosis is restricted to Brn3a cells. (C) TUNEL positive cell counts for WT and KO retinas (twelve different regions per retina and three different animals per group). Statistically significant differences (\*  $p < 0.01$ , t-Student test) were observed.



**Fig. 8.** Electretinographic responses from control C57BL/6J (black) and *Cerkl*<sup>-/-</sup> mice (red) at P120. (A) Superimposed response waveforms of various ERG components from one control (black traces) and one *Cerkl*<sup>-/-</sup> mouse (red traces): Rod responses to light flashes of  $-2.09 \log \text{cd s m}^{-2}$  and mixed responses (rod and cone) to light flashes of  $1.57 \log \text{cd s m}^{-2}$  were recorded under dark adaptation. Cone responses (photopic ERG, oscillatory potentials and 30 Hz Flicker) were recorded under light adaptation to light flashes of  $1.57 \log \text{cd s m}^{-2}$ . Horizontal calibration: 100 ms; vertical calibration: 50  $\mu\text{V}$ . (B) Histogram representation of the power spectral density (PSD) (mean and SD) of Oscillatory Potentials measured in C57BL/6J *Cerkl*<sup>+/+</sup> ( $n = 8$ ) and *Cerkl*<sup>-/-</sup> animals ( $n = 8$ ) (\*  $p < 0.05$ , Mann-Whitney test).

has been shown that deletion of *Brn3a* in mouse dramatically alters the dendritic stratification at the IPL, with very moderate ganglion cell loss [27]. Given that dendritic arborization correlates with physiological responses, the decrease of *Brn3a* (apparently constitutive in our model) could be the cause of the observed OP alterations. Therefore, our data favors alteration of ganglion over amacrine cells on the grounds of reduced OP waveforms, decreased expression of *Brn3a* and unperturbed levels of *PAX6* and *calbindin*. We cannot rule out that other retinal cell types might be functionally disturbed, as reflected by the increased apoptosis and higher expression of the retinal stress marker *GFAP*.

Why the mouse *Cerkl*<sup>-/-</sup> retinal phenotype differs from that of human patients? In order to answer this question, it may be relevant to compare the gathered data. First, adult mouse retinas mainly express *Cerkl* in the GCL ([6] and this work) and the *Cerkl*<sup>-/-</sup> retina alterations point to ganglion cell affectation; in contrast, the analysis of the human *CERKL* patients has revealed that GCL thickness and altered nerve fiber layer (NFL) only appears at late disease stages [2,7]. Second, a thickening of the superficial hyperreflective layer normally ascribed to the retinal nerve fiber layer (NFL) has been observed in patients, most probably due to increased glial processes [7]; in contrast, the increased gliosis (higher *GFAP* immunoreactivity) observed in the KO mice retinas did not relate to NFL hyperreflectivity.

Third, concerning photoreceptor functional integrity, while full-field ERGs with negative waveforms (greater b- than a-wave amplitude reduction) are a feature of severely affected *CERKL* patients [7], this alteration could not be observed in our KO model (in agreement with preservation of rods and cones at the analyzed times), and only OP components appear reduced. All these observations could be reconciled if human and mouse retinas respond differently to the same genetic defect and/or to stress insults. Other explanations for this mild ocular phenotype in our *Cerkl*<sup>-/-</sup> mouse may rely on *Cerkl* being partially redundant in mouse – so that other genes compensate for its deletion –, or on species-specific expression patterns at the retinal level – so that the phenotype caused by mutations in mouse does not have to abide to the severity observed in humans. Indeed, the same type of arguments has also been proposed for knockout models of other RD-causative genes with no phenotypic visual alterations, such as the *Rdh12*, *Gcap2* and *Gcap1/2* KO mice [28–31].

In summary, our *Cerkl*<sup>-/-</sup> model shows consistent perturbation of the GCL, as reflected by altered OP waveforms and lower levels of *Brn3a*, a POU-homeobox transcription factor involved in synaptogenesis and axonogenesis [27,32,33]. These results together with the consistent increased retinal stress and apoptosis signals observed in *Cerkl*<sup>-/-</sup> retinas further expand the role of *Cerkl* to the homeostasis, preservation and physiology of retinal neurons.

## Acknowledgments

We would like to acknowledge the technical contribution of Laura Ramírez. A.G and M.R were in receipt of the fellowships FPI BES-2007-15414 and FPU AP2007-00805.

*Grant information:* this study was supported by grants BFU2006-04562 (Ministerio de Educación y Ciencia), SAF2009-08079 (Ministerio de Ciencia e Innovación), 2009SGR-1427 (Generalitat de Catalunya), CIBERER (U718), Retina-Asturias and ONCE to R.G.-D; SAF2007-66175 and SAF2010-21879 (Ministerio de Educación y Ciencia); RD07/0062/0008 (Instituto de Salud Carlos III) to P. de la V., FISS PI11/00533 (Instituto de Salud Carlos III) to R.B. and BFU2010-15656 (Ministerio de Educación y Ciencia) to G. M.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.04.004>.

## References

- [1] M. Ali, V.L. Ramprasad, N. Soumitra, M.D. Mohamed, H. Jafri, Y. Rashid, M. Danciger, M. McKibbin, G. Kumaramanickavel, C.F. Inglehearn, A missense mutation in the nuclear localization signal sequence of CERKL (p.R106S) causes autosomal recessive retinal degeneration, *Mol. Vis.* 14 (2008) 1960–1964.
- [2] N. Auslender, D. Sharon, A.H. Abbasi, H.J. Garzoli, E. Banin, T. Ben-Yosef, A common founder mutation of CERKL underlies autosomal recessive retinal degeneration with early macular involvement among Yemenite Jews, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48 (2007) 5431–5438.
- [3] A. Avila-Fernandez, R. Riveiro-Alvarez, E. Vallespin, R. Wilke, I. Tapias, D. Cantalapiedra, J. Aguirre-Lamban, A. Gimenez, M.J. Trujillo-Tiebas, C. Ayuso, CERKL mutations and associated phenotypes in seven Spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49 (2008) 2709–2713.
- [4] E. Pomares, G. Marfany, M.J. Brion, A. Carracedo, R. Gonzalez-Duarte, Novel high-throughput SNP genotyping cosegregation analysis for genetic diagnosis of autosomal recessive retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis, *Hum. Mutat.* 28 (2007) 511–516.
- [5] Z. Tang, Z. Wang, Z. Wang, T. Ke, Q.K. Wang, M. Liu, Novel compound heterozygous mutations in CERKL cause autosomal recessive retinitis pigmentosa in a nonconsanguineous Chinese family, *Arch. Ophthalmol.* 127 (2009) 1077–1078.
- [6] M. Tuson, G. Marfany, R. Gonzalez-Duarte, Mutation of CERKL, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26), *Am. J. Hum. Genet.* 74 (2004) 128–138.
- [7] T.S. Aleman, N. Soumitra, A.V. Cideciyan, A.M. Sumaroka, V.L. Ramprasad, W. Herrera, E.A. Windsor, S.B. Schwartz, R.C. Russell, A.J. Roman, C.F. Inglehearn, G. Kumaramanickavel, E.M. Stone, G.A. Fishman, S.G. Jacobson, CERKL mutations cause an autosomal recessive cone-rod dystrophy with inner retinopathy, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (2009) 5944–5954.
- [8] K.W. Littink, R.K. Koenekoop, L.I. van den Born, R.W. Collin, L. Moruz, J.A. Veltman, S. Roosing, M.N. Zonneveld, A. Omar, M. Darvish, I. Lopez, H.Y. Kroes, M.M. van Genderen, C.B. Hoyng, K. Rohrschneider, M.J. van Schooneveld, F.P. Cremers, A.I. den Hollander, Homozygosity mapping in patients with cone-rod dystrophy: novel mutations and clinical characterizations, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51 (2010) 5943–5951.
- [9] M. Sugiura, K. Kono, H. Liu, T. Shimizugawa, H. Minekura, S. Spiegel, T. Kohama, Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 23294–23300.
- [10] S.M. Bajjalieh, T.F. Martin, E. Floor, Synaptic vesicle ceramide kinase. A calcium-stimulated lipid kinase that co-purifies with brain synaptic vesicles, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 14354–14360.
- [11] Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 139–150.
- [12] G.E. Miranda, C.E. Abraham, L.E. Politi, N.P. Rotstein, Sphingosine-1-phosphate is a key regulator of proliferation and differentiation in retina photoreceptors, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (2009) 4416–4428.
- [13] O.L. German, G.E. Miranda, C.E. Abraham, N.P. Rotstein, Ceramide is a mediator of apoptosis in retina photoreceptors, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 (2006) 1658–1668.
- [14] F. Bornancin, D. Mechtcheriakova, S. Stora, C. Graf, A. Wlachs, P. Devay, N. Urtz, T. Baumruker, A. Billich, Characterization of a ceramide kinase-like protein, *Biochim. Biophys. Acta* 1687 (2005) 31–43.
- [15] Y. Inagaki, S. Mitsutake, Y. Igarashi, Identification of a nuclear localization signal in the retinitis pigmentosa-mutated RP26 protein, ceramide kinase-like protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343 (2006) 982–987.
- [16] M. Tuson, A. Garanto, R. Gonzalez-Duarte, G. Marfany, Overexpression of CERKL, a gene responsible for retinitis pigmentosa in humans, protects cells from apoptosis induced by oxidative stress, *Mol. Vis.* 15 (2009) 168–180.
- [17] A. Garanto, M. Riera, E. Pomares, J. Permanyer, M. de Castro-Miro, F. Sava, J.F. Abril, G. Marfany, R. Gonzalez-Duarte, High transcriptional complexity of the retinitis pigmentosa CERKL gene in human and mouse, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52 (2011) 5202–5214.
- [18] C. Graf, S. Niwa, M. Muller, B. Kinzel, F. Bornancin, Wild-type levels of ceramide and ceramide-1-phosphate in the retina of ceramide kinase-like-deficient mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373 (2008) 159–163.
- [19] D. Chakraborty, S.M. Conley, M.W. Stuck, M.I. Naash, Differences in RDS trafficking, assembly and function in cones versus rods: insights from studies of C150S-RDS, *Hum. Mol. Genet.* 19 (2010) 4799–4812.
- [20] M.F. Marmor, G.E. Holder, M.W. Seeliger, S. Yamamoto, Standard for clinical electroretinography (2004 update), *Doc. Ophthalmol.* 108 (2004) 107–114.
- [21] S. Vekslin, T. Ben-Yosef, Spatiotemporal expression pattern of ceramide kinase-like in the mouse retina, *Mol. Vis.* 16 (2011) 2539–2549.
- [22] L. Wachtmeister, Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal, *Prog. Retin. Eye Res.* 17 (1998) 485–521.
- [23] B.V. Bui, B. Fortune, Ganglion cell contributions to the rat full-field electroretinogram, *J. Physiol.* 555 (2004) 153–173.
- [24] B. Fortune, B.V. Bui, J.C. Morrison, E.C. Johnson, J. Dong, W.O. Cepurna, L. Jia, S. Barber, G.A. Cioffi, Selective ganglion cell functional loss in rats with experimental glaucoma, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45 (2004) 1854–1862.
- [25] C.J. Dong, P. Agey, W.A. Hare, Origins of the electroretinogram oscillatory potentials in the rabbit retina, *Vis. Neurosci.* 21 (2004) 533–543.
- [26] P. Lachapelle, J.M. Little, R.C. Polomeno, The photopic electroretinogram in congenital stationary night blindness with myopia, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 24 (1983) 442–450.
- [27] T.C. Badea, H. Cahill, J. Ecker, S. Hattar, J. Nathans, Distinct roles of transcription factors *brn3a* and *brn3b* in controlling the development, morphology, and function of retinal ganglion cells, *Neuron* 61 (2009) 852–864.
- [28] I. Kurth, D.A. Thompson, K. Ruther, K.L. Feathers, J.D. Chrispell, J. Schroth, C.L. McHenry, M. Schweizer, S. Skosyrski, A. Gal, C.A. Hubner, Targeted disruption of the murine retinal dehydrogenase gene *Rdh12* does not limit visual cycle function, *Mol. Cell. Biol.* 27 (2007) 1370–1379.
- [29] C.L. Makino, I.V. Peshenko, X.H. Wen, E.V. Olshevskaya, R. Barrett, A.M. Dizhoor, A role for GCAP2 in regulating the photoresponse. Guanylyl cyclase activation and rod electrophysiology in *GUCA1B* knock-out mice, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 29135–29143.
- [30] K.A. Howes, M.E. Pennesi, I. Sokal, J. Church-Kopish, B. Schmidt, D. Margolis, J.M. Frederick, F. Rieke, K. Palczewski, S.M. Wu, P.B. Detwiler, W. Baehr, GCAP1 rescues rod photoreceptor response in *GCAP1/GCAP2* knockout mice, *EMBO J.* 21 (2002) 1545–1554.
- [31] A. Mendez, M.E. Burns, I. Sokal, A.M. Dizhoor, W. Baehr, K. Palczewski, D.A. Baylor, J. Chen, Role of guanylate cyclase-activating proteins (GCAPs) in setting the flash sensitivity of rod photoreceptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 9948–9953.
- [32] R.G. Collum, P.E. Fisher, M. Datta, S. Mellis, C. Thiele, K. Huebner, C.M. Croce, M.A. Israel, T. Theil, T. Moroy, R. DePinho, W.A. Alt, A novel POU homeodomain gene specifically expressed in cells of the developing mammalian nervous system, *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 4919–4925.
- [33] M. Xiang, L. Zhou, J.P. Macke, T. Yoshioka, S.H. Hendry, R.L. Eddy, T.B. Shows, J. Nathans, The *Brn-3* family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons, *J. Neurosci.* 15 (1995) 4762–4785.

*Supplementary Material for the article:*

## **Targeted knockdown of *Cerkl*, a retinal dystrophy gene, causes mild affectation of the retinal ganglion cell layer**

Alejandro Garanto, Javier Vicente-Tejedor, Marina Riera, Pedro de la Villa, Roser González-Duarte and Gemma Marfany

Supplementary Figure 1

Supplementary Figure 2

Supplementary Figure 3

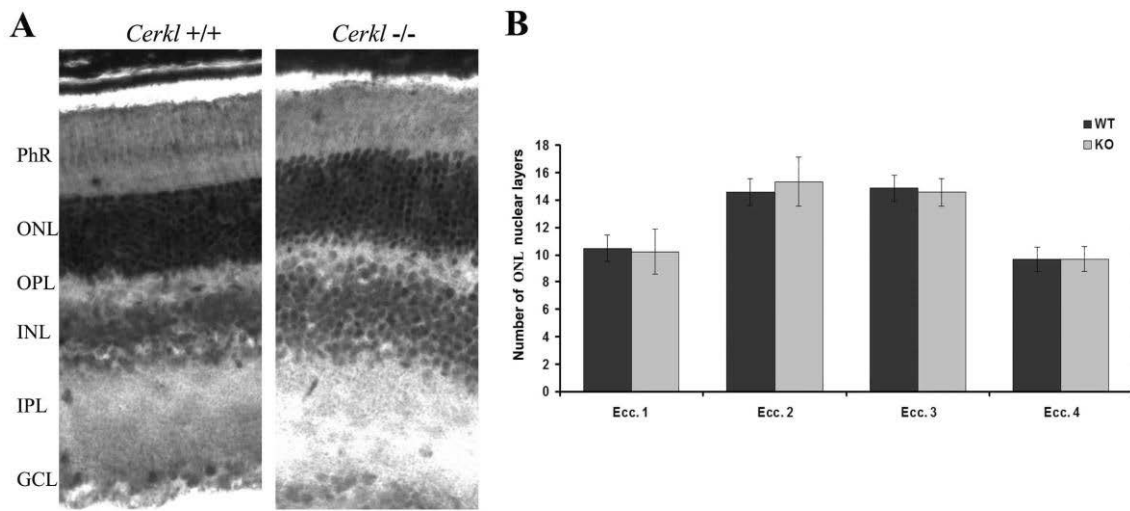
Supplementary Figure 4



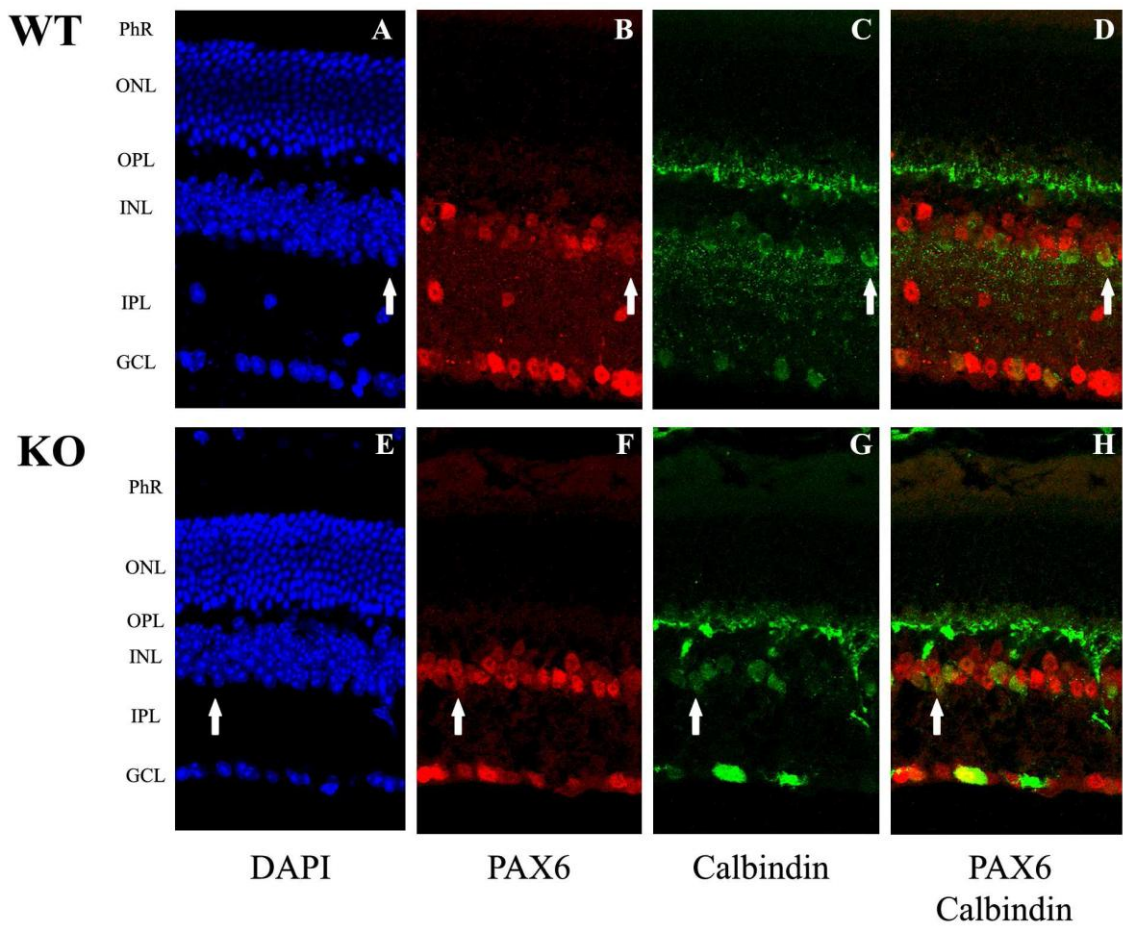


**SUPPLEMENTARY FIG. 2 - Morphological analysis of the WT and KO mouse retinas.**

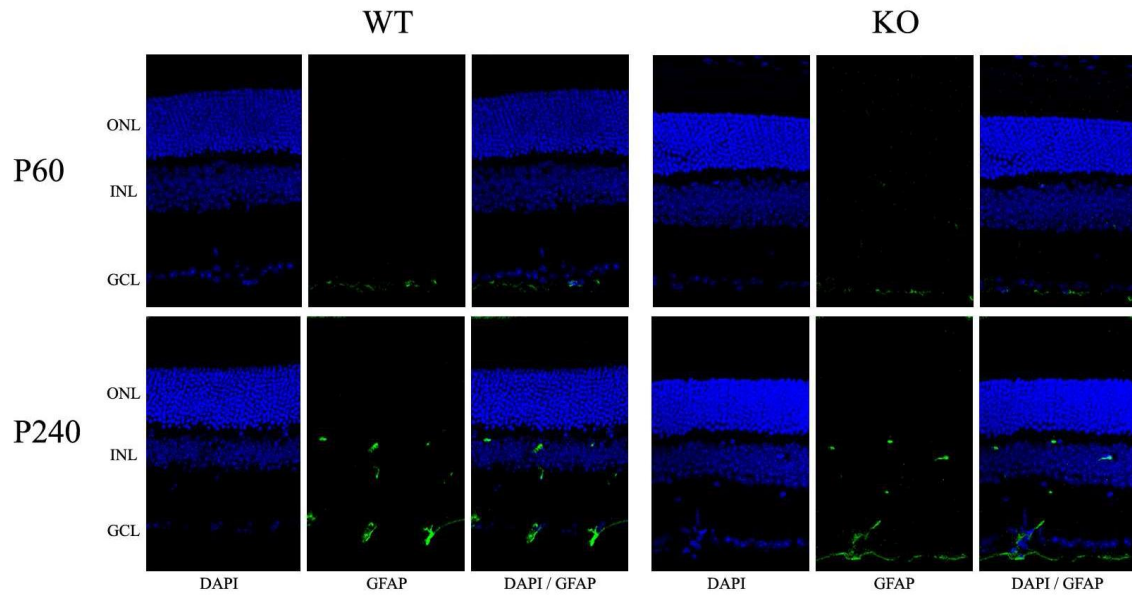
(A) Low magnification of semithin cryosections of retinas stained with hematoxylin-eosin viewed at the light microscope. (B) Nuclei counting performed in at least three independent replicates of each type at 4 different eccentricities (Ecc), after DAPI-staining viewed in the fluorescent microscope. Eccentricities 1 and 4 correspond to peripheral retina, whereas 2 and 3 are areas of central retina. PhR- photoreceptor cell layer; ONL- outer nuclear layer; OPL- outer plexiform layer; INL- inner nuclear layer; IPL- inner plexiform layer; GCL- ganglion cell layer.



**SUPPLEMENTARY FIG. 3: PAX6 and Calbindin immunohistochemistry of WT and KO retinas.** Fluorescent immunodetection of PAX6 (amacrine cell and ganglion cell marker), Calbindin (horizontal cell and amacrine cell marker) and DAPI (nuclear staining) on 14  $\mu\text{m}$  sections from C57BL/6J and *Cerkl*<sup>-/-</sup> retinas were used. Photographs were taken in the superior retina for comparison. (A-D) WT retinas. E-H) KO retinas. The PAX6 polyclonal antibody (B,F) reveals the staining located in the GCL and the INL in the KO vs the WT retinas. The Calbindin polyclonal antibody (C,G) reveals the staining located in the horizontal cell processes and sparse amacrine cells in the KO vs the WT retinas. White arrows indicate colocalization of PAX6 and Calbindin (D and H) in amacrine cells of INL and GCL. PhR- photoreceptor cell layer; ONL- outer nuclear layer; OPL- outer plexiform layer; INL- inner nuclear layer; IPL- inner plexiform layer; GCL- ganglion cell layer.



**SUPPLEMENTARY FIG. 4 - Immunohistochemistry of GFAP on P60 and P280 WT and KO retinal cryosections.** Pictures were obtained using the same beam intensity. A faint increase of GFAP expression was observed in KO retinas.



## PUBLICACIÓ 3

## TÍTOL

“*CERKL knockdown causes retinal degeneration in Zebrafish*”

## AUTORS (ANY)

Marina Riera, Demian Burguera, Jordi Garcia-Fernández i Roser González-Duarte

## REFERÈNCIA

Acceptat per publicació a la revista PLOS ONE.

## RESUM

Mutacions al gen *CERKL* es troben implicades en casos comuns i severos de distròfies de retina. No obstant, la funció de *CERKL* a la retina és encara desconeguda. Els models murins obtinguts fins el moment, entre ells el construït per aquest equip, no presenten un fenotip semblant a l'humà. Per aquestes raons, ens vàrem proposar, d'una banda, la caracterització de l'ortòleg de *CERKL* a peix zebra (*Danio rerio*), focalitzada sobretot en l'anàlisi estructural i d'expressió del gen en un context *Evo-Devo* i, per l'altra, la generació d'un model *knockdown* mitjançant la microinjecció de morfolinos. Hem demostrat que només existeix una còpia de l'ortòleg de *CERKL* en peix zebra, situat al cromosoma 9. Mitjançant RT-PCRs es van realitzar estudis d'expressió durant el desenvolupament embrionari i en diferents teixits adults. *Cerkl* s'expressa en estadis primerencs del desenvolupament, mostrant un increment de la transcripció just quan el globus ocular comença a formar la retina neural a l'embrió, al voltant de les 20 hpf. En teixits adults, l'ull va resultar ser l'òrgan on s'observava major expressió del gen, seguit del cervell. Hibridacions *in situ* van revelar expressió del gen en les tres capes de la retina de l'embrió, mentre que en l'adult, aquesta era majoritària als fotoreceptors. A diferència dels mamífers, on s'havien detectat >20 isoformes en humà i >30 en ratolí, en el peix zebra es van aïllar només 3 isoformes, resultant en un model senzill i manejable on estudiar *CERKL* i la seva contribució en la degeneració de la retina. Mitjançant la microinjecció de morfolinos vàrem generar un model *knockdown*, el qual va mostrar anomalies en el desenvolupament de la retina, basades en defectes en la laminació de les tres capes nuclears i en l'absència de segments externs dels fotoreceptors, tant de cons com de bastons. A més, els ulls d'aquests animals eren substancialment més petits i mostraven signes clars d'apoptosi. Finalment, estudis amb diferents marcadors primerencs de desenvolupament d'ull en aquests embrions ens varen permetre descartar qualsevol implicació directe de *Cerkl* en el desenvolupament de la retina. D'aquesta manera, vàrem proposar que *Cerkl* podria estar implicada en la supervivència cel·lular, i els defectes observats en el *knockdown* podrien ser conseqüència d'un procés degeneratiu secundari.

### **APORTACIÓ PERSONAL AL TREBALL**

He realitzat la major part del treball experimental que apareix en aquest article, i he participat molt activament en l'elaboració del manuscrit. La meua contribució ha consistit en: a) l'obtenció de mostres i extracció de RNA d'embrions de peix zebra en diferents estadis embrionaris, així com de diferents teixit adults (en col·laboració amb el Demian Burguera); b) els anàlisis de RT-PCRs d'expressió i d'isoformes en peix zebra; c) els estudis d'expressió mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ* sobre embrions i retines embrionàries i adultes; d) la construcció dels vectors i la transfecció en cultius cel·lulars per les immunolocalitzacions; e) la generació i manteniment dels animals knockdown; i f) l'estudi del fenotip del model mitjançant tincions d'Hematoxilina-Eosina, DAPI, tècniques d'immunohistoquímica sobre crioseccions, hibridacions *in situ whole-mount* així com les anàlisis d'apoptosi i diferenciació *in vivo* de les cèl·lules ganglionars mitjançant la soca transgènica *ath5:GFP*.

## **CERKL knockdown causes retinal degeneration in zebrafish**

Marina Riera<sup>1,2,3</sup>, Demian Burguera<sup>1,2</sup>, Jordi Garcia-Fernández<sup>1,2</sup> and Roser González-Duarte<sup>1,2,3</sup>

From the <sup>1</sup>Departament de Genètica, Facultat de Biologia, <sup>2</sup>Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>CIBERER, Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain.

**Corresponding author:** Roser González-Duarte, Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avda.Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain;

Tel: +34 934021034

FAX: +34 934034420

rgonzalez@ub.edu

**Grant Information:** This study was supported by grants SAF2009-08079 (Ministerio de Ciencia e Innovación), SGR2009-1427 (Generalitat de Catalunya), CIBERER (U718), Retina Asturias and ONCE to R. G.-D., and BFU2011-23291 (Ministerio de Ciencia e Innovación) and ICREA Academia Prize (Generalitat de Catalunya) to J. G.-F.

## ABSTRACT

The human *CERKL* gene is responsible for common and severe forms of retinal dystrophies. Despite intense *in vitro* studies at the molecular and cellular level and *in vivo* analyses of the retina of murine knockout models, CERKL function remains unknown. In this study, we aimed to approach the developmental and functional features of *cerkl* in *Danio rerio* within an Evo-Devo framework. We show that gene expression increases from early developmental stages until the formation of the retina in the optic cup. Unlike the high mRNA-*CERKL* isoform multiplicity shown in mammals, the moderate transcriptional complexity in fish facilitates phenotypic studies derived from gene silencing. Moreover, of relevance to pathogenicity, teleost CERKL shares the two main human protein isoforms. Morpholino injection has been used to generate a *cerkl* knockdown zebrafish model. The morphant phenotype results in abnormal eye development with lamination defects, failure to develop photoreceptor outer segments, increased apoptosis of retinal cells and small eyes. Our data support that zebrafish Cerkl does not interfere with proliferation and neural differentiation during early developmental stages but is relevant for survival and protection of the retinal tissue. Overall, we propose that this zebrafish model is a powerful tool to unveil CERKL contribution to human retinal degeneration.

## Introduction

Retinal dystrophies (RD), the major cause of incurable familial blindness in the Western world, are monogenic disorders characterized by progressive dysfunction of photoreceptor and retinal pigment epithelium (RPE) cells [1]. RD is a group of extremely heterogeneous diseases that show substantial clinical and genetic overlap. Moreover, mutations in a single gene appear to be associated to distinct clinical entities [2], as is the case for *CERKL*, that was initially characterized as an autosomal recessive Retinitis Pigmentosa (RP) gene [3], [4], [5], [6], [7], [8], and later shown to promote Cone-Rod Dystrophy (CRD), a RD disorder associated to a more severe phenotype [9], [10].

Highthroughput technologies have greatly improved our knowledge of the genetic basis of RD. Indeed, more than 180 RD genes have already been reported and this number is constantly increasing (Retnet, <https://sph.uth.tmc.edu/retnet/>). However, although RD genes are known to be involved in a variety of cellular and molecular processes in the retina, we are still far from understanding the contribution of most of them to the disease. *CERKL* ranks in this class, as all previous attempts have failed to provide valuable clues to explain its involvement in photoreceptor degeneration.

Human *CERKL* was initially identified as a 13 exon-gene, which encoded a polypeptide of 532 amino acids. This protein shared an integral diacylglycerol kinase (DAGK) signature [3] with Ceramide Kinase (CERK), an ubiquitously expressed paralog with ceramide kinase activity involved in cell survival and proliferation [11]. In *CERKL*, all the *in vivo* and *in vitro* assays with reported CERK substrates and a variety of lipid mixtures have failed to show any kinase activity [12], [13], [14], [15], [16]. Concerning cell survival, overexpression of *CERKL* in cultured cells showed protection against apoptosis induced by oxidative stress [14]. Moreover, studies with transfected cell lines have shown a dynamic subcellular localisation of *CERKL*, shifting from the cytoplasm, where the protein is mainly associated to the endoplasmic reticulum and Golgi membranes, to the nucleus [14]. *CERKL* intracellular traffic regulation seems to be directed by two nuclear localization signals (NLSs) and two nuclear export signals (NESs) [6], [12], [13]. Concerning *CERKL* localization in the retina, immunohistochemistry on mouse cryosections revealed strong localization in cones, faint in rods, and moderate at the ganglion cell (GCL) and inner nuclear layers (INL) [17], [18], [19].

*CERKL* performance in the retina has been also approached through an accurate assessment of its transcriptional products in several tissues. Interestingly, in the retina, human and mouse *CERKL* revealed an unexpected high repertoire of mRNA isoforms, which emerged from alternative splicing and additional promoters, among them that of *NEUROD1* gene (>20 isoforms in human and >30 in mouse were validated) [17], [18]. The high heterogeneity presumed at the protein level, together

with its dynamic subcellular localization probably accounts for the multi-functional character of CERKL.

Animal models, whether natural or transgenic, provide invaluable tools for studies of disease pathogenesis and the identification of therapeutic targets [20]. To date, two mouse models of CERKL have been constructed. The first was obtained by deletion of the alternatively spliced exon 5, where the most prevalent mutation (R257X) is found [21]. The second was generated in our group by the deletion of the proximal promoter and exon 1. Both mouse models were viable and fertile, and did not show gross morphological alterations in the retina. Our targeted *Cerkl* deletion resulted in a knockdown rather than a knockout model, as gene transcription was attained from two previously unreported alternative promoters [19]. Moderate dysfunction was observed in the ganglion and/or amacrine cells, supported by aberrant electroretinographic recordings and increased retinal apoptosis and gliosis, and photoreceptor cells showed WT features [19]. The failure to reproduce the human phenotype in the mouse, not unusual in other hereditary retinal disorders, prompted us to explore zebrafish as an alternative model. In this context, *Danio rerio* seems to be an excellent tool to understand the mechanisms of human visual disorders, because human and zebrafish share the main cell types and general structure of the eye. Moreover, zebrafish biology allows ready access to all developmental stages, and the optical transparency of embryos and larvae allow real-time imaging of developing pathologies [22]. The ontogeny of the zebrafish eye begins as an evagination from the developing forebrain around 12 hours postfertilization (hpf), and ocular development is largely completed by 72 hpf, at which time the first visual responses can be detected [23], [24], [25], [26]. In this study we have identified the zebrafish *cerkl* ortholog, studied its expression during development and in the adult tissues, and drawn comparisons with vertebrate species. Besides, we have generated *cerkl* zebrafish knockdowns by morpholino injection and characterized a range of developmental abnormalities in the morphant phenotype, including retinal degeneration and apoptosis-like cell death. Finally, our analyses highlight our model as a simple and amenable tool to analyse CERKL contribution to RD pathogenesis.

## **Material and methods**

### **Ethics statement**

All procedures were performed according to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, as well as the regulations of the Animal Care facilities at the University of Barcelona. The study was approved by the Ethics Committee for Animal

Experimentation (CEEA) of the University of Barcelona. When needed, animals were sacrificed with excess of anesthetic MS222, following the approved protocols.

### **Animal handling, tissue dissection and preparation of the samples**

Zebrafish (*Danio rerio*) were maintained at 28.5°C on a 14-hour light/10-hour dark cycle. The transgenic strain *ath5:GFP* was a kind gift from Carolina Minguillón. Fertilized eggs were obtained and grown in incubators, and embryos were staged as described [27], [28]. Specific tissues and organs were dissected from adult zebrafish and immediately frozen in liquid nitrogen.

### **Identification of CERKL orthologs**

The human CERKL isoform 1 (NM\_201548.4) amino acid sequence was used as a query for a BLASTp search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Protein sequences from several species were compared running a CLUSTALW2 alignment ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)). Conservation of CERKL across different species was evaluated with the Jalview program (version 2.7).

### **RNA-seq expression analysis**

Available RNA-seq data on zebrafish developmental stages and adult tissues was used to quantify *cerkl* expression according to the previously defined cRPKM value [29]. The reported RNA-seq data used in this study are shown in Table S1.

### **RNA extraction and RT-PCR**

RNAs from a pool of zebrafish, frog and chicken embryos at different stages of development or from different tissues of adult specimens were extracted using the RNeasy Mini or Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA), following the manufacturer's instructions. RT-PCR assays were carried out with the Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), using 200 ng of total RNA. For semi-quantitative analysis, the cDNA was amplified according to standard protocols using GoTaq polymerase (Promega, Madison, WI). The level of expression and characterization of different isoforms was performed using a forward primer located in the 5'UTR and a reverse primer in the 3'UTR (Table S2). *β-actin*, *ODC* and *Gapdh* were used for normalization in zebrafish, frog and gallus samples, respectively (see primer sequences in Table S2). All PCR products were resolved on agarose gel electrophoresis and sequenced.

### **Cloning and overexpression of zebrafish CERKL in cultured cells**

The full-length zebrafish *cerkl* transcript was amplified from adult retina oligo-dT cDNA using specific primers carrying *Bam*HI and *Xho*I restriction enzyme sites (see primer sequences, Table S2). The cDNA was inserted into a modified version of the pcDNA3.1 vector (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) that adds a C-terminal hemagglutinin (HA) tag.

For protein expression, COS-7 cells were seeded and transfected using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's protocol. After 48 h, immunolocalization was performed as previously described [14] incubating the cells with 1:275 anti-HA mouse monoclonal antibody (Covance, Princeton, NJ) followed by 1:300 AlexaFluor 488-conjugated anti-mouse secondary antibody (Invitrogen Life Technologies). Slides were counter-stained with 1:5000 DAPI (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) nuclear blue dye in PBS for 15 min. All preparations were mounted in Flouprep medium (BioMérieux, Craponne, France) and analyzed by confocal microscopy (SP2; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

### **Histology and in situ hybridization**

Embryos and adult zebrafish eyecups were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA). For cryosections, embryos and adult eyecups were rinsed in sucrose at 4°C (successive incubations at 20% for 30 min, 30% for 30 min and 40% sucrose for 12 h) and then were embedded in O.C.T (Tissue-Tek, Sakura Finetech, Torrance, CA) and sectioned at -17°C. *In situ* hybridization on whole-mounts and cryosections were performed as previously described [30], [31] using digoxigenin (DIG)-labelled RNA sense and antisense probes (see primer sequences in Table S2). The BM Purple AP Substrate (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) reagent was used. Sections were cover-slipped with Fluoprep (Biomérieux, Craponne, France) and photographed using a Leica DFC Camera connected to a Leica DM IL optic microscope (Leica Microsystems).

### **Morpholino and mRNA injection**

To knockdown ZF*cerkl*, we used two morpholino antisense oligonucleotides (MOs) targeting the acceptor splice site at the boundary of intron 3 and exon 4 (acMO, 5'-TCTCAGTGACTGTGGAAAAGAAAGA-3') and the donor splice site at the boundary of exon 9 and intron 9 (doMO, 5'-TAACCATACTCACAAATGTCTCCTC-3'). A standard control MO (coMO, 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3') was also used. All the MOs were designed and synthesized by GeneTools (Philomath, OR). Eight nanograms of each MO were air pressured injected into 1 to 4-cell embryos. For the phenotypic rescue, human cDNA was cloned into the pCS2 vector. *In vitro* transcription of synthetic capped mRNA was performed using a capped RNA transcription kit (SP6

mMESSAGE mMACHINE; Ambion, Austin, TX) following the manufacturer's instruction. Two nanoliters of MO or mixed MO/mRNA was injected into each 1 to 4 cell-stage embryo. The final concentrations of MO and mRNA were 200  $\mu$ M and 400 ng/ $\mu$ l, respectively.

### **H&E staining and immunohistochemistry**

Retina cryosections of 72 hpf embryos were haematoxylin and eosin stained under standard conditions. For immunohistochemistry, 14  $\mu$ m sections were recovered on poly-lysine covered slides, dried for 1 h, washed in PBS (3 $\times$  10 min), and blocked in blocking solution (PBS containing 3% sheep serum, 1% BSA and 0.3% Triton X-100) at RT (60 min). Incubation with peanut agglutinin (PNA) conjugated to Alexa Fluor 647 (40 mg/ml; Invitrogen Life Technologies) and the primary antibody mouse anti-rhodopsin (1:500, Abcam, Cambridge, MA) was performed overnight at RT in blocking solution. Sections were rinsed three times in PBS again, followed by incubation with Alexa-Fluor568 goat anti-rabbit as secondary antibody (1:300, Invitrogen Life Technologies). Nuclei were stained with DAPI (Roche Diagnostics), sections were mounted in Fluoprep medium (Biomérieux) and analyzed by confocal microscope (SP5; Leica Microsystems). For eye measurements, 14  $\mu$ m thick cryosections were examined under the microscope and imaged. Eye size was taken from the anterior to the posterior edge using Fiji software. Significant differences between groups were analyzed by the Student's *t*-test.

### **Detection of apoptosis**

Apoptotic cells in the retina cryosections of 72 hpf morphants were detected by immunofluorescence using anti-active Caspase-3 as primary antibody (1:200, BD Pharmingen, San Jose, CA) and Alexa-Fluor568 goat anti-rabbit as secondary antibody (1:300, Invitrogen Life Technologies) following the protocols already described. For apoptosis quantification, nuclei were counted using the Fiji software.

## **Results**

### **Homology search and cloning of the zebrafish *cerkl***

To identify zebrafish *cerkl* (*ZFcerkl*), a BLAST search of the Ensembl zebrafish database was performed using the human CERKL protein isoform 1 sequence (NP\_963842). A single copy of the zebrafish *cerkl* gene was detected, encompassing 195 kb on chromosome 9. The genomic region of *ZFcerkl* shows conserved synteny over more than 1,8 Mb with the human *CERKL* locus on chromosome 2, and largely shows the same gene order and transcriptional orientation, with the only

exception of a chromosomal inversion encompassing 4 genes (*dnajc*, *frzb*, *nckap1*, *dusp19*) located 5' upstream of *cerkl* (Fig. S1).

The predicted zebrafish transcript consists of 13 exons, spans approximately 2 kb and encodes a protein of 577 amino acids, the latter showing 59% identity and 82% similarity with the human counterpart. CERKL alignments between zebrafish and human revealed 65% identity between the DAGK domains (Fig. 1A). The ATP binding site (ATPbs) GGDG motif contained in this domain, already described in CERK, is fully conserved not only in zebrafish but also in 5 vertebrate species (Fig. S2). Concerning the nuclear localization and export signals (NLS and NES, respectively), the human NLS1 sequence (MPWRRRRNRVSA) was not conserved in zebrafish, neither in the rest of the species analysed, whereas NLS2 (SVKLKRRCSVKQ) showed 58% identity, with preservation of all but one (L) of the five key residues (underlined). The NES1 (LHIIMGHVQL) and NES2 (LMEVASEVHIRL) domains of human and zebrafish CERKL displayed 82% and 42% identities, respectively. The *in silico* predicted pleckstrin homology (PH) domain, essential for CERK localization, translocation, and enzymatic activity in human, encoded in exons 1 and 2 [32], showed very low conservation among vertebrate species. Remarkably, the multi-species comparison of CERKL protein sequences revealed two previously unidentified highly conserved regions, one in exon 7 (hCERKL, 318-352 aa), and the other encompassing exons 10 and 11 (hCERKL, 400-448 aa), with unassigned function so far (Fig. S2).

On the basis of these predictions, specific primers were designed (Table S2) to clone zebrafish *cerkl* cDNA by RT-PCR into a modified version of the pcDNA 3.1 vector that adds a C-terminal hemagglutinin (HA) tag. The construct was transfected into COS-7 cells, and an anti-HA immunodetection was performed. The ZFCerkl protein shared with hCERKL the dynamic subcellular localization, shifting from the cytoplasm (found with a uniform pattern or in aggregates) to the nucleus. Remarkably, in contrast with the human homolog, ZFCerkl showed clear exclusion from the nucleoli (Fig. 1B-D).

### **Regulated expression of vertebrate *cerkl* orthologs during embryogenesis and in adult tissues**

The temporal and spatial expression pattern of ZFCerkl during embryogenesis was examined by semi-quantitative RT-PCR (Fig. 2A, see Table S2 for primer sequences). Expression was faint at early developmental stages, from 75%-epiboly (8 hpf) up to the 8-somite stage (13 hpf) embryos, followed by two marked increases in gene expression around the 22-somite (20 hpf) and 30 hpf stages, just when the optic cup starts forming the neural retina [33]. Moreover, the expression persisted during development up to 6 days post fecundation (dpf), reaching a maximum value at 4 dpf. Adult tissue expression was examined in total RNA from eye, brain, gill, fin, heart, liver, muscle and stomach. Expression was highest in eye, moderate in brain, heart and kidney, and low in gills. Our RT-PCR

semiquantitative analysis was supported by available zebrafish RNA-seq data (Fig. 2A) [34], [35], [36], [37], [38].

We then aimed to assess whether *cerkl* tissue-specific regulation and developmental expression was evolutionary conserved among other vertebrate species: *Gallus gallus* and *Xenopus tropicalis*. In agreement with mammals, *cerkl* expression in both species was mainly detected in eye and brain (Fig. 2B and C) [17], [18], which suggested a conserved role in the eye and the anterior central nervous system (CNS). Interestingly, high levels of transcription were also detected in the lung of *Gallus*. Further work should clarify if this is a case of *cerkl* co-option in the avian lineage.

Tissue specific expression in zebrafish was also assessed in whole embryos and in embryonic and adult retinas by *in situ* hybridization (ISH) (Fig. 3). *Crx* antisense and *cerkl* sense riboprobes were used as positive and negative controls, respectively. Faint *Cerkl* expression was already detected at 24 hpf by whole-mount ISH (Fig. 3A). Fifty hpf embryos showed *cerkl* expression restricted to the anterior region and, particularly, in the eye and brain (Fig. 3B). To further characterize the retinal expression pattern, ISH on cryosections was performed. Our data revealed strong hybridization signal at 72 hpf embryos in the three nuclear layers (Fig. 3C), whereas adult expression concentrated in the inner segment of photoreceptors and staining was not homogeneous along the inner nuclear and ganglion cell layers (Fig. 3D).

### **Alternative splicing and the NeuroD1 promoter among vertebrates**

To assess and compare the diversity of *cerkl* mRNA isoforms in vertebrate, 45-cycle PCR reactions were performed using primers located in exons 1 and 13 of *cerkl* of *Danio rerio*, *Gallus gallus* and *Xenopus tropicalis* (Fig. 4A). Keeping in mind that some AS events and additional alternative promoters could have escaped our experimental approach, 3 *cerkl* mRNA variants were identified in zebrafish, 2 in *Xenopus tropicalis* and 5 in *Gallus gallus*. In zebrafish, variant 1 was the major isoform and encompassed all the exons; variant 2 skipped exon 10 and encoded a C-terminus truncated protein without the NES2 domain; and variant 3, adult eye-specific, was generated from a novel splice donor site within exon 1. In the later form, protein synthesis would start at a conserved methionine in exon 5, as already described in human [18], and truncation would affect the full NLS2 and ATP binding site signatures, and a fraction of the DAGK domain. In *Xenopus tropicalis*: variant 1 was the main isoform with all the canonical exons, and variant 2, eye-specific, incorporate an alternative exon (3b), between exons 3 and 4, containing an in-frame stop codon. In *Gallus gallus*: variant 1, the main isoform, comprised all the annotated exons; variant 2 included a stop-containing exon (5b, between exons 5 and 6) and encoded a C-terminal truncated protein; and variant 3, skipped exon 6 and generated an in-frame shortened peptide.

We also aimed to characterize *CERKL* expression in the three analysed species from the upstream transcriptional start site (TSS) of *NEUROD1* [18], [19], a transcriptional factor involved in photoreceptor development [39]. RT-PCR eye cDNA assays with specific primers spanning the *neuroD1* 5'UTR and exon 2 or 13 of *cerkl* showed that NeuroD1 promoted *cerkl* expression in chicken, but not in zebrafish or frog. The use of the alternative promoter generated a novel 5'UTR exon, between *neuroD1* and *cerkl* *Gallus* genes, and generated two new isoforms (named 4 and 5) (Fig. 4A). If translated, the peptides would show truncations at the N-terminus, as the canonical methionine in exon 1 was skipped and translation could be initiated from a species-specific methionine in exon 2. A general picture of the alternative exons and their impact on the predicted ORF in human, mouse, chicken, frog and zebrafish *CERKL* is shown in Fig. 4B.

### **Validation of *cerkl* morpholinos**

To evaluate whether the knockdown of *ZFcerkl* caused a retinal defect, two antisense morpholinos (MOs) that targeted all mRNA isoforms were used, acMO and doMO (see the Material and Methods section), and a standard negative control (coMO). In order to assess splicing blockage by *ZFcerkl* MOs, we performed RT-PCR analyses from a pool of 10-12 embryos at different stages (24, 30, 52 and 72 hpf) using specific primers flanking the target region (Fig. 5A, black arrows). In the case of acMO, almost complete depletion (85%) of *cerkl* transcripts was attained, whereas doMO blockage was less intense, only reaching the 35%. The poor blocking ability of doMO was taken to mimic the heterozygous condition of human carriers.

To further investigate the putative *ZFcerkl* aberrant splice products produced by acMO and doMO blocking, semi-quantitative RT-PCR assays were devised. Nor exon skipping neither intron retention could be identified using specific primers located at the flanking exons or introns of each MO targets. Assuming that transcripts from the targeted alleles would have skipped exon 4 or exon 9, or retained intron 3 or intron 9, in acMO and doMo, respectively, a premature translation-termination codon (PTC) would appear in all cases. To verify if the PTC-containing mRNAs-*ZFCerkl* were degraded via the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) surveillance mechanism, another RT-PCR assay was carried out with two pairs of primers located in exons far away from the original morpholino targets (see Table S2 for primer sequences). Expression levels were in accordance with those reported for the first pair of primers in each case, thus supporting NMD transcript depletion (Fig. S3). Indeed, this is in agreement with late reports showing that NMD effectors are deeply involved in zebrafish embryonic development and survival [40].

### **ZF*cerkl* suppression results in retinopathy**

In accordance with our previous observations showing greater blocking ability for the acMO, microinjection of 8 ng MO into 1 to 4 cell-stage embryos resulted in morphogenesis defects in 73% of the animals, whereas no mutant phenotypes were observed neither with doMO-, nor with coMO-injected embryos, from stage 24 hpf to 5 dpf. First evidences of distortions in the visual system were detected at 48 hpf. The main traits were eye size reduction with overall structure preservation and clear boundaries between the lens and the neural retina in acMO embryos. By 72 hpf, around 70% of the acMO morphants showed the small eye phenotype (“mild” form), and some (23%) also exhibited small heads, markedly curved body axes and short tails (“severe” form) (Fig. 5B). Phenotypic rescue was attained after co-injection of the acMO and the mRNA encoding human wild type *CERKL* (Fig. 5C). Analyses of the diameter length of the eye on histological sections indicated a 29% reduction of the acMO treated embryos compared with coMO animals (Fig. 5D).

To investigate the effect of *cerkl* knockdown on retinal development, histological and immunological analysis of 72 hpf retinas of ZF*cerkl*-deficient morphants and controls were carried out. By this stage, the outer segment of photoreceptors is normally formed. In our case, the acMO-injected morphants showed defective lamination as the three retina cell layers (GCL, INL and outer nuclear layer, ONL) were absent, whereas wild type lamination was observed in doMO and control embryos (Fig. 6A). Moreover, the outer segments of rod and cone photoreceptors (detected with anti-rhodopsin and anti-PNA, respectively) were absent in acMO embryos (Fig. 6B, C). The development of the retinal pigmented epithelium (RPE) was unaffected. Another relevant trait of the acMO morphants was the abnormal lens morphology, possibly related to the retardation of ocular development because of *cerkl* knockdown.

### **Knockdown of ZF*cerkl* leads to cell death**

The aberrant eye phenotype could be due to increased cell death or reduced proliferation. Immunodetection of Caspase-3 (a marker of the first stages of apoptosis [42]) was used to assess cell death in single optical sections (Fig. 7A). Positive cells were scored in 4 independent embryos from each group. Our results revealed a 16-fold increase of cell death in acMO embryos (Fig. 7B) and supported increased apoptosis of retinal cells, although additional effects of *Cerkl* in cell proliferation cannot be discarded.

### ***Cerkl* does not contribute to retinal cell proliferation and early differentiation**

To assess if the acMO phenotype in zebrafish was due to defective cell proliferation or differentiation during early retinal development or a secondary degeneration process, whole-mount

ISH assays with early retinal markers *pax6a* and *otx2* were performed (Fig. 8A and B). *Pax6a* contributes to the control of cell proliferation, maintenance of the retinogenic potential of the retina progenitor cells, and amacrine cell fate specification [43], whereas *otx2* is a key regulatory gene for retinal photoreceptor determination [44]. Our results indicated that at early stages, 22 and 24 hpf, when in the optic vesicle all cells are still proliferating, the expression pattern of both, *pax6a* and *otx2*, was unaffected in the acMO morphants. As expected, *pax6a* was detected in the developing forebrain, hindbrain, spinal cord, and eye, and *otx2* in the eye and midbrain. At 48 and even more evident at 72 hpf, when all cells are postmitotic, the acMO embryos exhibited a considerable decrease in hybridization intensity compared to the controls, treated and stained under the same conditions. The distribution of differentiation markers in the acMO morphants was further analyzed using the *ath5:GFP* transgenic strain. *Ath5* is a transcription factor expressed in a wave-like pattern that prefigures the wave of the retinal ganglion cell (RGC) genesis, the first cell type to differentiate in the vertebrate retina which has been previously reported as affected in our mouse model *Cerkl*<sup>-/-</sup>. The wave of *ath5* expression and RGC differentiation in zebrafish occurred during the second day post-fertilization, starting in the ventronasal patch and spreading from there to fill the rest of the nasal and central retina [28]. By 48 hpf, the RGC wave filled the central and peripheral retina in control embryos, whereas it was delayed in acMO morphants (Fig. 8C). Hence, our results suggested that *cerkl* was not essential for driving the RGC differentiation wave, as the ventronasal patch was formed and the wave started spreading. However, in agreement with the above results in cell death, the delay and disorganization in RGC neurogenesis supported *Cerkl* contribution to cell survival, and suggested that the small eye phenotype and the defective retina lamination were a consequence of a secondary degeneration process.

## Discussion

After intense studies, the role in photoreceptor degeneration of *CERKL*, a gene causing autosomal recessive RP and CRD [3], has remained elusive up to now. We have gathered data showing that *CERKL* protects cells from oxidative stress [14] and, lately, in our *Cerkl*<sup>-/-</sup> murine model, in favor of a consistent and notable decrease of the retinal sphingolipid content particularly, the glucosyl/galactosylceramide species [16]. Although these results could be suggestive of *CERKL* and glucosylceramide involvement against oxidative stress, we still are far from understanding *CERKL* role in pathogenesis. In this work, we have aimed to gain new insights into *CERKL* retinal function generating a zebrafish knockdown model.

Transfection of ZFCerkl in cultured COS-7 cells supported the dynamic nuclear-cytoplasmic localization (Fig. 1) and the NLS2 major role in directing nuclear trafficking as previously described in human [13]. The role of CERKL in the nucleus is still unclear and does not seem to be related to the transcriptional regulation of sphingolipid-related genes [16]. However, the physiological relevance of NLS2 is stressed by its structural conservation across species and R106S, a mutation- causing RP precisely located in this domain [6].

We have shown that high transcriptional complexity of CERKL in mammals (namely human and mouse) arise from the combination of tissue-specific promoters (among them *NEUROD1*) and alternative splicing [17], [18], [19]. Although the regulatory meaning of AS is largely unknown, even sometimes considered as background spliceosomal noise [45], [46], [47], it could also be related to the fine-tuning of key biological processes. Interestingly, recent work has revealed that adaptive novelties have arisen through changes in AS regulation, as ganglion-specific splicing of *TRPV1* underlies infrared sensation in vampire bats [48]. Thus, we aimed to assess *cerkl* transcript diversity in zebrafish, as well as in frog and gallus, and compare it with the reported for mouse and human. Our results suggested that mammals exhibited the highest AS levels. Our data on vertebrate identified transcripts, showed that the full length (13 exons) coding region was the only isoform shared, and that AS events were seldom conserved in *CERKL*. In terms of exon cassettes, exons 3, 4 and 5 were alternatively spliced only in human and mouse, which supported an evolutionary novelty acquired at some point in the mammalian lineage. Concerning the identification in mouse and chicken of alternative exons between exon 5 and 6 (5b), both bearing a premature stop codon, the convergent inclusion of introns seems the most probably scenario, although an homologous origin could not be fully discarded. Our data are in agreement with the low level of conservation of AS events between vertebrate groups, especially those involving reading frame disruption [49], [50]. Interestingly, the use of *NEUROD1* as an alternative promoter for *CERKL* expression appears to be restricted to the amniote species analysed (Fig. 4). Concerning translation, the shorter N-terminal Cerkl protein isoform of zebrafish is the truncated species that mostly resembles the corresponding size variant of mammals.

*Cerkl* morpholino knockdown treatment in wild-type zebrafish embryos clearly affected eye size (Fig. 5) and retinal morphology. At 72 hpf, morphant retinas were defective in lamination and the photoreceptors lacked the outer segments, normally present at this stage (Fig. 6). The number of apoptotic retinal cells was significantly increased in Cerkl-deficient embryos. Cell death did not appear to affect other ocular structures, as cornea and RPE, which highlighted that *cerkl* knockdown effects were restricted to the retina. Similar defects have also been observed for genes encoding transcription factors (e.g., *math5*, *NR2E3*) [51], [52], cell cycle regulators (e.g., *Cdkn1b/c*, *cdk5*) [53],

and photoreceptor ciliary proteins (e.g., RPGR, RP2, TOPORS, BBS9) [54], [55], [56], [57]. Whether the shared phenotype reveals functional overlaps or secondary effects of retinal neurodegeneration, remains to be elucidated. The analysis of different early retinal development markers in acMO morphants suggested that *Cerkl* might contribute to the cell survival but not to cell proliferation or differentiation during the early retina development (Fig. 8), in agreement with the reported anti-apoptotic effects reported in cell cultures and animal models [14], [19], [58].

*CERKL* mutations causing RP and CRD disorders are inherited as an autosomal recessive trait. Unlike the phenotype observed in zebrafish *cerkl*-knockdown embryos, patients do not exhibit developmental abnormalities, and neurodegeneration begins at the second-third decade of life. In addition to a dose-dependent effect, another plausible explanation for the lack of developmental defects in humans may be an increased level of complexity, redundancy or robustness in the retinal gene network of mammals that allows for compensation during embryonic development, but fails to maintain a proper function in adulthood.

In conclusion, we propose that although human, mouse and zebrafish *CERKL* phenotype features could be partially dose-dependent, further experiments are needed to identify the functional relevance of each isoform and their individual contribution to the pathogenic threshold. Moreover, the species-specific differences observed deserve further analysis at the temporal and cell-specific level. Interestingly, the availability of a zebrafish model is a powerful tool to elucidate how *cerkl* depletion results in the occurrence of apoptotic cell death after defective retinal lamination and photoreceptor outer segment formation, and provides new scenarios to understand human retinal degeneration.

## Acknowledgments

We would like to acknowledge the generous support and technical advice from Dr. Carolina Minguillón, Dr. Maria Marsal, Amayra Hernández-Vega and Xavier Esteban on *Danio rerio* manipulation and mating. The cDNAs from *Xenopus tropicalis* and *Gallus gallus* were a kind gift from Dr. José Luis Ferran. We also want to thank Manuel Irimia for his help with RNA-seq analysis and Enrique Navas for helping with the laboratory experiments. M. R. and D.B. were in receipt of the fellowships FPU AP2007-00805 and BMC2008-03776, respectively. This study was supported by grants SAF2009-08079 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España) and SGR2009-1427 (Generalitat de Catalunya), CIBERER (U718), Retina Asturias and ONCE to R. G.-D and BFU2011-23291 (Ministerio de Ciencia e Innovación) and ICREA Academia Prize (Generalitat de Catalunya) to J. G.-F.

## References

1. den Hollander, A.I., Black, A., Bennett, J., and Cremers, F.P., *Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies*. J Clin Invest, 2010. **120**(9): p. 3042-53.
2. Berger, W., Kloeckener-Gruissem, B., and Neidhardt, J., *The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases*. Prog Retin Eye Res, 2010. **29**(5): p. 335-75.
3. Tuson, M., Marfany, G., and Gonzalez-Duarte, R., *Mutation of CERKL, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26)*. Am J Hum Genet, 2004. **74**(1): p. 128-38.
4. Auslender, N., Sharon, D., Abbasi, A.H., Garzosi, H.J., Banin, E., et al., *A common founder mutation of CERKL underlies autosomal recessive retinal degeneration with early macular involvement among Yemenite Jews*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(12): p. 5431-8.
5. Pomares, E., Marfany, G., Brion, M.J., Carracedo, A., and Gonzalez-Duarte, R., *Novel high-throughput SNP genotyping cosegregation analysis for genetic diagnosis of autosomal recessive retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis*. Hum Mutat, 2007. **28**(5): p. 511-6.
6. Ali, M., Ramprasad, V.L., Soumittra, N., Mohamed, M.D., Jafri, H., et al., *A missense mutation in the nuclear localization signal sequence of CERKL (p.R106S) causes autosomal recessive retinal degeneration*. Mol Vis, 2008. **14**: p. 1960-4.
7. Avila-Fernandez, A., Riveiro-Alvarez, R., Vallespin, E., Wilke, R., Tapias, I., et al., *CERKL mutations and associated phenotypes in seven Spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(6): p. 2709-13.
8. Tang, Z., Wang, Z., Wang, Z., Ke, T., Wang, Q.K., et al., *Novel compound heterozygous mutations in CERKL cause autosomal recessive retinitis pigmentosa in a nonconsanguineous Chinese family*. Arch Ophthalmol, 2009. **127**(8): p. 1077-8.
9. Aleman, T.S., Soumittra, N., Cideciyan, A.V., Sumaroka, A.M., Ramprasad, V.L., et al., *CERKL mutations cause an autosomal recessive cone-rod dystrophy with inner retinopathy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(12): p. 5944-54.
10. Littink, K.W., Koenekoop, R.K., van den Born, L.I., Collin, R.W., Moruz, L., et al., *Homozygosity mapping in patients with cone-rod dystrophy: novel mutations and clinical characterizations*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(11): p. 5943-51.
11. Sugiura, M., Kono, K., Liu, H., Shimizugawa, T., Minekura, H., et al., *Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization*. J Biol Chem, 2002. **277**(26): p. 23294-300.
12. Bornancin, F., Mechtcheriakova, D., Stora, S., Graf, C., Wlachs, A., et al., *Characterization of a ceramide kinase-like protein*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1687**(1-3): p. 31-43.
13. Inagaki, Y., Mitsutake, S., and Igarashi, Y., *Identification of a nuclear localization signal in the retinitis pigmentosa-mutated RP26 protein, ceramide kinase-like protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **343**(3): p. 982-7.
14. Tuson, M., Garanto, A., Gonzalez-Duarte, R., and Marfany, G., *Overexpression of CERKL, a gene responsible for retinitis pigmentosa in humans, protects cells from apoptosis induced by oxidative stress*. Mol Vis, 2009. **15**: p. 168-80.
15. Nevet, M.J., Vekslin, S., Dizhoor, A.M., Olshevskaya, E.V., Tidhar, R., et al., *Ceramide Kinase-Like (CERKL) Interacts with Neuronal Calcium Sensor Proteins in the Retina in a Cation-Dependent Manner*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. **53**(8): p. 4565-74.
16. Garanto, A., Nawajes, M.M., Egado-Gabás, M., Marfany, G., Fabriàs, G., et al., *Specific sphingolipid content decrease in Cerkl knockdown mouse retinas*. Experimental Eye Research, 2013. **In press**.
17. Vekslin, S. and Ben-Yosef, T., *Spatiotemporal expression pattern of ceramide kinase-like in the mouse retina*. Mol Vis, 2010. **16**: p. 2539-49.
18. Garanto, A., Riera, M., Pomares, E., Permanyer, J., de Castro-Miro, M., et al., *High transcriptional complexity of the retinitis pigmentosa CERKL gene in human and mouse*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(8): p. 5202-14.
19. Garanto, A., Vicente-Tejedor, J., Riera, M., de la Villa, P., Gonzalez-Duarte, R., et al., *Targeted knockdown of Cerkl, a retinal dystrophy gene, causes mild affectation of the retinal ganglion cell layer*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(8): p. 1258-69.
20. Rivas, M.A. and Vecino, E., *Animal models and different therapies for treatment of retinitis pigmentosa*. Histol Histopathol, 2009. **24**(10): p. 1295-322.

21. Graf, C., Niwa, S., Muller, M., Kinzel, B., and Bornancin, F., *Wild-type levels of ceramide and ceramide-1-phosphate in the retina of ceramide kinase-like-deficient mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **373**(1): p. 159-63.
22. Lieschke, G.J. and Currie, P.D., *Animal models of human disease: zebrafish swim into view*. *Nat Rev Genet*, 2007. **8**(5): p. 353-67.
23. Morris, A.C., *The genetics of ocular disorders: insights from the zebrafish*. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2011. **93**(3): p. 215-28.
24. Gestri, G., Link, B.A., and Neuhauss, S.C., *The visual system of zebrafish and its use to model human ocular diseases*. *Dev Neurobiol*, 2011. **72**(3): p. 302-27.
25. Maurer, C.M., Huang, Y.Y., and Neuhauss, S.C., *Application of zebrafish oculomotor behavior to model human disorders*. *Rev Neurosci*, 2011. **22**(1): p. 5-16.
26. Fadool, J.M. and Dowling, J.E., *Zebrafish: a model system for the study of eye genetics*. *Prog Retin Eye Res*, 2008. **27**(1): p. 89-110.
27. Dowling, J., *The Retina: An Approachable Part of the Brain*. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1987.
28. Kay, J.N., Link, B.A., and Baier, H., *Staggered cell-intrinsic timing of ath5 expression underlies the wave of ganglion cell neurogenesis in the zebrafish retina*. *Development*, 2005. **132**(11): p. 2573-85.
29. Labbe, R.M., Irimia, M., Currie, K.W., Lin, A., Zhu, S.J., et al., *A comparative transcriptomic analysis reveals conserved features of stem cell pluripotency in planarians and mammals*. *Stem Cells*, 2012. **30**(8): p. 1734-45.
30. Thisse, C. and Thisse, B., *High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos*. *Nat Protoc*, 2008. **3**(1): p. 59-69.
31. Yan, Y.L., Miller, C.T., Nissen, R.M., Singer, A., Liu, D., et al., *A zebrafish sox9 gene required for cartilage morphogenesis*. *Development*, 2002. **129**(21): p. 5065-79.
32. Carre, A., Graf, C., Stora, S., Mechtcheriakova, D., Csonga, R., et al., *Ceramide kinase targeting and activity determined by its N-terminal pleckstrin homology domain*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **324**(4): p. 1215-9.
33. Li, Z., Hu, M., Ochocinska, M.J., Joseph, N.M., and Easter, S.S., Jr., *Modulation of cell proliferation in the embryonic retina of zebrafish (Danio rerio)*. *Dev Dyn*, 2000. **219**(3): p. 391-401.
34. Luo, J., Uribe, R.A., Hayton, S., Calinescu, A.A., Gross, J.M., et al., *Midkine-A functions upstream of Id2a to regulate cell cycle kinetics in the developing vertebrate retina*. *Neural Dev*, 2012. **7**(1): p. 33.
35. Pauli, A., Valen, E., Lin, M.F., Garber, M., Vastenhouw, N.L., et al., *Systematic identification of long noncoding RNAs expressed during zebrafish embryogenesis*. *Genome Res*, 2012. **22**(3): p. 577-91.
36. Scott, G.R. and Johnston, I.A., *Temperature during embryonic development has persistent effects on thermal acclimation capacity in zebrafish*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(35): p. 14247-52.
37. Ulitsky, I., Shkumatava, A., Jan, C.H., Subtelny, A.O., Koppstein, D., et al., *Extensive alternative polyadenylation during zebrafish development*. *Genome Res*, 2012. **22**(10): p. 2054-66.
38. Yang, D., Liu, Q., Yang, M., Wu, H., Wang, Q., et al., *RNA-seq liver transcriptome analysis reveals an activated MHC-I pathway and an inhibited MHC-II pathway at the early stage of vaccine immunization in zebrafish*. *BMC Genomics*, 2012. **13**: p. 319.
39. Brockerhoff, S.E. and Fadool, J.M., *Genetics of photoreceptor degeneration and regeneration in zebrafish*. *Cell Mol Life Sci*, 2011. **68**(4): p. 651-9.
40. Wittkopp, N., Huntzinger, E., Weiler, C., Sauliere, J., Schmidt, S., et al., *Nonsense-mediated mRNA decay effectors are essential for zebrafish embryonic development and survival*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(13): p. 3517-28.
41. Abrams, J.M., White, K., Fessler, L.I., and Steller, H., *Programmed cell death during Drosophila embryogenesis*. *Development*, 1993. **117**(1): p. 29-43.
42. Rodriguez-Mari, A., Canestro, C., Bremiller, R.A., Nguyen-Johnson, A., Asakawa, K., et al., *Sex reversal in zebrafish fancl mutants is caused by Tp53-mediated germ cell apoptosis*. *PLoS Genet*, 2010. **6**(7): p. e1001034.
43. Lakowski, J., Majumder, A., and Lauderdale, J.D., *Mechanisms controlling Pax6 isoform expression in the retina have been conserved between teleosts and mammals*. *Dev Biol*, 2007. **307**(2): p. 498-520.
44. Nishida, A., Furukawa, A., Koike, C., Tano, Y., Aizawa, S., et al., *Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development*. *Nat Neurosci*, 2003. **6**(12): p. 1255-63.
45. Melamud, E. and Moults, J., *Stochastic noise in splicing machinery*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(14): p. 4873-86.

46. Melamud, E. and Moulton, J., *Structural implication of splicing stochasticity*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(14): p. 4862-72.
47. Ellis, J.D., Barrios-Rodiles, M., Colak, R., Irimia, M., Kim, T., et al., *Tissue-specific alternative splicing remodels protein-protein interaction networks*. Mol Cell, 2012. **46**(6): p. 884-92.
48. Gracheva, E.O., Cordero-Morales, J.F., Gonzalez-Carcacia, J.A., Ingolia, N.T., Manno, C., et al., *Ganglion-specific splicing of TRPV1 underlies infrared sensation in vampire bats*. Nature, 2011. **476**(7358): p. 88-91.
49. Barbosa-Morais, N.L., Irimia, M., Pan, Q., Xiong, H.Y., Gueroussov, S., et al., *The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species*. Science, 2012. **338**(6114): p. 1587-93.
50. Merkin, J., Russell, C., Chen, P., and Burge, C.B., *Evolutionary dynamics of gene and isoform regulation in Mammalian tissues*. Science, 2012. **338**(6114): p. 1593-9.
51. Wang, S.W., Kim, B.S., Ding, K., Wang, H., Sun, D., et al., *Requirement for math5 in the development of retinal ganglion cells*. Genes Dev, 2001. **15**(1): p. 24-9.
52. Haider, N.B., Naggert, J.K., and Nishina, P.M., *Excess cone cell proliferation due to lack of a functional NR2E3 causes retinal dysplasia and degeneration in rd7/rd7 mice*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(16): p. 1619-26.
53. Dyer, M.A. and Cepko, C.L., *p27Kip1 and p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations*. J Neurosci, 2001. **21**(12): p. 4259-71.
54. Shu, X., Zeng, Z., Gautier, P., Lennon, A., Gakovic, M., et al., *Zebrafish Rpgr is required for normal retinal development and plays a role in dynein-based retrograde transport processes*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(4): p. 657-70.
55. Shu, X., Zeng, Z., Gautier, P., Lennon, A., Gakovic, M., et al., *Knockdown of the zebrafish ortholog of the retinitis pigmentosa 2 (RP2) gene results in retinal degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(6): p. 2960-6.
56. Veleri, S., Bishop, K., Dalle Nogare, D.E., English, M.A., Foskett, T.J., et al., *Knockdown of Bardet-Biedl syndrome gene BBS9/PTHB1 leads to cilia defects*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e34389.
57. Chakarova, C.F., Khanna, H., Shah, A.Z., Patil, S.B., Sedmak, T., et al., *TOPORS, implicated in retinal degeneration, is a cilia-centrosomal protein*. Hum Mol Genet, 2012. **20**(5): p. 975-87.
58. Mandal, N.A., Tran, J.T., Saadi, A., Rahman, A.K., Huynh, T.P., et al., *Expression and localization of CERKL in the mammalian retina, its response to light-stress, and relationship with NeuroD1 gene*. Exp Eye Res, 2012. **106**: p. 24-33.

## Figure legends

**Figure 1. Human and zebrafish CERKL protein domains.** (A) The reported hCERKL (NP\_963842) protein domains described by either sequence homology (PH, pleckstrin homology; DAGK, diacylglycerol kinase and ATPbs, ATP binding site domains) or by functional analysis (NLS, nuclear localization signals; NES, nuclear export signals) and their conservation in zebrafish is shown in percentage of identity. (B-D) ZFCerkl-HA shares with human CERKL the dynamic subcellular localization in COS-7 transfected cells, shifting from the cytoplasm to the nucleus. Nuclei were stained with DAPI. Images correspond to individual optical sections. Photographs were at x63 magnification. (B) In most cells, ZFCerkl shows a uniform distribution in the cytosol and is absent from the nucleus. (C) Some cells per field showed localization of Cerkl in both, the cytosol and the nucleus, with clear exclusion from the nucleoli (white arrow). (D) Rarely Cerkl contributes to cytosolic aggregates.

**Figure 2. Expression of *cerkl* transcripts during embryonic development and adult tissues.** (A) Temporal and spatial expression of zebrafish (*Dre*) *cerkl* assessed by RT-PCR (top) and RNA-seq data retrieved from databases (bottom) at different developmental stages and adult tissues. (B and C) Expression of *cerkl* in developmental stages and tissues of frog (*Xtr*) and chicken (*Gga*). hpf, hours post-fertilisation; dpf, days post-fertilisation; st, stage.

**Figure 3. *Cerkl* *in situ* hybridization on embryo and adult zebrafish.** (A and B) Whole-mount RNA *in situ* hybridization analysis showing *cerkl* expression in the retina and brain of embryos at 24 and 50 hpf. R, retina; L, lens. (C and D) *In situ* hybridization on zebrafish retina cryosections of 72 hpf embryos and adult tissue. *Cerkl* expression is detected in the three nuclear layers of the embryo retina, whereas adult expression appears in the inner segment of the photoreceptors and some cells located at the basal layer of the INL. Positive control (antisense *CRX*), strongly labels the inner photoreceptor segment and inner nuclear layer. The negative control was performed with sense *cerkl*. RPE, retinal pigment epithelium; PR, photoreceptor; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer.

**Figure 4. Alternatively spliced *cerkl* isoforms in vertebrates.** (A) Scheme of the *cerkl* mRNA transcripts identified in zebrafish (*Dre*), frog (*Xtr*) and chicken (*Gga*). Exons are boxed and the coding sequence (CDS) for each isoform, considering the largest ORF, is shown in black. Grey boxes represent alternative ORFs. Protein length (in aa) is indicated (right column). (B) Schematic view of *CERKL* gene structure as well as the translational impact of all alternative exons (AEs) detected in

*Danio rerio* (Dre), *Xenopus tropicalis* (Xtr), *Gallus gallus* (Gga), *Mus musculus* (Mmu) and *Homo sapiens* (Hsa). Exons preserved in all protein isoforms are shown by empty boxes. AEs are colored: light green, if when skipped, the ORF is not altered; dark green for those that maintain the ORF when skipped together; red, if they contain an in-frame stop codon and thus, when preserved, produce a truncated C-terminus protein. In blue, exonic sequences that, when skipped, the ORF generates a premature stop codon; black underlined flattened boxes indicate partial/complete intron retention associated to truncated peptides, purple depicts the regions preserved when *NEUROD1* promotes transcription. The latter isoforms lead to whole exon 1 depletion and subsequent loss of the conventional initiator methionine. In the canonical human and zebrafish *CERKL* first exon two donor splice sites are contained, one at the 3'end of the exon, and the other in the middle (the boundary shown in orange). When this second splice site is used, protein translation begins in exon 5. Asterisks show initiator methionines validated in human only but conserved among vertebrates. A methionine in exon 2 of *Gallus gallus* that could be used to initiate translation when exon 1 is skipped is depicted by a triangle. The number of *CERKL* isoforms in each species is indicated (right column). PTC: premature termination codon; TIS: translation initiation site.

**Figure 5. Effects of ZFcerkl silencing in eye development.** (A) Two morpholinos targeting an acceptor (acMO) and donor splice site (doMO) of *ZFcerkl* were used. The morpholino targeting site is depicted by a discontinuous line. To assess the knockdown effect, a RT-PCR analysis of control and *ZFcerkl* morphants injected with 8 ng of MO was performed (primers used are depicted with arrows). Silencing with acMO was almost complete, when compared with *cerkl* expression in 72 hpf control MO-injected embryos (coMO), whereas in doMO animals the WT spliced isoform was decreased by 35%.  $\beta$ -Actin was used for normalization. (B) acMO-injected embryos displayed either small eye phenotype (named mild phenotype) or very small eye, small head, and body and curved tail (named severe phenotype). White double-head arrows denote diameter of the eyes. \* denotes small and curved head in severe-phenotype morphants. (C) Phenotype frequency of morphants. The *cerkl*-knockdown phenotype was rescued when human *CERKL* mRNA was co-injected with acMO. n, number of individuals. (D) Eye size (in diameter) was measured in at least ten independent embryos from each group. Data were analyzed by *t*-test and are presented as mean  $\pm$  SEM. \*\*  $P < 0.001$ . Mean eye size was 253.4  $\mu$ m for control, 172.7  $\mu$ m for acMO and 239  $\mu$ m for doMO morphants.

**Figure 6. Eye histology in control and ZFcerkl morpholino-injected embryos at 72 hpf.** Knockdown of zebrafish *cerkl* causes inhibition of rod and cone outer segment formation. (A) Zebrafish eye sections were stained with H&E. Control morphants (coMO) showed normal retinal lamination with

three cell layers (GCL, INL, and ONL). In “mild” acMO-injected embryos, lamination did not occur and the three layers were not visible. The retinal pigment epithelium (RPE) developed normally in control and ZF*cerkl* morphants. **(B)** Immunostaining with anti-rhodopsin and **(C)** anti-PNA identified rod and cone outer segments, respectively, in control and doMO morphants. Outer segments were absent in acMO morphants. Nuclei were stained with DAPI. Some nonspecific staining was seen in the lens when stained with PNA. Photographs were at x40 magnification.

**Figure 7. Increased cell death in ZF*cerkl* morpholino (acMO)-injected embryos.** **(A)** Immunodetection of apoptosis by anti-active Caspase-3 in retina cryosections of 72 hpf control (coMO) and ZF*cerkl* morpholino-injected embryos (acMO and doMO). Caspase-3-positive cells (shown in red) increased in acMO morphants. Nuclei were stained with DAPI. **(B)** The percentage of apoptotic cells in each retina within a single cell layer was quantified in four independent embryos from each group, plotted and analysed by *t*-test. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* *P* = 0.005.

**Figure 8. Expression of retina cell markers in acMO-injected embryos at early developmental stages.** **(A and B)** At 22 and 24 hpf, the spatiotemporal pattern of *pax6a* (A) and *otx2* (B) in acMO-injected animals was similar to that of controls: *pax6a* was detected in the forebrain, hindbrain, spinal cord and eye, and *otx2* in the eye and midbrain. By 48 and becoming more evident at 72 hpf, acMO embryos exhibited a marked reduction in the expression of both markers. **(C)** The expression of the *ath5* transcription factor was assessed *in vivo* in acMO-injected embryos of the transgenic *ath5:GFP* strain. At 48 hpf, the wave of *ath5* expression, which prefigures the wave of retinal ganglion cell genesis, filled the central and peripheral retina of control embryos, whereas the pattern appeared delayed and disorganized in the acMO morphants, although RGC genesis was not fully abolished. \* denotes the ventronasal patch of RGC genesis.

**Supplementary Figure S1. Syntenic organization of the CERKL genomic region.** Schematic view of the structure and gene organization of the 1.8 Mb genomic locus encompassing *CERKL* in *Homo sapiens* (Hsa), *Xenopus tropicalis* (Xtr) and *Danio rerio* (Dre). The discontinuous lines in the *Xenopus* locus represent the end of the scaffold. Conserved genes are shown in color, while empty arrows depict the end of the syntenic region. Two chromosomal rearrangements are shown in the compared region: a tandem duplication of the *TTN* gene in zebrafish, located at the right border, and a chromosomal inversion encompassing 4 genes (at the left boundary, framed in red). Concerning the inverted segment, human and *Xenopus tropicalis* share gene order and orientation, suggesting

that the chromosome rearrangement took place after the split of tetrapod and teleost lineages. Ancestral condition is unknown, as basal vertebrate genome assemblies are not available.

**Supplementary Figure S2. Conservation of CERKL across different species.** Accession numbers for the amino acid sequence of each species are: NP\_963842, human (*Homo sapiens*); XP\_002799006, macaque (*Macaca mulatta*); XP\_002712274, rabbit (*Oryctolagus cuniculus*); NP\_001041641, mouse (*Mus musculus*); XP\_002932061, frog (*Xenopus tropicalis*), XP\_421973, chicken (*Gallus gallus*); NP\_001082943, zebrafish (*Danio rerio*).

**Supplementary Figure S3. Validation of cerkl morpholinos.** Transcriptional products obtained with the following sets of primers: **(A)** exons 3-5 and 11-13 for acMO samples, and **(B)** exons 8-10 and 11-13 for doMO samples. The comparable decrease in band intensity suggests transcript depletion in both cerkl morphants.



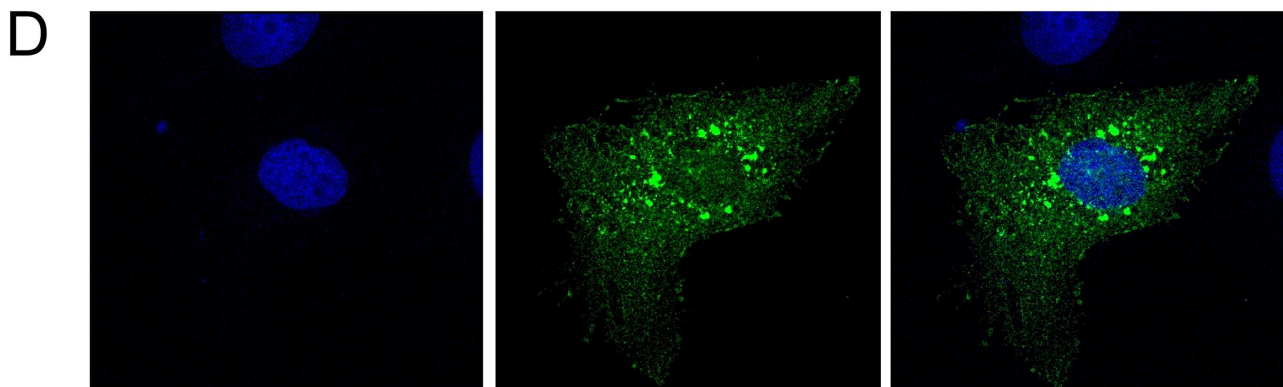
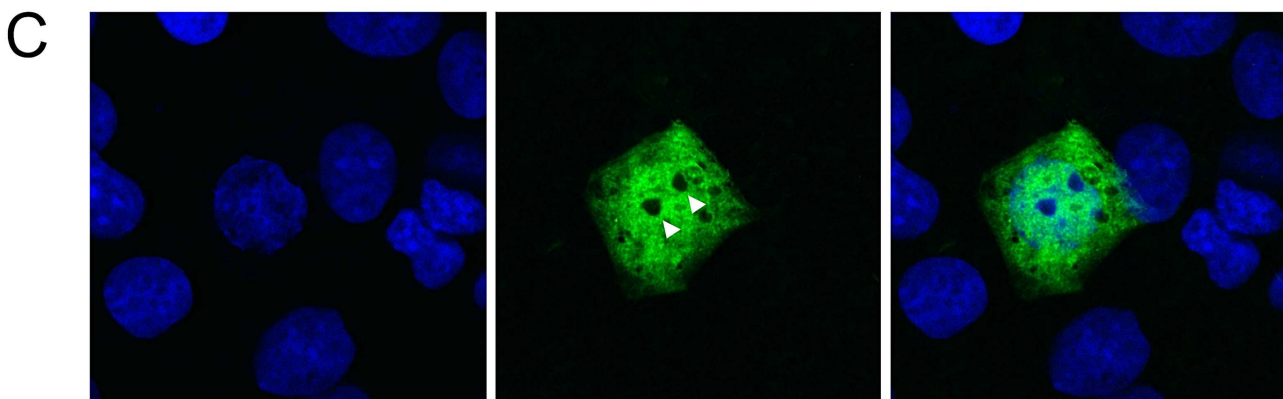
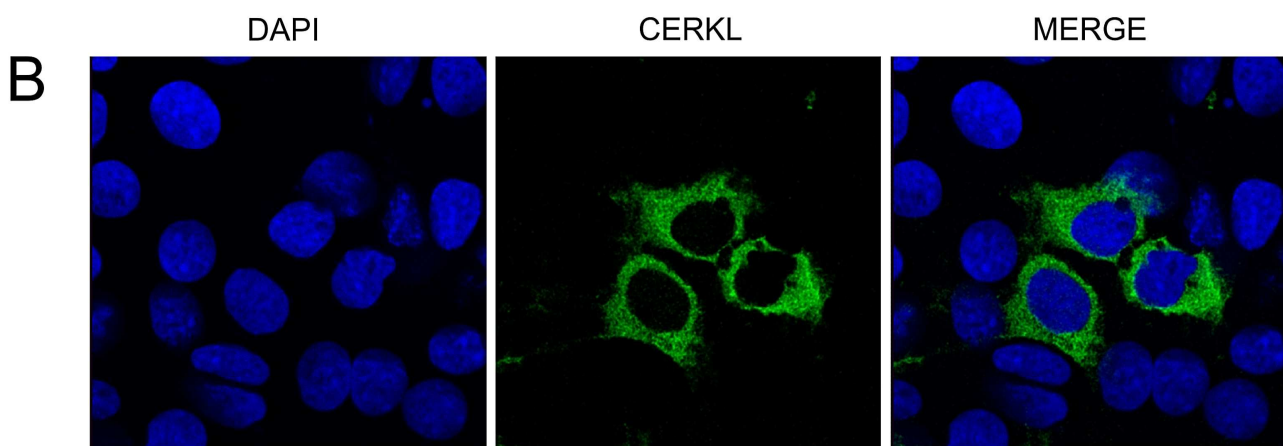
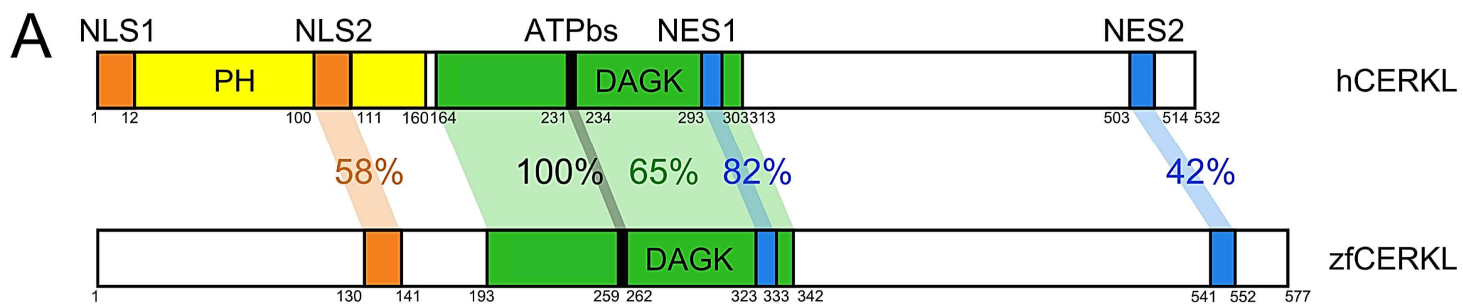


Figure 1

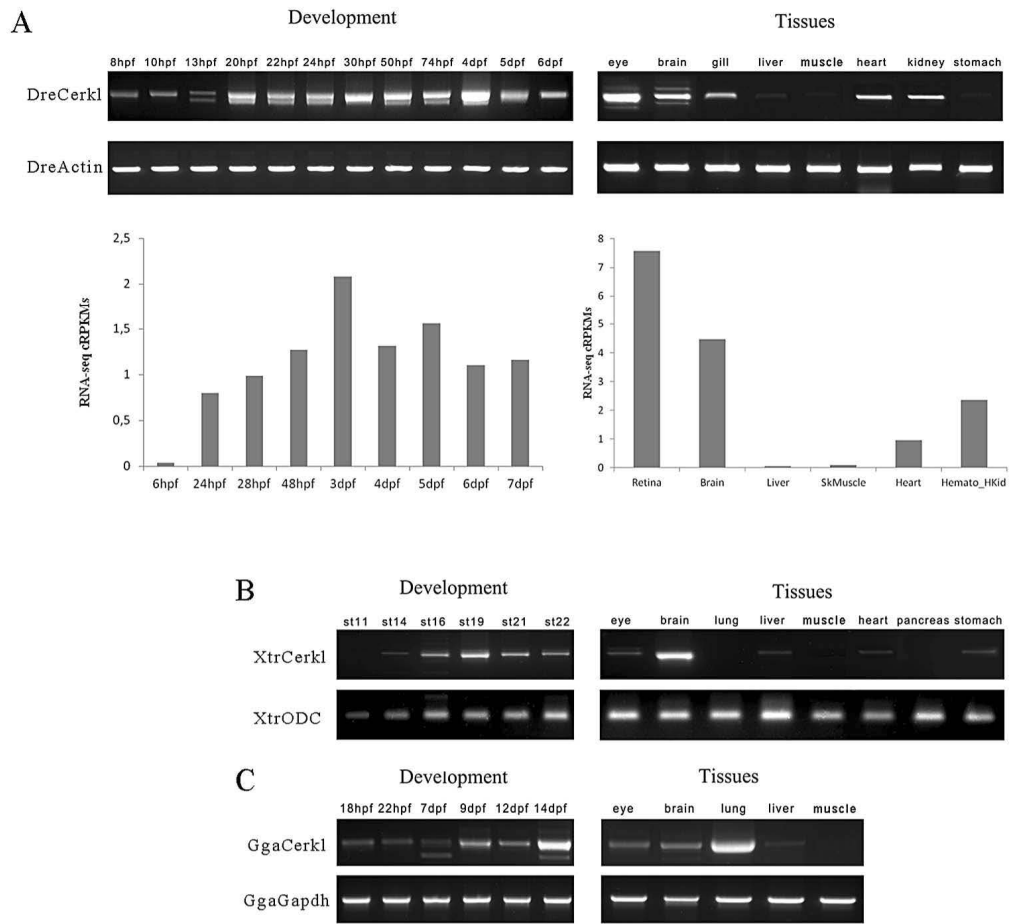


Figure 2

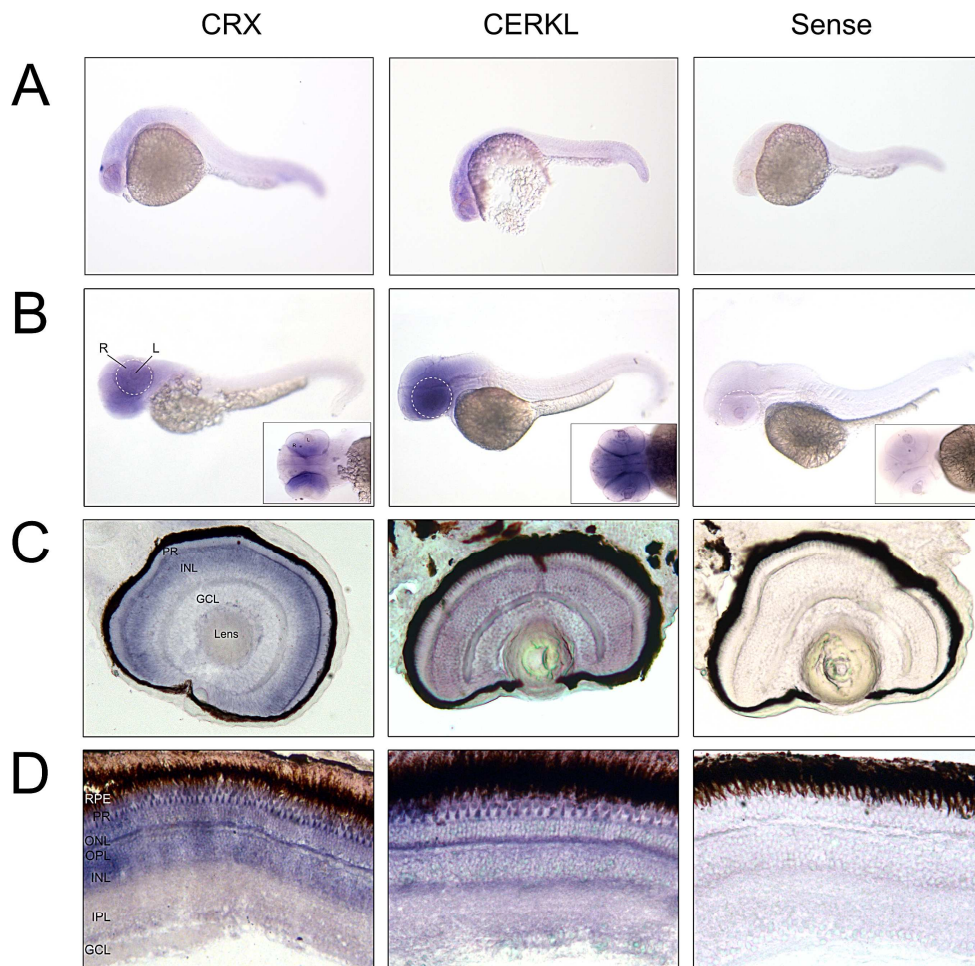
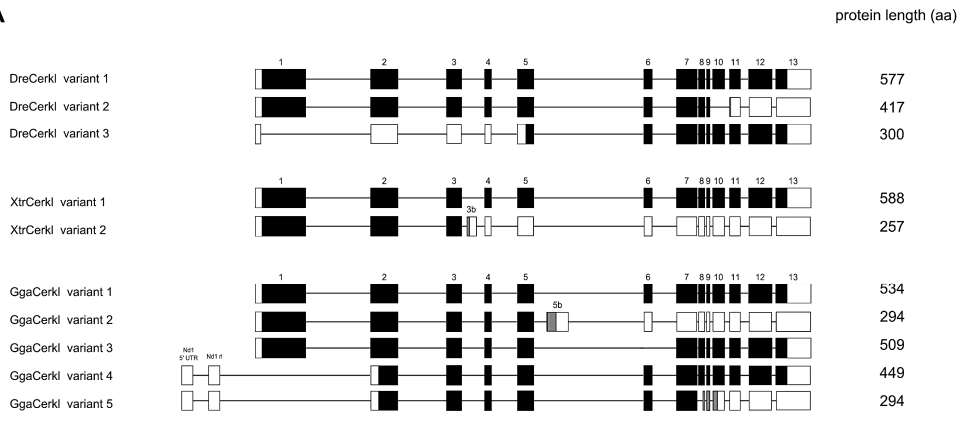


Figure 3

A



B

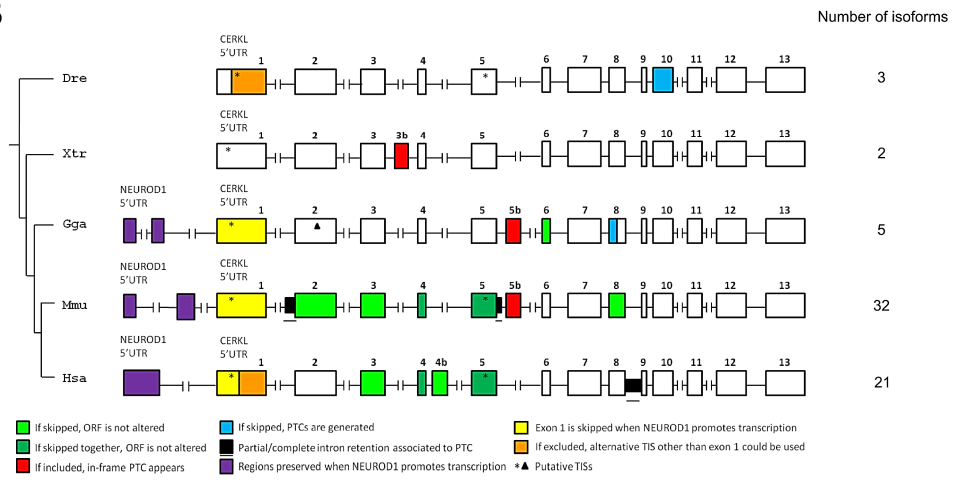


Figure 4

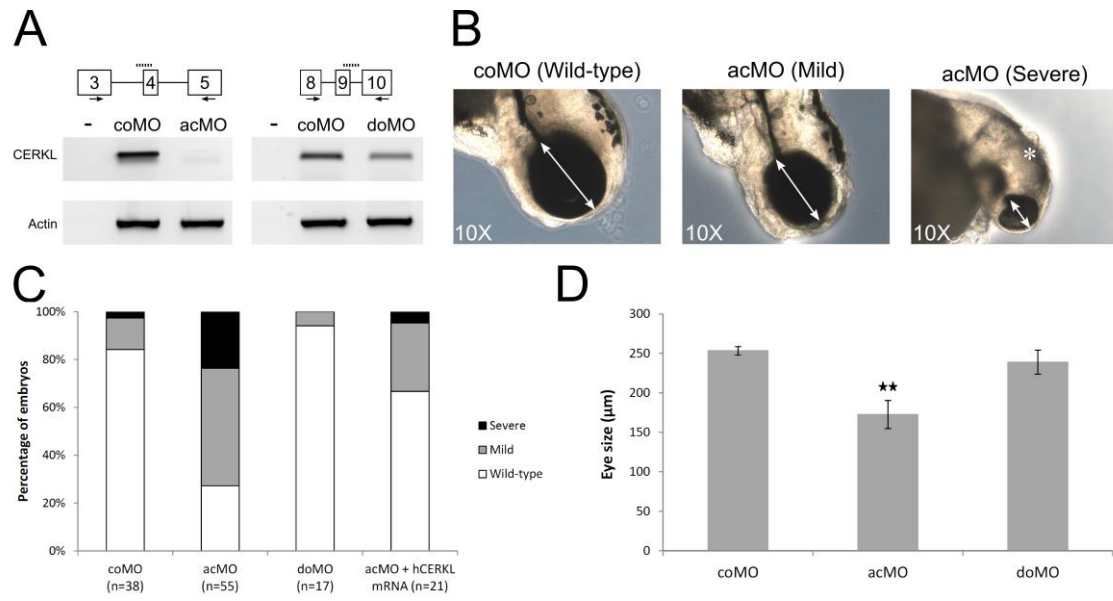


Figure 5

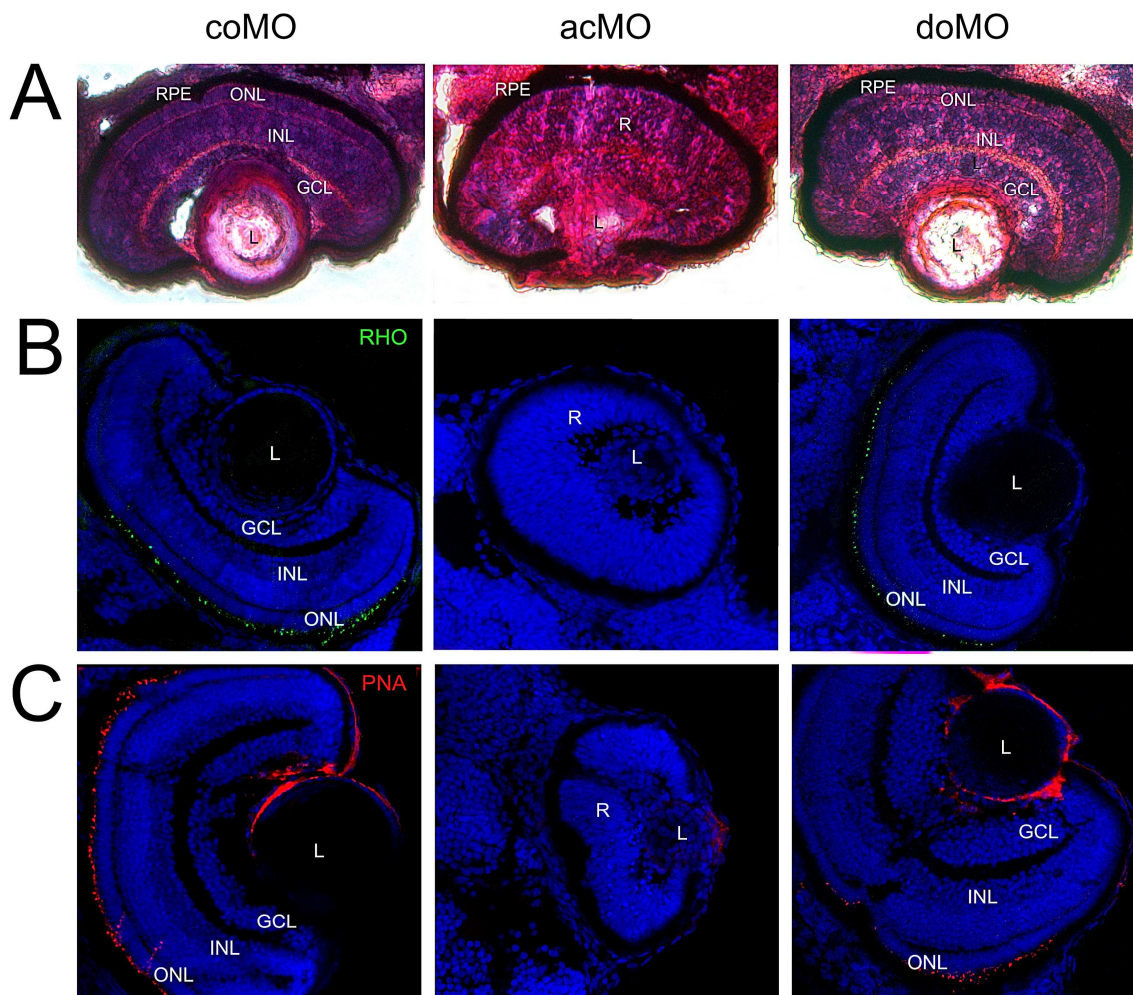


Figure 6

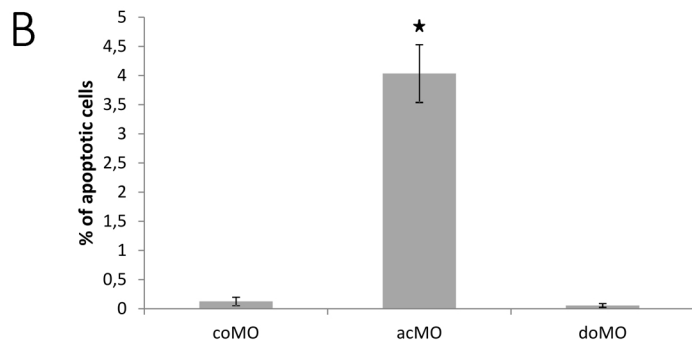
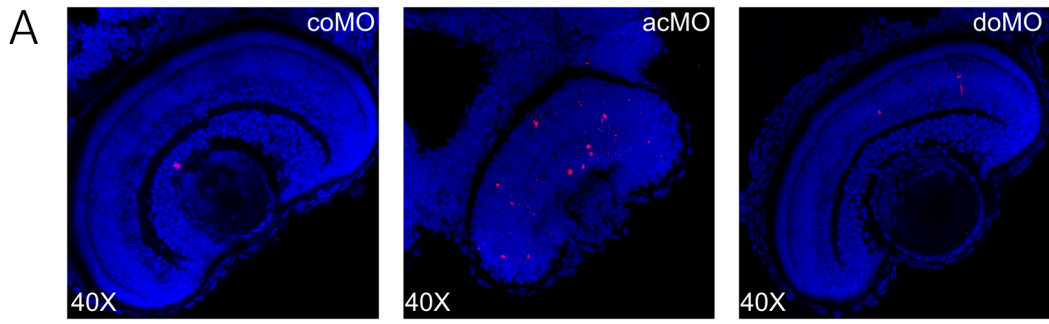


Figure 7

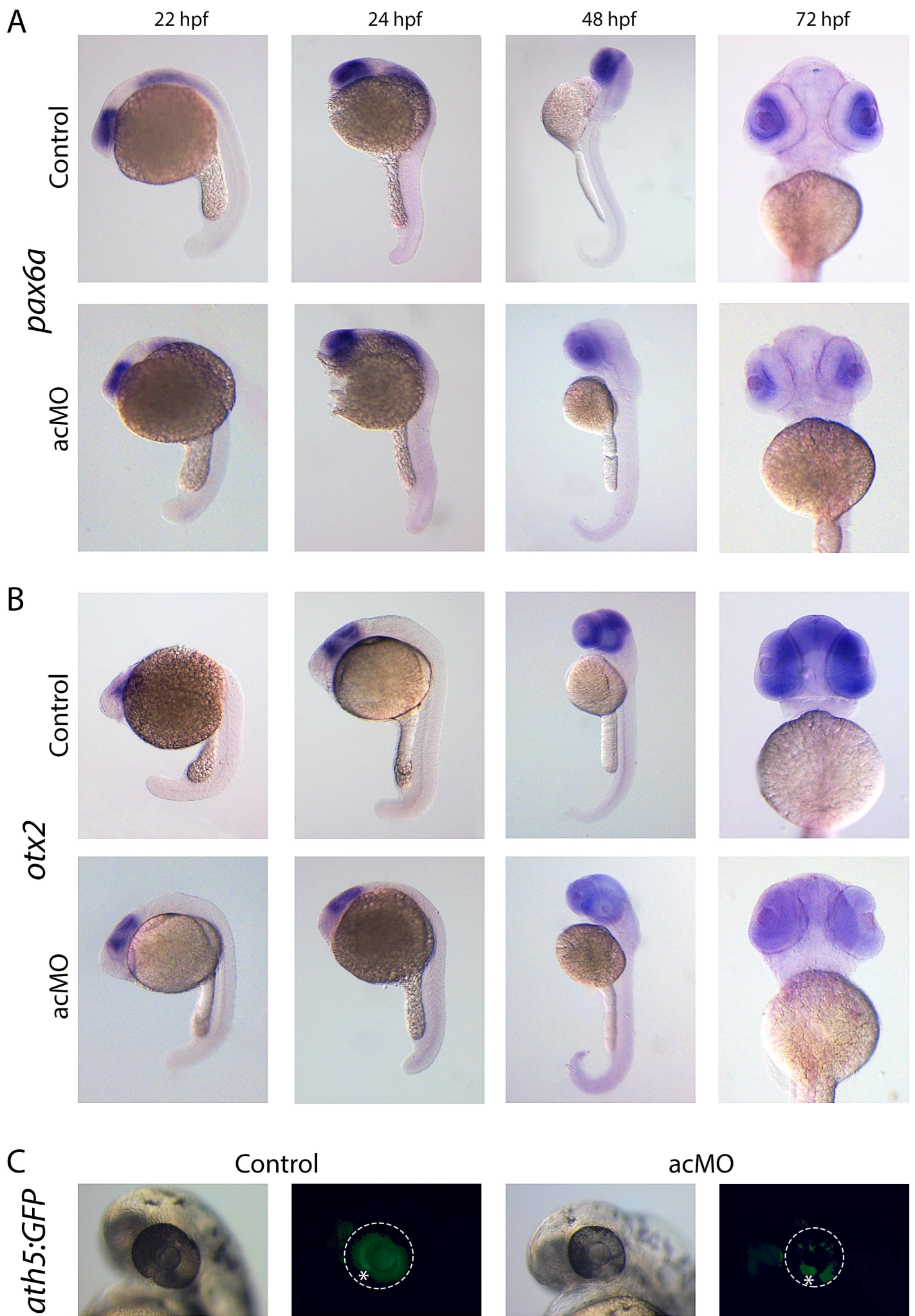


Figure 8

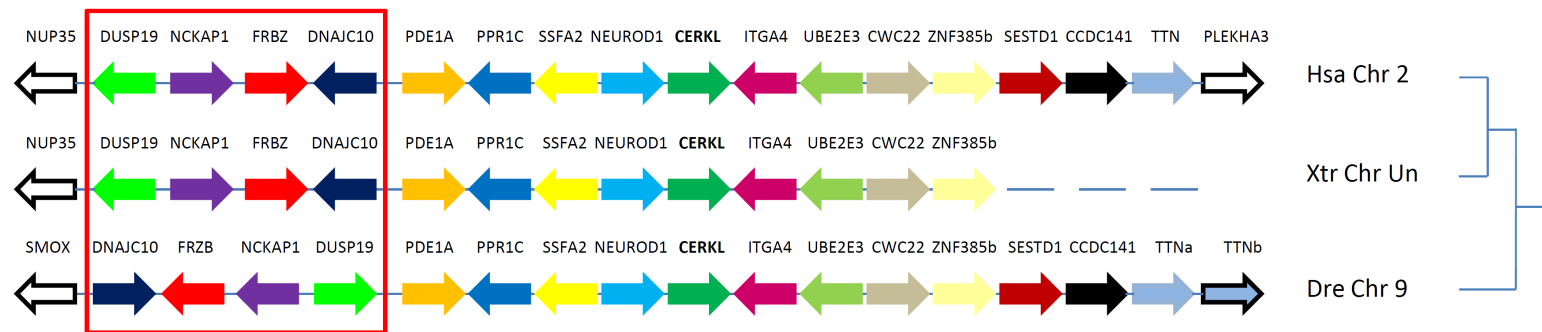


Figure S1



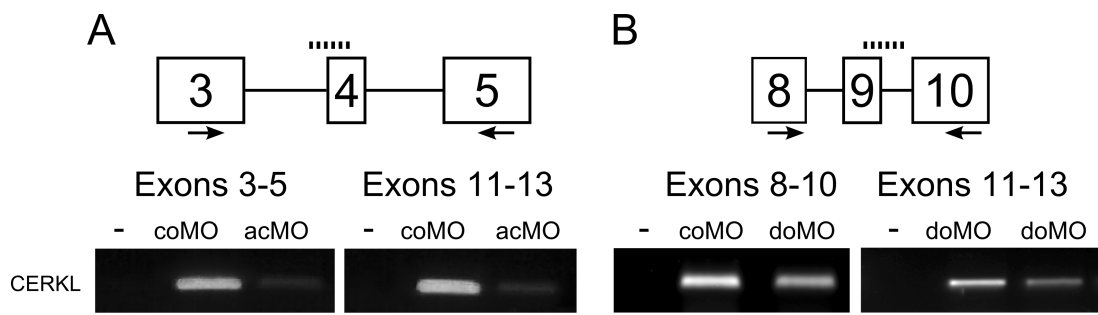


Figure S3



## CAPÍTOL 3

Estudi d'una mutació de *RP2* causant de XL-RP en una  
família espanyola

## PUBLICACIÓ 4

*Identification of an intronic single-point mutation in RP2 as the cause of  
semidominant X-linked retinitis pigmentosa*



## PUBLICACIÓ 4

## TÍTOL

“*An intronic single point mutation in RP2 causes semidominant X-linked Retinitis Pigmentosa*”

## AUTORS (ANY)

Esther Pomares\*, Marina Riera\*, Joaquín Castro-Navarro, Ángeles Andrés-Gutiérrez, Roser González-Duarte, Gemma Marfany

\*contribució equivalent al treball

## REFERÈNCIA

Investigative Ophthalmology and Visual Science 50: 5107-5114, 2009

## RESUM

Per tal d'abordar l'estudi genètic d'una família espanyola afectada de retinosi pigmentària amb herència lligada al cromosoma X (XL-RP) amb onze homes i dues dones afectes, ens vàrem proposar l'anàlisi dels dos gens XLRP descrits: *RPGR* i *RP2*. El primer, majoritari en aquest tipus d'herència, es compon de 23 exons i conté un hotspot mutacional ric en purines i repeticions de baixa complexitat. Aquest fragment és difícil d'analitzar per seqüenciació Sanger convencional, per aquest motiu, l'anàlisi d'aquest gen va consistir en la cosegregació de marcadors tipus SNP propers o intragènics, mentre que en el cas de *RP2*, el gen es va seqüenciar directament, donat que està format solament per cinc exons i no conté repeticions. L'estudi de cosegregació va descartar *RPGR* com al gen causant de la malaltia en aquesta família, mentre que la seqüenciació directa de *RP2* va revelar una nova mutació situada a la posició -9 de l'intró 3 del gen, c.1073 -9T>A, en la ristra de polipirimidines altament conservades i fonamentals en la regulació de l'*splicing*. Aquesta variant va resultar cosegregar amb la malaltia i no es va identificar en cap dels 220 cromosomes control analitzats. Diferents anàlisis *in silico* mitjançant programes de predicció varen indicar una disminució del valor d'*splicing* en la seqüència mutada, respecte l'assignada al lloc acceptor silvestre. La patogenicitat de la variant va ser, a més, testada *in vivo* i *in vitro*, mitjançant mostres de sang dels pacients i la construcció de minigens, respectivament. Les anàlisis de RT-PCR realitzades a partir de les mostres dels pacients, varen confirmar l'alteració del patró d'*splicing* dels transcrits d'*RP2* en els malalts; l'exó 4 era escindit durant la maduració del mRNA i es generava un codó *stop* prematur. A més, assajos amb *real-time* RT-PCR varen permetre quantificar la relació entre el transcrits silvestre i aberrant en cada pacient, fet que va permetre demostrar diferències en els nivells d'aquests entre les dones afectes i les portadores asimptomàtiques de la família. Finalment, les anàlisis *in vitro* varen corroborar la patogenicitat de la mutació puntual. En les dones portadores de la família, les diferències d'expressió de la còpia silvestre respecte la mutada comporten un ampli ventall de fenotips que van des de portadores completament asimptomàtiques fins a malaltes amb degeneració retinal molt severa, semblant a l'observada en els pacients masculins. Aquest nou cas de semi-

dominància en l'RP lligada al cromosoma X, demostra que el gen *RP2* també és un candidat per a aquest tipus d'herència.

#### **APORTACIÓ PERSONAL AL TREBALL**

L'aportació en el treball experimental de les dues primeres autores ha estat equivalent. La meua contribució ha estat la següent: a) l'estudi *in silico* de l'impacte de la nova mutació mitjançant programes de predicció *on line*, b) l'obtenció de RNA a partir de mostres de sang dels pacients i les dones portadores de la família, així com l'estudi de l'expressió de *RP2* en cada cas, c) el disseny i l'ús de la tècnica de Real-time RT-PCR i l'anàlisi posterior de les dades per a la quantificació dels diferents transcrits identificats, i d) el disseny i la construcció dels minigens de *RP2*, la seva transfecció en cèl·lules en cultiu i l'anàlisi d'expressió mitjançant RT-PCR.

# Identification of an Intronic Single-Point Mutation in *RP2* as the Cause of Semidominant X-linked Retinitis Pigmentosa

Esther Pomares,<sup>1,2,3,4</sup> Marina Riera,<sup>1,2,3,4</sup> Joaquín Castro-Navarro,<sup>5</sup> Ángeles Andrés-Gutiérrez,<sup>6</sup> Roser González-Duarte,<sup>1,2,3</sup> and Gemma Marfany<sup>1,2,3</sup>

**PURPOSE.** A large family with 11 males and 2 females with X-linked retinitis pigmentosa (XLRP) was analyzed in search of pathologic mutations.

**METHODS.** Of the two major XLRP genes, *RPGR* was analyzed by SNP cosegregation and *RP2* was directly screened for mutations. The pathogenicity of a new variant was assessed in silico, in vivo, and in vitro.

**RESULTS.** The results of cosegregation analysis with SNPs closely located to *RPGR* excluded this gene as the cause of the disease in this family. Sequencing of *RP2* showed a putative pathogenic variant in intron 3 at the conserved polypyrimidine tract (c.1073-9T>A). This substitution cosegregated with the disease and was not found in 220 control chromosomes. In silico analyses using online resources indicated a decreased score of intron 3 acceptor splice site for the mutated sequence. Real-time RT-PCR analysis of the *RP2* splicing pattern in blood samples of patients and carrier females showed skipping of exon 4, causing a frame shift that introduced a premature stop codon. Further verification of the pathogenicity of this point mutation was obtained by expression of a minigene *RP2* construct in cultured cells.

**CONCLUSIONS.** A transversion (T>A) at position -9 in intron 3 of *RP2* causes XLRP by altering the splicing pattern and highlights the pathogenicity of intronic variants. The single point *RP2* mutation leads to a wide range of phenotypic traits in carrier females, from completely normal to severe retinal degeneration, thus supporting that *RP2* is also a candidate for semi-

dominance in XLRP. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:5107-5114) DOI:10.1167/iovs.08-3208

Retinitis pigmentosa (RP) is a hereditary retinal disorder characterized by night blindness, peripheral constriction of visual fields and pigment spicule deposits in the midperiphery of the retina. RP is the most prevalent genetic cause of blindness in adults, affecting 1:3000 to 4000 individuals worldwide.<sup>1,2</sup> It is a highly heterogeneous disease at the clinical and genetic level. To date, more than 35 genes have been described, showing autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked (Retnet, <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>) provided in the public domain by the University of Texas Houston Health Science Center, Houston, TX) inheritance patterns. The X-linked forms (XLRP) are associated with the most severe phenotypes and account for approximately 9% to 10% of all the RP cases. Six loci have been mapped to the X chromosome, and only two major genes have been identified: *RPGR* (70%-80%) and *RP2* (7%-20% of the mutated alleles).<sup>3,4</sup>

The *RPGR* gene stretches at least 23 exons and produces many proteins through a complex pattern of alternative splicing.<sup>5,6</sup> This gene contains a mutational hotspot, ORF15, that presents a long purine-rich domain, full of low-complexity repeats. Most mutated alleles are insertions or deletions within these repeats.<sup>5,7</sup>

The *RP2* gene encompasses 5 exons, generates a 350 amino acid protein, and shows a wide pattern of expression.<sup>8</sup> Although its function has not been completely elucidated, recent reports associate *RP2* with protein complexes involved in the photoreceptor ciliary transport, as well as in the interaction between plasma membrane and cytoskeleton.<sup>9,10</sup>

We report the analysis of a large XLRP pedigree with a wide range of phenotypic variability in female carriers. We analyzed both *RPGR* and *RP2* and identified a pathogenic point mutation in intron 3 of *RP2*, c.1073-9T>A. This transversion caused a shift in the polypyrimidine stretch of the acceptor splicing site, decreasing recognition by the splicing machinery and causing the skipping of exon 4. Real-time RT-PCR, used to study the splicing pattern of *RP2* in blood samples, showed that the mutated allele favored the aberrant over the wild-type transcript. We further confirmed the pathogenicity of this allele by analyzing the splicing pattern in a minigene construct. Notably, the high levels of variation observed for *RP2*-spliced products in female carriers supports X chromosome-skewed inactivation as the cause of the disease in the affected females.

## MATERIAL AND METHODS

### Clinical Assessment of Patients

Our study was based on a large Spanish pedigree with branches currently living in three different countries (Spain, Italy, and Switzerland; see Fig. 1). All affected members had received the RP diagnosis several years ago through ophthalmic examination at the Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, Spain). In this study, detailed

From the <sup>1</sup>Departament de Genètica, Facultat de Biologia, and <sup>3</sup>IBUB (Institut de Biomedicina), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>CIBER-ER (Centre for Biomedical Research on Rare Diseases), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Servicio de Oftalmología, Unidad de Retina, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain; and <sup>6</sup>Neurofisiología Clínica, Hospital San Agustín, Avilés, Spain.

<sup>4</sup>Contributed equally to the work and therefore should be considered equivalent authors.

Supported by Fundaluce (2004), Grant BFU2006-04562 from the Ministerio de Educación y Ciencia, and Grant INTRA/07-08/718.1 from CIBERER (RG-D). EP was the recipient of an FPI fellowship from the Spanish Ministry of Education and Science (MEC) and is now under contract by CIBERER. MR was the recipient of a scholarship from Fundació Bidons Egara and is now the recipient of an FPU fellowship from MEC.

Submitted for publication November 24, 2008; revised March 2, 2009; accepted July 10, 2009.

Disclosure: E. Pomares, None; M. Riera, None; J. Castro-Navarro, None; A. Andrés-Gutiérrez, None; R. González-Duarte, None; G. Marfany, None

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Gemma Marfany, Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal 645, Barcelona E08028, Spain; gmarfany@ub.edu.

TABLE 1. Clinical Characteristics of Carriers III.16 and IV.11 and Patients IV.14, IV.16, and V.8

Individual and Sex	Age* (y)	RP Symptoms	Age of Onset	Progression	Visual Acuity (OD/OS)	Refraction (OD/OS)	Visual Field	Fundus	ERG
III.16/female†	60	No	—	—	1.0/1.0	90°-0.75/+2.00 90°-0.75/+2.25	Normal	Normal	Normal responses OU
IV.11/female†	41	No	—	—	0.8/0.9	10°-1.50/+1.50 155°-1.00/+1.50	Normal	Normal	Mildly altered cone response OU Highly altered OU
IV.14/female‡	29	Yes	22	Moderate	0.3/0.2	-1.5/-2.5	Highly altered OU	RPE atrophy, vascular attenuation, bone spicules	Highly altered OD/ altered OS
IV.16/female‡	30	Yes	24	Mild	0.1/0.7	5°-2.50/-7.00 170°-3.75/-4.50	Highly altered OD/altere OS	RPE atrophy, some vascular attenuation	Highly altered OD/ altered OS
V.8/male	13	Yes	5	Severe	0.3/0.1	-3.50/-5.50	Highly altered OU	General RPE atrophy, vascular attenuation, papillary drusen, and macular atrophy OU	Highly altered OU

\* Age at the time of the study.

† Obligate female carrier.

‡ Affected female.

clinical evaluation was obtained for patients IV14, IV16, and V.8, as well as the nonaffected obligate female carriers III.16 and IV.11, which included best corrected visual acuity and slit lamp biomicroscopy, followed by indirect ophthalmoscopy and fundus photography after pupillary dilation. The size and the extent of the visual-field defects were assessed with static perimetry (Humphrey; Carl Zeiss Meditec, Oberkochen, Germany). Electroretinograms (ERGs) were recorded in accordance with the protocol of the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) at the Hospital San Agustín (Avilés, Spain) (Table 1, and see Fig. 2).

**DNA Purification from Blood Samples**

DNA was obtained from blood samples of patients III.14, IV.7, IV.12, IV.14, IV.16, V.8, and V.9; obligate carrier females II.3, III.6, III.16, IV.11; and nonaffected males and females IV.6, V.7). Informed consent from all the family members was obtained, according to the tenets of the Declaration of Helsinki.

DNA from 110 matched control individuals of Spanish population was obtained from whole blood (Wizard Genomic DNA purification kit; Promega, Madison, WI).

**SNP Cosegregation *RPGR* Analysis**

Seven highly informative SNP markers (heterozygosity values higher than 0.3 according to HapMap, <http://www.hapmap.org/> provided in the public domain by the International HapMap Project, National Institutes of Health, Bethesda, MD), closely flanking the *RPGR* gene at 5' and 3' (Table 2), were genotyped by direct sequencing (BigDye ver. 3.1 kit in the Prism 3730 DNA sequencer; Applied Biosystems, Inc., [ABI], Carlsbad, CA) after genomic DNA PCR amplification. Haplotypes for cosegregation studies were constructed manually.

**Direct Mutational Screening of *RP2***

Five pairs of primers (Table 3) allowed the PCR amplification of *RP2* exons plus adjacent intronic sequences in the studied family members. All the fragments were sequenced (BigDye v3.1 kit; Prism 3730 DNA sequencer; ABI).

**Bioinformatic Analysis**

All the sequences were analyzed using sequence assembly software (Seqman; DNASTar, Madison, WI) software and aligned to the genomic wild-type *RP2* sequence from the public database UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/> provided in the public domain by UCSC Genome Bioinformatics, University of California at Santa Cruz, Santa Cruz, CA). The alignments were verified de visu.

SNP databases consulted were: dbSNP as implemented in the UCSC Genome Browser dbSNP of the NCBI server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> provided in the public domain by the National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MDS) and the mutation/SNPs databases for retinal disease genes reported in Retina International (<http://www.retina-international.org/scinews/database.htm/> provided

TABLE 2. SNPs for Cosegregation Analysis of the *RPGR* Gene

SNP	Distance (kb)*	Chromosome Position†
rs5964274	-334.7	37,737,017
rs2236153	-166.9	37,904,807
rs2268790	-164.5	37,907,201
<i>RPGR</i>		38,071,732-38,013,367
rs5917608	345.6	38,359,027
rs12839987	398.4	38,411,793

\* Negative and positive values indicate, respectively, upstream and downstream locations referring to the *RPGR* gene.

† According to the NCBI reference values at Map Viewer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD).

TABLE 3. Primers Used for the Amplification and Mutational Screening of *RP2* Exons

Exon	Primer Sequence (5'→3')	
	Forward	Reverse
1	AGGGTTCACGCCACACTCTAGG	AGCTATCCGGCTTCAAGAGTG
2	TGCCTGGCAGCCAATAGTCC	ACTTGAGGGTTCCTGTATTTC
3	AATCAGTGTGCTGTTGTGCATTT	GTCTAGGGCTCCTTGAGTGATGG
4	GATATGTCCCCTCTGTCTGC	CACACCCAAAAATTCACAGC
5	GGAGAACATGGGCTTTGGC	AAATTCTATATTCACAAGTTGGGAAAGG

in the public domain by Retinal International, Zurich, Switzerland) and Retinal Information Network (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>).

Splicing site score values of the wild-type and variant sequences of *RP2* were predicted online at SplicePort (<http://spliceport.cs.umd.edu/>) provided in the public domain by the University of Maryland, College Park, MD), Geneid (<http://genome.imim.es/genepredictions/index.html>) provided in the public domain by the Genome Bioinformatics Research Lab, Center for Genomic Regulation, Spanish Bioinformatics Institute, Barcelona, Spain) and BDGP (<http://www.fruitfly.org/>) Provided in the public domain by the Berkeley Drosophila Genome Project, University of California at Berkeley) (Table 4).

### RT-PCR Analyses of the *RP2* Splicing Pattern

Total RNA from patients and carriers III.14, III.16, IV.11, IV.14, IV.16, V.8 and V.9 (Fig. 1) were obtained after 300  $\mu$ L of blood was processed (previously stabilized with RNAlater; Ambion, Austin, TX) with a purification kit (RiboPure-Blood; Ambion), according to the manufacturer's instructions. First, cDNA chains were obtained by reverse transcription (Cells-to-cDNA kit; Ambion), with MMLV reverse transcriptase using 0.62  $\mu$ M oligo d(T) and 1.25  $\mu$ M random decamers, for 15 minutes at 37°C, 15 minutes at 39°C and finally, 45 minutes at 42°C. For RT-PCR of transfected cells, the first cDNA chain was obtained from total RNA after lysis of cells (Cells-to-cDNA kit; Ambion) and directly proceeding to perform the reverse transcription, as stated earlier.

Specific amplification of transcripts from endogenous blood *RP2*, mini *RP2* gene and *GAPDH* was performed using the corresponding primers: RP2f: 5'-GACAGAAGAGC AGCGATGAAT-3' (in exon 2); RP2r: 5'-CATATCCCCTCTGTATATCAGC-3' (in exon 5); GFPf: 5'-CGAGCTGTACAAGTCCGGCC-3' (in the C terminus of GFP); GFPr: 5'-GGTTCAGGGGGAGGTGTGGG-3' (in the 3'UTR of the pEGFP-C2 vector); and GAPDHf: 5'-TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTGG-3' and GAPDHR: 5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3'.

The PCR was performed in a final volume of 25  $\mu$ L (GoTaq Flexi DNA polymerase; Promega) and three different sets of conditions. For amplification of *GAPDH*, a two-step PCR was performed as follows: first denaturation for 2 minutes at 94°C, followed by 35 cycles of 20 seconds at 94°C and 2 minutes at 63°C. For amplification of endogenous *RP2* from blood, we performed a 3-step PCR: denaturation for 2 minutes at 94°C, followed by 35 cycles of 20 seconds at 94°C, 30 seconds at 58°C, and 25 seconds at 72°C. For amplification of the EGFP-*RP2* minigene, a 3-step PCR was performed: denaturation for 2

minutes at 94°C, followed by 28 cycles of 20 seconds at 94°C, 30 seconds at 60°C, and 30 seconds at 72°C.

Real-time PCR was performed with SYBR green master mix (The SYBR Green I Master assay in a LightCycler 480; Roche, Indianapolis, IN). Primers that detected all types of *RP2* transcripts were used as an internal control: 5'-GGGGTCAGAGACAGAAGAGC-3' (forward, in exon 2) and 5'-CTTTGTCTGAACTAGGAAAAAGC-3' (reverse, in exon 3). Specific primers for the detection of either the wild-type or the aberrant transcripts were also designed. For the wild-type transcript, the primers were 5'-CCAGAAAATAATTGATGAGATGG-3' (forward, in exon 2/exon 3 junction) and 5'-GCAATAACAGGACCTTTGTTCAG-3' (reverse, in exon 3/exon 4 junction). Primers for the aberrant transcript were 5'-CCAGAAAATAATTGATGAGATGG-3' (forward, in exon 2/exon 3 junction) and 5'-TTTCAGATACAAACATCTTTGTTCAG-3' (reverse, in exon 3/exon 5 junction). For each real-time PCR reaction, 1  $\mu$ L of cDNA template, 1  $\mu$ M of each primer, 1 $\times$  master mix, and 2  $\mu$ L of water were mixed in a final volume of 10  $\mu$ L. The reaction was set at 50 cycles in a two-step program: 95°C for 10 seconds and 58°C (wild-type and aberrant transcript detection) or 62°C (internal control) for 45 seconds. All samples were run in triplicate, with their corresponding negative controls. The level of transcript expression was quantified by using the second-derivative maximum method (LightCycler 480 software, ver. 1.5.0; Roche).

### Construction of the *RP2* Minigene

Taking into account that the genomic sequences relevant for splicing are contained within the 100 to 200 bases near the exon-intron junctions, exon 3 plus downstream intron 3 sequence, exon 4 plus its flanking intron 3 and 4 sequences, and exon 5 plus upstream intron 4 sequence were amplified from the genomic DNA of a control individual and an affected male of the family (Table 5, see Fig. 6A). These fragments were cloned in frame into the pEGFP-C2 vector (Clontech-BD Biosciences, Palo Alto, CA). The primers used contained restriction sites to allow the cloning of the PCR product and are shown in Table 5. The exons were sequentially cloned in the corresponding order and in-frame after the GFP sequence between the *Bgl*III and *Bam*HI sites of the pEGFP-C2 vector (Clontech-BD). The forward primer of exon 3 contained a *Bgl*III site and the reverse primer (within intron 3) contained a *Hind*III site. Cloning of exon 4 was achieved through digestion of the amplified fragment with *Sca*I (within intron 3) and the *Eco*RI site introduced in the reverse primer (complementary to a sequence in intron 4). Finally, cloning of exon 5 was performed by digestion with an endogenous *Eco*RI (in intron 4) and the *Bam*HI site introduced in the reverse primer.

### Cell Culture and Transfection

HEK293T cells were seeded on 24-well plates ( $2 \times 10^5$  cells/well) and grown in DMEM (Invitrogen, Barcelona, Spain) supplemented with 10% of fetal bovine serum. After 12 hours, the cells were transiently transfected with constructs bearing either the pEGFP-*wtRP2* minigene, the pEGFP-*mutRP2* minigene (containing the c.1073-9T>A mutation), or the empty pEGFP vector (Clontech-BD), with transfection reagent (Lipofectamine 2000; Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Forty-eight hours after transfection, the cells were collected and lysed, and total mRNA was used for RT-PCR. Transfection efficiency was monitored by

TABLE 4. In Silico Prediction Score Values of Intron 3 Acceptor Splice Site of the *RP2* Wild-Type and Mutant Alleles

Splicing Prediction Algorithm	WT	MUT	Threshold*
SplicePort	1.13	0.03	0
Geneid	4.07	-0.15	—
BDGP	0.95	0.76	0.4

\* The higher the value, the higher the probability of being a splicing site in vivo. Threshold values for each program are also provided. Negative values or those close to 0 mean that the acceptor splice site was not detectable.

TABLE 5. Primers Used to Amplify Exons Plus Flanking Intronic Sequences of the Wild-Type and Mutant *RP2* Alleles

Exon	Product Size (bp)	Primer Sequence (5'→3')*	
		Forward	Reverse
3	440	GAAGATCTTGATGGTTGGTAAAGGCTTTTC	CCCAAGCTTATCACTAGACTATAAAGGTAC
4	516	TGTGACACTAGTCCTATAATAG	GGAATTCCTCAATTATTTATCAAAGGTTC
5	340	GACCTTAATTATATAAGTGCTTC	CCAAGTCCTGGATCCACATTGC

\* Restriction site targets introduced to allow sequential cloning of each fragment are underlined.

checking and counting GFP-fluorescent cells under an optic fluorescence microscope (DMIL; Leica, Wetzlar, Germany) and for all the constructs and replicates, the efficiency was comparable.

## RESULTS

### Clinical Assessment and Findings

The RP in the family showed an X-linked inheritance pattern (Fig. 1). The clinical evaluations performed for one male (V.8) and two female (IV.14 and IV.16) patients as well as two obligate female carriers (III.16 and IV.11) are shown in Table 1. Night blindness and visual acuity loss increased with age in the affected members. Reduction of visual fields was more prominent in the affected male (V.8) and in the most affected female (IV.14). When comparing the ERG recordings, the male (V.8) and the most affected female (IV.14) showed nondetectable rod and cone waves and no response to flicker light (Table 1). Her sister, also affected (IV.16), showed asymmetrical retinal alteration, much more pronounced in the right eye, compatible with the fundus and visual acuity data. The ERG of the latter showed rod waves with decreased amplitudes and normal latency, cone waves of decreased amplitude and mildly increased latency, and flicker response with decreased amplitude.

The fundus of the eyes in three patients showed extensive atrophy of the RPE, bone spicule pigment deposits and vascular attenuation (Figs. 2A–C), as apparent in the male (Fig. 2A) as in the female patients (particularly in IV.14; Fig. 2B), in clear contrast to the normal fundus of the nonaffected obligate female carrier IV.11 (Fig. 2D). In addition, the eye fundus of the male patient showed macular atrophy and pseudopapilledema owing to the existence of papillary drusen (Fig. 2A), traits that have also been associated with RP.<sup>11,12</sup>

In accordance with the best corrected visual acuity, visual field, ERG, and fundus examination of the five individuals studied, we concluded that two obligate female carriers were nonaffected, whereas one male and two female patients showed variable degrees of affection. According to the dates of clinical examination (Table 1), the most affected member was the male V.8, with very low visual acuity, highly altered

ERG in both eyes, and general atrophy of the RPE and macula. Of the two female patients, the most affected was patient IV.14, who showed low visual acuity and nondetectable rod and cone waves in the ERG. Finally, female patient IV.16 presented asymmetrical atrophy of the RPE, being the right eye the most affected, with less visual acuity and more altered visual field and ERG.

### Results of Cosegregation Analysis of *RPGR*

In our search for the genetic cause of RP in the family, we focused in *RPGR* as the major gene for X-linked forms. Given the size and complexity of the *RPGR* coding sequence, cosegregation analysis was performed in three affected (III.14, IV.7, and V.8) and six nonaffected (II.3, III.6, III.16, IV.6, IV.11 and V.7) members with seven highly informative SNP markers very close to the gene (Table 2). The haplotype analysis showed lack of cosegregation with the disease, thus ruling out *RPGR* as the causative gene (Fig. 3).

### Identification of a New Mutation in Intron 3 of *RP2*

Once *RPGR* had been excluded, we focused on *RP2*. The five exons of this gene were sequenced in patients (males IV.7 and V.8). A single sequence variation was identified in intron 3, relatively close to the AG acceptor-splicing site (Fig. 4). This substitution caused a transversion, c.1073-9T>A, in the conserved polypyrimidine tract (PPT; 15–40 pyrimidines) required for the splicing process.<sup>13</sup> This variation cosegregated with the disease in this family, and in addition, an exhaustive search in SNP databases did not show any previous report assignment.

To verify that this intronic variation was not a rare polymorphism, we analyzed 220 chromosomes of a matched control Spanish population. None of them contained this variant allele, suggesting that it was the cause of RP in this family.

### Effect of Mutation c.1073-9T>A on the Strength of the Intron 3 Acceptor Site

Pathogenic mutations in introns mainly affect splicing events, either by removing or altering the recognition sites at the

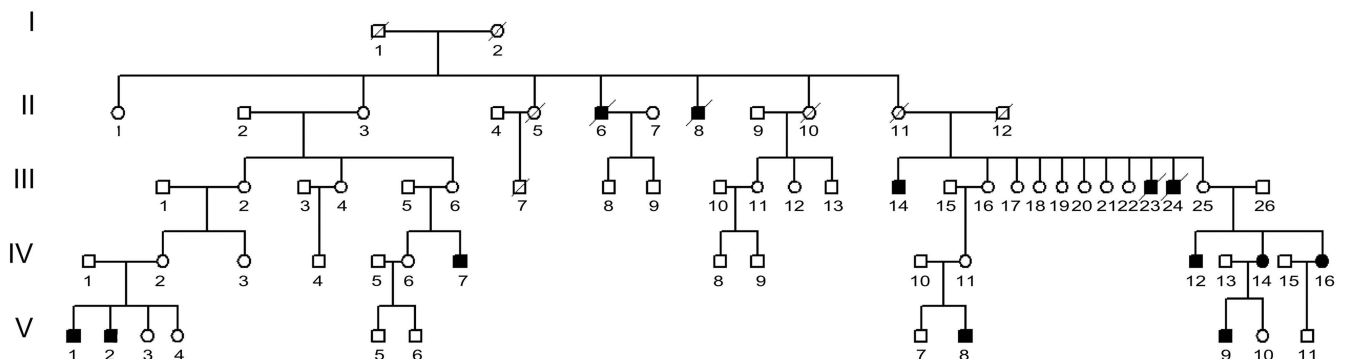
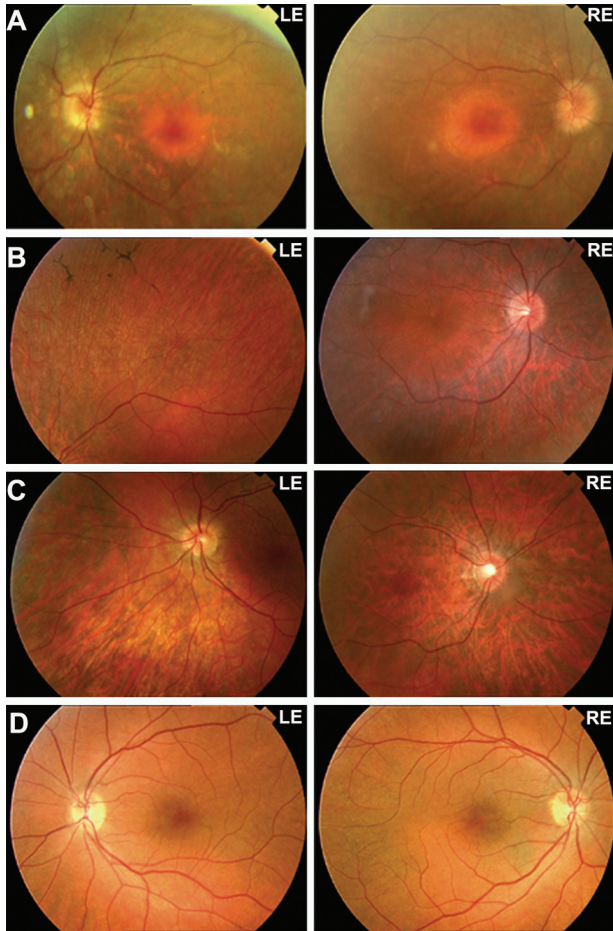


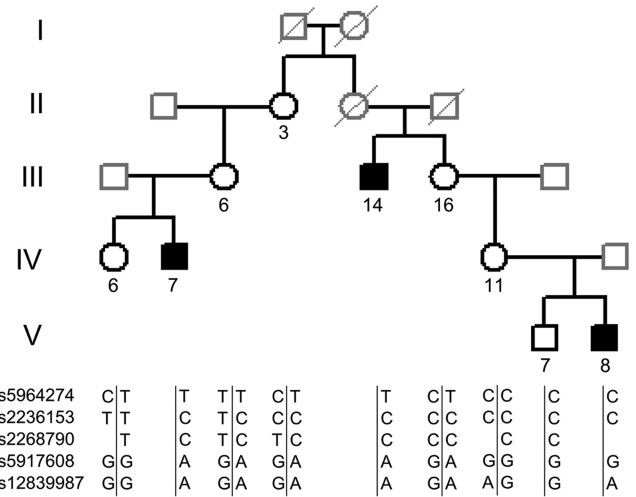
FIGURE 1. Spanish XLRP pedigree spanning five generations. Note that obligate carrier females are nonaffected except for females IV.14 and IV.16.



**FIGURE 2.** Fundus eye photographs from several affected and nonaffected mutation *c.1073-9T>A* carriers. (A) Affected male V.8. (B) Affected heterozygous female IV.14; the view of the left eye fundus is peripheral, to show retinal alterations. (C) Affected heterozygous female IV.16. (D) Nonaffected heterozygous female IV.11 with a normal fundus. Note the RP hallmarks in the affected fundi: pigmented epithelium atrophy (e.g., B, C), peripheral bone spicule pigment deposits (particularly prominent in the left eye, B), and reduction in the number and caliber of blood vessels (vascular attenuation). Macular atrophy and papillary drusen were also visible in both eyes (A). LE, left eye; RE, right eye.

junctions (dinucleotides, PPT, enhancers/silencers) or generating new cryptic exons.<sup>14,15</sup> The requirement of a PPT for recognition of intronic acceptor sites has long been established. Although there is not a clear consensus sequence, the number and type of pyrimidines is relevant, with a strong preference for Us over Cs.<sup>13</sup> Considering the wild-type *RP2* sequence, the 15 bases upstream of the intron 3–exon 4 junction yielded 53.3% of the pyrimidines, lower than the 62.3% average in the other *RP2* junctions. The identified single-point mutation decreased the percentage of pyrimidines below 50% (46.7%), suggesting a negative effect on this acceptor site recognition.

Using to online resources, we evaluated the presumptive effect of the mutation *c.1073-9T>A* on the genomic sequence environment for the 5' and 3' splice sites. The wild-type and mutant *RP2* sequences (from 100 nt upstream the first exon to 100 nt downstream the last exon, approximately 45 kb of genomic sequence) were submitted to three different splicing prediction algorithms: SplicePort,<sup>16</sup> Geneid,<sup>17</sup> and BDGP.<sup>18</sup> Of interest, the variant sequence substantially decreased the recognition of the intron 3 acceptor site (Table 4).

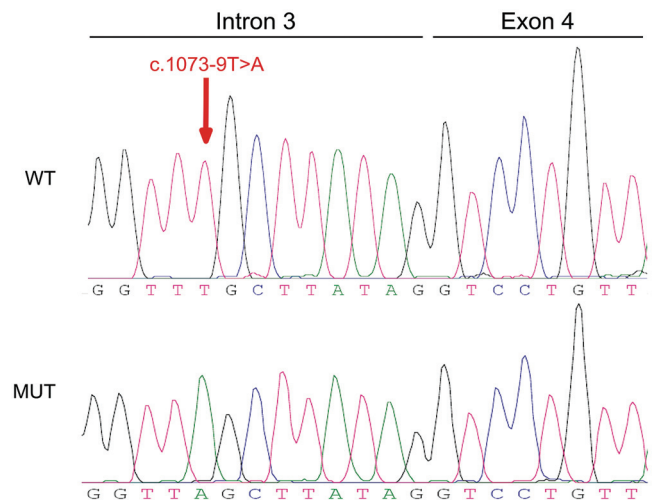


**FIGURE 3.** Haplotype cosegregation analysis of SNP markers excluded *RPGR* as the causative gene. Only a partial view of the pedigree is shown. Generations and individuals are numbered according to Figure 1. The position of the SNPs used is detailed in Table 2.

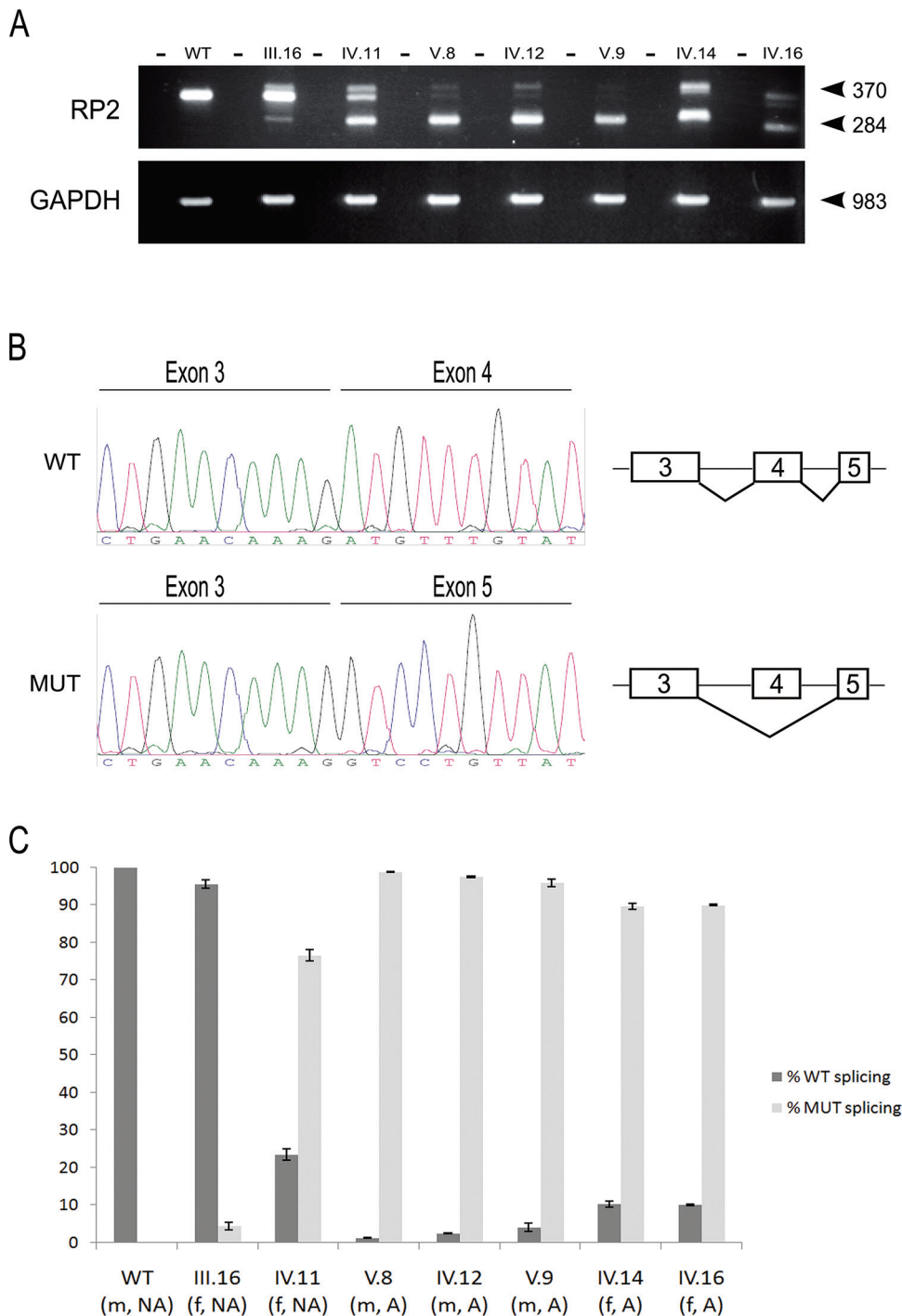
**Aberrant *RP2* Transcript in Affected and Carrier Family Members**

After the in silico results, the most probable outcome of the *RP2* mutation would be skipping of exon 4, generating a frame shift and a premature stop codon in the mature mRNA. Most mRNAs containing premature stop codons are degraded by the nonsense-mediated decay (NMD) mRNA surveillance mechanism.<sup>19</sup> However, in the present case, the mutated *RP2* transcript would avoid NMD degradation as the premature STOP codon is located in the last coding exon (exon 5).

Total RNA from the blood of several affected males (IV.12, V.8, V.9) and females (IV.14, IV.16) and obligate carrier females (III.16, IV.11) was used for RT-PCR analysis of *RP2*. *GAPDH* was tested as the control. When we used primers *RP2f* and *RP2r* (see the Material and Methods section) for the amplification of the *RP2* transcript, the control male sample (WT) produced a single band of 370 bp (Fig. 5A), as would be expected from a correctly processed *RP2* transcript. In contrast, affected males showed a



**FIGURE 4.** Identification of the mutation *c.1073-9T>A*. Chromatograms of the *RP2* intron 3/exon 4 junction sequence of one control male individual and the affected male V.8, showing the transversion T>A in position –9 from the first nucleotide of exon 4.



**FIGURE 5.** RT-PCR analysis of *RP2* mRNAs in blood of affected males, females, and obligate female carriers. (A) RT-PCR of the *RP2* spliced transcripts showed that affected individuals, all bearing the mutation c.1073-9T>A, produced high levels of an aberrantly spliced transcript (284-bp band), whereas the control wild-type produced only the expected 370-bp band. Numbering of the individuals is according to Figure 1. Note that carrier females (affected or nonaffected) showed variable levels of the wild-type and aberrant spliced products. The *GAPDH* RT-PCR was used as the control for normalization. (B) Sequencing of the two PCR bands showed unequivocal assignment of the 370-bp band to the wild-type product (fused exons 3 to 4-5) and the 284-bp band to the aberrant transcript that skipped exon 4. Faint higher molecular bands correspond to heteroduplexes. (C) Quantification of the two *RP2* splicings (WT versus aberrant) in affected males and females and two nonaffected obligate female carriers by real-time RT-PCR. The wild-type male control produced only the correctly processed transcript, and it is considered 100%. Note that affected males produced less than 5% of the correct mRNA and more than 95% of the aberrantly processed transcript, whereas all carrier females (either affected or nonaffected) showed higher variation in levels of aberrant transcript expression, ranging from a mere 8% (III.16) to 90% (IV.16). m, male; f, female; NA, nonaffected; A, affected.

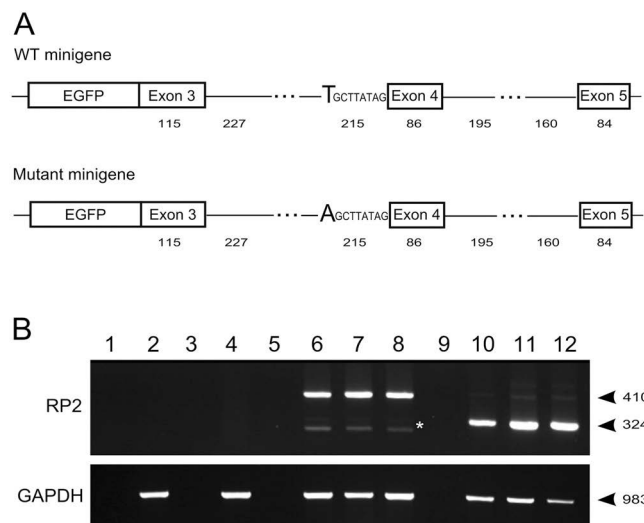
faint band of the corresponding wild-type size, and another of 284 bp, very prominent and lacking exon 4. Concerning affected and nonaffected carrier females, different levels of wild-type and aberrantly processed transcripts were identified. Sequencing all the amplified products confirmed that the 370-bp band contained the wild-type product, including exon 4, whereas the 284-bp band corresponded to the directly fused 3 and 5 exons (Fig. 5B). We also verified that the faint band of a slightly higher size was the heteroduplex structure.

Quantification of each type of *RP2* transcript by real-time RT-PCR in patients and female carriers showed that affected males (hemizygous for the mutated allele) produced ~95% to 99% of the aberrant transcripts (Fig. 5C). Thus, the mutation

strongly impaired recognition of the acceptor site at intron 3. Carrier females (heterozygous for the mutated allele) presented highly variable amounts of the aberrant *RP2* transcript, ranging from barely 8% to nearly 90% (Fig. 5C, e.g., compare females III.16 and IV.16).

#### In Vitro Splicing Assays with an *RP2*-Derived Minigene to Determine the Pathogenicity of the c.1073-9T>A Mutation

To assess whether the single-point mutation was sufficient for the skipping of exon 4, a minigene construct was gen-



**FIGURE 6.** Construction and expression analysis of an *RP2* minigene. **(A)** Diagram showing the wild-type and mutant *RP2* minigenes fused to the GFP coding sequence. The position of the mutation is indicated in bold. **(B)** RT-PCR of cells transfected with either the wild-type or mutant *RP2* minigenes showed that the mutation c.1073-9T>A was sufficient to produce a spliced transcript that skipped exon 4 (324-bp band), whereas the wild-type sequence produced a 410-bp band. \*A nonspecific band. *Lane 1*: negative PCR control; *lane 2*: RT-PCR from nontransfected HEK293T cells; *lane 3*: negative RT-PCR control; *lane 4*: RT-PCR from HEK293T transfected with the pEGFP empty vector; *lane 5*: negative RT-PCR control from HEK293T cells transfected with the wild-type *RP2* minigene; *lanes 6, 7, and 8*: three independent replicates of HEK293T cells transfected with the wild-type *RP2* minigene; *lane 9*: negative RT-PCR control from HEK293T cells transfected with the mutant *RP2* minigene; *lanes 10, 11, and 12*: three independent replicates of HEK293T cells transfected with the mutant *RP2* minigene. *GAPDH* was used as the control for normalization.

erated and tested in transiently transfected cultured cells. HEK293T cells were transfected with the wild-type, the mutant allele, or the empty pEGFP-C2 vector (negative control). To avoid amplifying the endogenous *RP2* gene, we designed the primers for the RT-PCR from the vector sequence and amplified exclusively the transcripts produced by the minigene. Three independent replicates were tested, and *GAPDH* was used as a control for RNA quantity and quality. The wild-type sequence produced only a 410-bp band (fusion of exons 3 to 4-5), whereas the mutated construct mainly produced the band expected for exon 4 skipping (fusion of exons 3-5) and only a very faint band of the wild-type splicing was detected under high exposure (Fig. 6B). Other faint bands are nonspecific. The identity of all the bands was verified by sequencing.

## DISCUSSION

Two genes, *RPGR* and *RP2*, have been reported to cause XLRP. Most XLRP mutations are located in *RPGR* and mainly cluster at ORF15, an exon comprising 1.5 kb of very low complexity, purine-rich sequence and small repeats. The following priorities for XLRP diagnosis have been suggested: first, perform the mutational screening of ORF15; second, sequence *RP2*; and finally, analyze the remaining *RPGR* exons.<sup>4</sup> We propose to further refine this strategy by adding a prior step of cosegregation analysis based on SNP markers to either include or exclude *RPGR* as the candidate gene in a particular family. In the present case, this simple step allowed us to rule out *RPGR* as the causative gene, and therefore, focus on *RP2*.

Although most reported mutations affect coding sequences, there is an increasing number of new pathogenic variants located in introns. The development of new algorithms combined with in vitro studies has facilitated the assessment of their pathogenicity.<sup>20</sup> The more obvious mutations destroy the highly conserved the donor and acceptor junction sites (GT-AG), but attention is now being drawn to mutations deep within the introns that cause the inclusion of cryptic exons<sup>21,22</sup> or in flanking intronic sequences that affect the recognition and binding of the splicing ribonucleoprotein (RNP) complexes.<sup>23-26</sup> This is the case of the new mutation we report herein, which lowers below 50% the amount of pyrimidines in the required PPT, thus disrupting the recognition and binding of the U2-RNP complex.<sup>27</sup>

The mutation c.1073-9T>A produces the skipping of exon 4 in the mature mRNA, causing a frame shift and a prematurely truncated protein (294+4 amino acids versus 350 aa of the wild-type protein). This aberrant transcript was abundantly found in male patients (more than 95%) as it escaped the NMD mRNA control mechanism. The truncated *RP2* contains the N-terminal domain required for (1) interaction with *Arl3* and the retinal effector *HRG4*, and (2) formation of a ternary complex crucial for the ciliary transport.<sup>9,10</sup> However, this truncated *RP2* lacks the C-terminal domain, which shares sequence homology with the nucleotide diphosphate kinases (NDPK), with a function that is as yet undetermined.<sup>28</sup> Therefore, it is difficult to hypothesize a priori whether this mutation causes loss or gain of function. Very few correctly spliced transcripts are produced in patients (<5% in hemizygotes) and thus, the levels of wild-type *RP2* protein are most probably insufficient in patients.

A recent report stated that no *RP2* point mutation had yet been identified with a semidominant inheritance pattern in carrier females, although semidominance has been claimed for the major XLRP gene, *RPGR*.<sup>4,29</sup> However, in the present study female carriers of an *RP2* mutation presented ample variation in the phenotypic range, from normal fundus and visual acuity (including visual field and ERG) to asymmetrical retinal alteration or even severely affected retinas bearing all the RP hallmarks. These discrepancies could be explained by differential X chromosome inactivation. Although the RT-PCRs were performed in blood and not in the retina, considering that (1) there was large splicing variation among different carrier females in the same family, (2) one of the affected females had asymmetrical retinal alteration, and (3) all hemizygous affected males from different branches of the family showed comparable levels of aberrant transcript (versus wild-type), we surmised that skewed X-inactivation rather than a polymorphic modifier X-linked gene was a more likely explanation to account for the wide phenotypic range in female carriers. Hence, according to our results *RP2* joins *RPGR* as the cause of semidominant XLRP.

## Acknowledgments

The authors thank the family members for their participation in the study and Andrés Mayor for sample collection, helpful discussions, and constant support of our research.

## References

- Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet*. 2006;368:1795-1809.
- Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*. 2007;125:151-158.
- Ferreira PA. Insights into X-linked retinitis pigmentosa type 3, allied diseases and underlying pathomechanisms. *Hum Mol Genet*. 2005;14:259-267.

4. Neidhardt J, Glaus E, Lorenz B, et al. Identification of novel mutations in X-linked retinitis pigmentosa families and implications for diagnostic testing. *Mol Vis*. 2008;14:1081-1093.
5. Vervoort R, Lennon A, Bird AC, et al. Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa. *Nat Genet*. 2000;25:462-466.
6. Hong DH, Li T. Complex expression pattern of RPGR reveals a role for purine-rich exonic splicing enhancers. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:3373-3382.
7. Bader I, Brandau O, Achatz H, et al. X-linked retinitis pigmentosa: RPGR mutations in most families with definite X linkage and clustering of mutations in a short sequence stretch of exon ORF15. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:1458-1463.
8. Schwahn U, Lenzner S, Dong J, et al. Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. *Nat Genet*. 1998;19:327-332.
9. Veltel S, Gasper R, Eisenacher E, Wittinghofer A. The retinitis pigmentosa 2 gene product is a GTPase-activating protein for Arf-like 3. *Nat Struct Mol Biol*. 2008;15:373-380.
10. Veltel S, Kravchenko A, Ismail S, Wittinghofer A. Specificity of Arl2/Arl3 signaling is mediated by a ternary Arl3-effector-GAP-complex. *FEBS Lett*. 2008;582:2501-2507.
11. Novack RL, Foss RY. Drusen of the optic disc in retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol*. 1987;103:44-47.
12. Grover S, Fishman GA, Brown J. Frequency of optic disc or papillary nerve fiber layer drusen in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*. 1997;104:295-298.
13. Coolidge CJ, Seely RJ, Patton JG. Functional analysis of the polypyrimidine tract in pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:886-896.
14. Wang Z, Burge CB. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA*. 2008;14:802-813.
15. Solís AS, Shariat N, Patton JG. Splicing fidelity, enhancers and disease. *Front Biosci*. 2008;13:1926-1942.
16. Dogan RI, Getoor L, Wilbur WJ, Mount SM. SplicePort: an interactive splice-site analysis tool: web server issue. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:W285-W291.
17. Blanco E, Parra G, Guigó R. Using Geneid to identify genes. *Curr Protoc Bioinform*. 2007;1:4.3.
18. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol*. 1997;4:311-323.
19. Stalder L, Muhleman O. The meaning of nonsense. *Trends Cell Biol*. 2008;18:315-321.
20. Spurdle A, Couch FJ, Hogervorst FBL, et al. Prediction and assessment of splicing alterations: implications for clinical testing. *Hum Mutat*. 2008;29:1304-1313.
21. Ugarte M, Aguado C, Desviat LR, Sánchez-Alcudia R, Rincón A, Pérez B. Propionic and methylmalonic acidemia: antisense therapeutics for intronic variation causing aberrantly spliced messenger RNA. *Am J Hum Genet*. 2007;26:81-86.
22. Davis RL, Homer VM, George PM, Brennan SO. A deep intronic mutation in FBG creates a consensus exonic splicing enhancer motif that results in afibrinogenemia caused by aberrant mRNA splicing, which can be corrected in vitro with antisense oligonucleotide treatment. *Hum Mutat*. 2009;30(2):221-227.
23. Vorechovsky J. Aberrant 3' splice sites in human disease genes: mutation pattern, nucleotide structure and comparison of computational tools that predict their utilization. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:4630-4641.
24. Buratti E, Chivers M, Kralicova J, et al. Aberrant 5' splice sites in human disease genes: mutation pattern, nucleotide structure and comparison of computational tools that predict their utilization. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:4250-4263.
25. Roca X, Olson AJ, Rao AR, et al. Features of 5'-splice-site efficiency derived from disease-causing mutations and comparative genomics. *Genome Res*. 2008;18:77-87.
26. Tanner G, Glaus E, Barthelmes D, et al. Therapeutic strategy to rescue mutation-induced exon skipping in rhodopsin by adaptation of U1 snRNA. *Hum Mutat*. 2009;30(2):255-263.
27. Singh R, Valcárcel J, Green MR. Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins. *Science*. 1995;268:1173-1176.
28. Kühnel K, Veltel S, Schlichting I, Wittinghofer A. Crystal structure of the human retinitis pigmentosa 2 protein and its interaction with Arl3. *Structure*. 2006;14:367-378.
29. Banin E, Mizrahi-Meissonnier L, Neis R, et al. A non-ancestral RPGR missense mutation in families with either recessive or semi-dominant X-linked retinitis pigmentosa. *Am J Med Genet*. 2007;143A:1150-1158.



# Discussió



# DISCUSSIÓ

## 1. AVENÇOS EN L'ESTUDI DE LES DISTRÒFIES DE RETINA

Les distròfies de retina (DR) són malalties molt heterogènies, tant genètica com clínicament, caracteritzades principalment per la degeneració dels fotoreceptors que culmina, en molts casos, en la ceguesa total i irreversible dels pacients. Durant les últimes dècades, els avenços metodològics i el desenvolupament d'eines bioinformàtiques han permès ampliar notòriament el coneixement sobre les causes genètiques i moleculars d'aquestes malalties. La importància d'aquests estudis rau en la possibilitat d'oferir als pacients i als seus familiars un diagnòstic genètic acurat i, en alguns casos, una bona prognosi de la malaltia, així com en identificar les bases moleculars d'aquestes patologies i les vies cel·lulars alterades als fotoreceptors establir dianes terapèutiques eficaces.

En els últims anys, i gràcies als estudis genètics en plataformes de genotipat i a la seqüenciació massiva, ha incrementat dramàticament el nombre de gens DR. De fet, és en la cerca de nous gens on s'han produït els avenços més importants, ja que en les últimes dues dècades se n'han identificat més de 150, dels prop de 185 que es coneixen actualment. No obstant, s'estima que tots ells expliquen poc més del 50% dels casos, restant actualment un nombre important de gens per identificar. Tal i com s'observa a la Figura 29, el creixement del nombre de gens descrits és lineal al llarg del temps, i la diferència entre els identificats i els mapats es manté constant. En alguns casos, existeixen *loci* mapats des de fa més de 15 anys on, tot i els avenços en seqüenciació a gran escala, encara es desconeix el gen i la mutació causal de la patologia. Assumint que els *loci* siguin correctes, la naturalesa de la mutació (deleció, inversió, etc.) i/o la localització d'aquesta en regions intròniques, promotores o reguladores segurament dificulten la seva identificació.

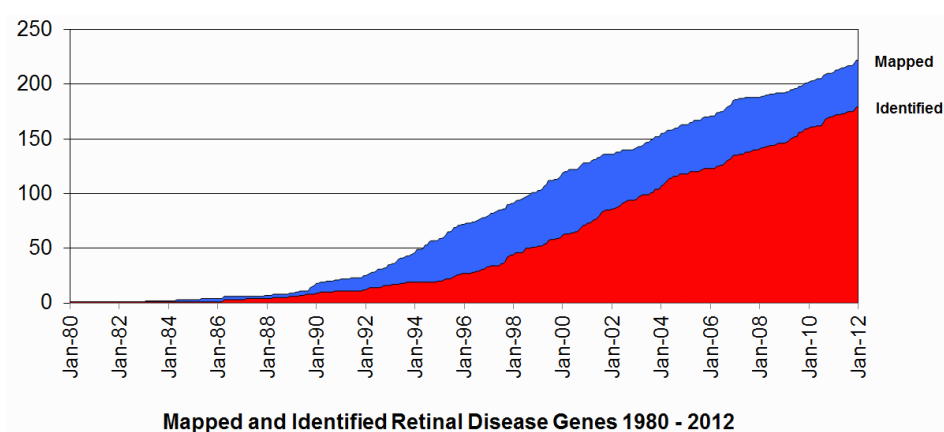


Figura 29. Progressió en el mapatge (blau) i identificació (vermell) de gens causals de distròfies de retina (sindròmiques i no sindròmiques), des del 1980 fins l'actualitat. A l'eix de les Y s'indica el nombre de gens o *loci* identificats, a l'eix de les X el temps, en anys. Imatge extreta de la bases de dades de RetNet (<https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis>, última actualització: gener 2012).

Mitjançant anàlisis de lligament, l'any 2004 el nostre grup va descriure un nou gen responsable de retinosi pigmentària autosòmica recessiva, *CERKL* (Tuson et al. 2004). Fins l'actualitat, s'han identificat un total de 9 mutacions en aquest gen, amb conseqüències clíniques molt variades. Aquesta heterogeneïtat al·lèlica no és un fet estrany en les DR, ans al contrari, ja que entre el 30 i el 40% dels gens es troben implicats en més d'un tipus de distròfia (vegeu Taula 2, pàgina 38). A més, sovint existeixen diferències fenotípiques entre individus portadors d'una mateixa mutació, fins i tot dins d'una mateixa família. La diversitat fenotípica, que complica la possibilitat d'establir correlacions genotip-fenotip, es dona en termes com l'edat d'aparició dels primers símptomes, la severitat clínica, la progressió de la malaltia i el grau d'afectació de cons i bastons. Aquesta variabilitat es pot explicar tenint en compte diversos factors. D'una banda, el tipus de mutació i la regió on es localitza aquesta comporta un efecte biològic més o menys agressiu, condicionant la severitat de la patologia. No obstant, l'heterogeneïtat al·lèlica únicament no explica la variabilitat clínica entre pacients portadors de la mateixa mutació, suggerint l'acció del conjunt del genoma i de gens modificadors sobre el fenotip. Precisament, és en aquest últim cas on s'han centrat molts esforços en els últims anys, basats sobretot en la cerca de candidats mitjançant el cribratge de SNPs de canvi de sentit en *partners* proteics, responsables també de DR, de la de la proteïna d'interès (Coppieters et al. 2010, Ebermann et al. 2010, Fahim et al. 2011).

En la majoria dels casos, la descripció de nous gens DR s'ha basat en estudis de lligament que han identificat gens anotats en el genoma els quals no s'havien associat prèviament a cap patologia. Altres gens, com és el cas de *CERKL*, no es trobaven completament anotats en les bases de dades i han estat identificats *de novo*. Un cop identificat un gen DR, l'aproximació funcional es presenta com una tasca laboriosa i difícil ja que pel sol fet que sigui responsable d'una distròfia de retina, la seva funció i contribució a la patologia no queden directament dilucidades. Malgrat l'estadi final d'aquestes malalties es basi en la mort per apoptosi dels fotoreceptors, els gens implicats en les distròfies visuals afecten un gran ventall d'estructures i vies cel·lulars, i si bé en els últims anys s'ha avançat molt en el coneixement de les bases genètiques de les DR, actualment el coneixement de les bases moleculars d'aquestes malalties és incomplet. De fet, encara que una gran part de gens s'han classificat en diverses categories funcionals (segons la seva localització, *partners* proteics, dominis estructurals o algun estudi funcional), la seva contribució a la malaltia continua essent desconeguda en la majoria d'ells. Fins i tot existeix un grup multitudinari de gens (aproximadament un 10%) orfes de funció, sense cap pista robusta pel que fa a la seva funcionalitat en els fotoreceptors.

A l'hora de realitzar estudis funcionals a nivell de la localització tissular i subcel·lular del producte gènic i de les molècules amb les quals interactua directa (*partners*) o indirectament, s'han de tenir en compte tota una sèrie de limitacions, ja que depenent dels teixits on s'expressi el gen que estudiem, i de la possibilitat d'obtenir-ne una mostra, es poden realitzar unes anàlisis funcionals o unes altres. En el nostre cas, l'obtenció de mostres de retina humana no és una tasca trivial, sobretot perquè l'única via factible per aconseguir aquest teixit és a partir de persones que donen el cos a la ciència. Aquesta situació no és gaire freqüent al ser incompatible legalment amb la donació simultània d'òrgans i teixits. A més, els estudis que es puguin realitzar en aquestes retines, més enllà de les anàlisis d'expressió, impliquen disposar d'anticossos específics per a detectar la proteïna d'interès. Malgrat per moltes proteïnes específiques de tipus cel·lular existeixen anticossos comercials, la descoberta de nous gens de retina sovint revela la contribució en el procés de la visió de

proteïnes “noves”, per les quals no hi ha anticossos disponibles. En aquests casos, l’obtenció d’un anticòs específic és primordial. La generació d’anticossos anti-CERKL específics ha estat molt difícil i ha limitat molt l’estudi funcional de la proteïna. Durant el desenvolupament d’aquesta tesi, s’ha intentat repetidament obtenir diversos anticossos contra CERKL en conill, tant específics d’humà com de ratolí. Per humà, en tots els casos hem obtingut anticossos policlonals inespecífics, que ni tan sols reconeixen la proteïna sobreexpressada; mentre que per ratolí vàrem obtenir un anticòs contra un pèptid de 14 aminoàcids codificat a l’exó 2 molt valuós pels assajos d’immunocitoquímica. Pel que fa a l’aproximació funcional mitjançant anàlisis *in vitro*, la dificultat de diferenciar fotoreceptors o altres cèl·lules neuronals o de cultivar explants retinals fa que sovint es treballi amb línies cel·lulars allunyades en estructura i funció de les cèl·lules de la retina. Existeixen línies cel·lulars de precursors retinals de fàcil cultiu, com són les 661W o les RGC-5, però sovint aquestes no expressen el gen d’interès i són refractàries a la transfecció convencional. De fet, quan es treballa amb cultius cel·lulars i no es pot detectar la proteïna d’interès (ja sigui perquè no s’hi expressa o per la falta d’anticossos), freqüentment s’utilitza la transfecció del cDNA del gen fusionat a un epítip, el qual en algun cas pot alterar la localització i/o la funció de la proteïna. Finalment, una altra estratègia a l’hora de realitzar estudis funcionals és la generació de models animals, on és clau obtenir organismes que reproduïxin amb certa fidelitat els fenotips humans. Tot i així, ambdós fenotips no sempre concorden, cosa que dificulta la comparativa funcional entre la proteïna estudiada i l’homòloga en l’humà.

En els últims anys, els avenços en les eines bioinformàtiques han permès realitzar aproximacions funcionals *in silico*, a partir de les quals s’anàliza la seqüència aminoacídica de la proteïna per tal d’extreure’n informació sobre el plegament, topologia, modificacions post-traduccionals, dominis proteics, pèptids senyals, localització, etc. L’ús de diverses eines bioinformàtiques van permetre classificar CERKL en el grup de les quinases de ceramides (CERKs), amb les quals comparteix una elevada homologia de seqüència i un domini DAGK (Tuson et al. 2004).

## 2. COMPLEXITAT TRANSCRIPCIONAL DE CERKL

Actualment, es creu que aproximadament un 90% dels gens que contenen dos o més exons pateixen *splicing* alternatiu (AS) durant la maduració del pre-mRNA, donant lloc a isoformes específiques de teixit en la majoria dels casos (Wang et al. 2008). Els teixits del sistema nerviós central (CNS), entre ells la retina, mostren una elevada regulació de l’AS. Diferents estudis proposen que la retina té l’activitat d’*splicing* més elevada de tot l’organisme degut, en part, a l’acció dels gens de la família dels *PRPFs*, responsables de DR (Fagnani et al. 2007, Tanackovic et al. 2011). Recentment, s’ha proposat que els gens implicats en distròfies de retina mostren un nivell d’*splicing* més elevat que aquells que també s’expressen a la retina però no estan associats a cap patologia ocular (Gamsiz et al. 2012). La importància de conèixer l’AS d’un gen en un teixit en concret recau en la possibilitat de cercar mutacions en regions que potser en d’altres isoformes o teixits no queden incloses i que, per tant, serien considerades com a introns. Endemés, s’estima que un terç de les mutacions implicades en malalties humanes afecten el mecanisme d’empalmament del pre-mRNA (Krawczak et al. 1992), encara que cal tenir present que, per raons metodològiques essencialment, les variants patogèniques en les regions reguladores i intròniques no flanquejants es troben clarament subestimades en

aquestes dades. La majoria de les mutacions que alteren l'empalmament del mRNA s'identifiquen a les regions donadores i acceptores d'*splicing*, pel que conèixer els exons alternatius d'un gen i les seves unions exó-intró és fonamental. Per totes aquestes raons, un dels objectius d'aquest treball ha estat l'estudi del transcriptoma de *CERKL*, principalment a la retina.

A l'inici d'aquesta tesi, s'havien descrit un total d'11 isoformes de *CERKL* (10 de completes, il·lustrades a la Figura 9 de la pàgina 20, i una d'incompleta), identificades a partir de retina (Tuson et al. 2004) i altres teixits (Bornancin et al. 2005). Els nostres estudis d'RT-PCR i RACE sobre RNA de retina humana ens han permès caracteritzar 21 transcrits de *CERKL*, 13 dels quals han estat identificats per primera vegada. Fins el moment, les isoformes de *CERKL* havien estat anomenades seguint les lletres de l'abecedari, però degut a l'elevat nombre de transcrits vàrem decidir proposar una nomenclatura més racional, designant un número a cada isoforma. La nostra proposta va ser acceptada pel *GenBank* i el total d'isoformes descrites van ser anomenades de l'1 al 24. L'elevada complexitat transcripcional de *CERKL* s'explica per l'ús de promotors alternatius, la inclusió o exclusió d'exons, el reconeixement de donadors d'*splicing* alternatiu i la retenció d'introns.

L'aproximació del transcriptoma de *CERKL* es va abordar utilitzant dues estratègies en paral·lel; l'anàlisi *in silico* del locus del gen, utilitzant diferents bases de dades i programes de predicció, juntament amb la caracterització i validació experimental. Aquests estudis ens van permetre identificar 4 inicis de transcripció (TSSs) en diferents promotors: el promotor prèviament descrit, dos més situats dins el propi gen i el promotor del gen situat a 5' de *CERKL*, *NEUROD1*. La utilització de promotors alternatius implica en molts casos la pèrdua de la metionina iniciadora de l'exó 1. Mitjançant anàlisis bioinformàtiques de matrius Kozak, vàrem fer una predicció de metionines potencialment iniciadores de la traducció (TIS), algunes de les quals es van validar posteriorment *in vitro*. Aquests estudis ens van permetre descriure una metionina situada a l'exó 5 com a TIS funcional, a partir de la qual es genera una proteïna d'uns 32 kDa amb els dominis NLSs, PH i DAGK total o parcialment deletats.

La complexitat transcripcional de *CERKL* també s'explica en gran part per la variabilitat d'AS que afecta als 6 primers exons. D'una banda, per la inclusió o exclusió dels exons 3, 4, 4b i 5, que codifiquen pel domini DAGK i, per l'altra, per l'ús d'un donador d'*splicing* alternatiu situat dins l'exó 1. Durant la maduració del pre-mRNA, les proteïnes de l'*spliceosome* reconeixen unes seqüències altament conservades en les regions d'*splicing* dels introns; el dinucleòtid GT en el cas del donador i l'AG en el de l'acceptor. No obstant, en un 1% dels donadors d'*splicing* el dinucleòtid no és GT sinó GC, el qual interactua més dèbilment amb la maquinària de l'*spliceosome* i es troba sovint implicat en AS (Bursat et al. 2000). Precisament, dos dels exons de *CERKL* que pateixen AS, el 4b i el 5, contenen el dinucleòtid GC en les regions donadores dels seus introns. Tenint en compte la freqüència d'aquest dinucleòtid, la probabilitat de trobar més d'un donador GC en el mateix gen és molt baixa, suggerint una elevada regulació de l'AS en el cas del gen *CERKL*.

En el cas de l'exó 1, l'*splicing* pot ocórrer en dos donadors diferents, als quals les prediccions *in silico* donen puntuacions molt similars; BDGP ([www.fruitfly.org](http://www.fruitfly.org)): 0,98 (*h2*) i 0,99 (*h7*) (Figura 30). De fet, en els estudis del cDNA de retina humana es va comprovar que la presència d'ambdós fenòmens era força equitativa. El donador dins el propi exó 1 es troba situat *downstream* del TIS, i l'empalmament directe amb

l'exó 2 comporta el truncament de la pauta de lectura de la proteïna i l'aparició de codons stop prematurs (PTCs), els quals *a priori* es trobarien subjectes al mecanisme de *nonsense-mediated decay* (NMD). No obstant, el fet que haguem detectat la isoforma *h7* i d'altres que empalmen l'exó 1a amb el 2 utilitzant condicions estàndard, suggereix l'ús de TIS alternatius com el de l'exó 5, a partir del qual es generaria una proteïna amb una pauta de lectura oberta fins l'últim exó (Figura 30). Aquestes dues isoformes es generen a partir del mateix promotor però transcriuen isoformes amb regions 5'UTR diferents, tal i com ocorre també a un altre gen DR com *RPGRIP1* (Kuznetsova et al. 2011). De fet, diversos estudis coincideixen en proposar que els extrems 5'UTR dels mRNAs dels eucariotes juguen un paper clau en la regulació postranscripcional del gen, modulant l'eficiència de la traducció, l'estabilitat del transcrit o la localització subcel·lular (Pickering et al. 2005, Payton et al. 2007). Amb tot, *CERKL* apareix com un gen amb una elevada complexitat transcripcional, principalment restringida a la regió 5' del gen, on es situen la majoria dels dominis descrits i de les mutacions identificades. Aquest fet complica encara més la possibilitat d'establir correlacions genotip-fenotip, ja que s'afegeix un nou nivell de dificultat degut a la localització de les mutacions en exons alternatius i l'efecte d'aquestes en les isoformes més abundants a la retina.

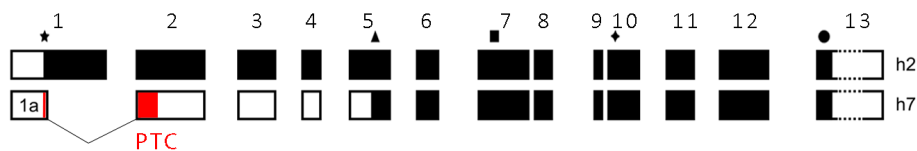


Figura 30. Esquema de dues de les isoformes de mRNA de *CERKL* més abundants a la retina humana, *h2* i *h7*, que es diferencien pel lloc donador d'*splicing* de l'exó 1. En el cas de la isoforma *h2*, s'utilitza la metionina de l'exó 1 (senyalitzada amb un asterisc) i es genera una proteïna amb una pauta de lectura oberta fins l'últim exó. Pel que fa a la isoforma *h7*, s'utilitza un donador d'*splicing* intern que genera l'escurçament de l'exó 1 (exó 1a) que a l'empalmar directament amb l'exó 2 comporta la interrupció de la pauta de lectura, generant codons stop prematurs (PTCs). En vermell s'indica la pauta de lectura oberta des de la metionina situada a l'exó 1 fins el PTC. En negre, la pauta generada des de la metionina de l'exó 5 (triangle), validada *in vitro*. Els altres símbols indiquen les metionines TIS identificades en els estudis *in silico* amb matrius Kozak.

L'estudi del transcriptoma de *CERKL* es va fer extens a d'altres vertebrats com el ratolí, el pollastre, *Xenopus* i peix zebra. Així, hem obtingut una fotografia transcripcional acurada de cada espècie i una aproximació evolutiva de l'AS d'aquest gen. Les anàlisis en ratolí van mostrar una elevada similitud amb humana, tant a nivell de promotors com d'*splicing* alternatiu. Es van aïllar més de 32 isoformes (31 d'elles descrites *de novo*), les quals inicien la transcripció en 4 promotors alternatius, dos d'ells coincidents amb humana (el de l'exó 1 i el de *NeuroD1*), i dos altres exclusius de ratolí situats al voltant de l'exó 3 (promotor 3a i 3b). La facilitat d'obtenir teixits murins ens va permetre analitzar i comparar l'activitat dels promotors en els diferents tipus tissulars, així com identificar isoformes específiques de teixit. Mentre que a la retina s'utilitzen majoritàriament els promotors de l'exó 1 i el de *NeuroD1*, al fetege o al testicle la transcripció s'inicia als promotors 3a i 3b. L'ús de diferents promotors implica la generació de proteïnes amb diferents dominis i funcions específiques de teixit. La comparativa a nivell tissular també ens va permetre confirmar l'elevat nivell d'AS a la retina, comparat amb d'altres teixits. Principalment, l'AS de la retina de ratolí es concentra, com en humana, en els primers exons del gen, on l'exó 5 és, amb diferència, l'exó exclòs més freqüentment. Aquest fet

s'explica perquè és l'únic exó amb el dinucleòtid GC en l'intró flanquejant, ja que l'exó 4b, que en humà també presenta el dinucleòtid GC, és exclusiu de primats i no es conserva a ratolí. De fet, és en els mamífers on s'acumulen més casos de donadors GC, pel que sovint l'AS és més complex en aquestes espècies (Churbanov et al. 2008). En la comparativa humà-ratolí, es va observar una taxa de retenció d'introns més elevada en els murins. Aquest fenomen no és inusual i, de fet, s'ha descrit en altres gens DR com *RPGR*, *RPGRIP1* i *PRPF31* (Kirschner et al. 1999, Lu et al. 2005, Tanackovic i Rivolta 2009). Aquest fet es podria atribuir a una major permissivitat de transcrits aberrants en ratolí degut a una maquinària d'*splicing* menys efectiva i fidel i, per tant, a una regulació més fina i acurada en l'*splicing* i en l'eliminació dels transcrits anòmals en humans.

En el cas de pollastre, *Xenopus* o peix zebra el panorama transcripcional va resultar ser molt més simple amb 5, 2 i 3 isoformes identificades, respectivament. Aquest fet s'explica, en part, per una menor taxa d'inclusió i exclusió d'exons. En aquestes espècies el dinucleòtid donador de l'intró 5 és GT, sent l'AS menys probable al tractar-se d'una seqüència d'*splicing* de senyal forta. A més, l'ús de *NEUROD1* com a promotor alternatiu es va trobar restringit a pollastre. *NEUROD1* és un factor de transcripció implicat en el desenvolupament d'estructures endocrines i neuronals que, per una banda, regula l'expressió del gen de la insulina (de fet, mutacions en aquest gen s'han associat a les diabetis mellitus tipus II) i, per l'altra, es troba implicat en el desenvolupament i proliferació dels fotoreceptors. La combinació de *NEUROD1* i *CRX* s'ha associat a la sortida del cicle cel·lular dels precursors dels fotoreceptors i a l'activació dels gens específics de bastons en les cèl·lules ja post-mitòtiques (Seko et al. 2012). A més, *NEUROD1* també s'expressa a les cèl·lules amacrines i es troba implicat en la inhibició de la gènesi de les cèl·lules de Müller (Ochocinska i Hitchcock 2009). En el cas de la retina, *NEUROD1* es podria estar expressant en els mateixos tipus cel·lulars que *CERKL*, i l'expressió conjunta i coordinada dels dos gens podria conferir alguna avantatge en la regulació cel·lular de les retines dels amniotes.

Aquests estudis posen en evidència l'elevat nombre d'isoformes generades a mamífers, en comparació amb la resta d'espècies analitzades. Generalment, aquest fet s'ha explicat per la major complexitat fenotípica d'aquestes espècies (Kim et al. 2007). A més, el nombre de gens en mamífers (25.000-30.000 en ratolí o humà) no és substancialment més elevat que el d'invertebrats com el nematode (19.000) o, fins i tot, és inferior que el d'algunes plantes com l'arròs (38.000-40.000), suggerint l'AS com l'explicació d'aquesta paradoxal controvèrsia (Graveley 2001, Modrek i Lee 2002). No obstant, d'altres autors atribueixen aquesta diversitat d'isoformes en mamífers a un *splicing* sorollós (*noisy splicing*) sense significat funcional, ja que de totes les variants generades a partir d'un gen, la fracció d'isoformes funcionalment rellevant sembla ser petita. En estudis recents s'ha comprovat que en els fenòmens d'AS existeix un grup multitudinari d'isoformes poc abundants generades a partir de llocs d'*splicing* poc o gens conservats, suggerint errors a l'hora de l'empalmament dels exons (Pickrell et al. 2010). De fet, en la comparativa d'isoformes de *CERKL* entre els diferents vertebrats, observem que només una única variant es troba conservada en el total de les 5 espècies. Es tracta de la variant *h2* (NM\_201548.4) que es transcriu des del promotor "canònic" de *CERKL* i conté 13 exons que codifiquen per la totalitat dels dominis proteics descrits. No obstant, algunes de les isoformes exclusives de mamífers són tant o més abundants que la conservada en la resta de vertebrats, posant en qüestió que aquestes resultin d'errors en la maduració del pre-mRNA. Potser en el cas de mamífers i gràcies a l'AS,

algunes d'aquestes isoformes han adquirit funcions alternatives i per aquesta raó s'ha preservat la seva elevada expressió.

La retina és el teixit on més isoformes de *CERKL* s'han identificat, tant en humà com en ratolí. Aquest fet s'explica, tal i com s'ha comentat, per la complexitat del teixit en qüestió però, també per l'elevada expressió de *CERKL* en aquest tipus de cèl·lules. Si ens fixem en humà, l'expressió del gen no és ubíqua, més aviat es restringeix al CNS, sent la retina (amb diferència) on es detecta la màxima transcripció. D'aquesta manera, les mutacions en aquest gen afectarien bàsicament la retina, explicant en part el fenotip observat en els pacients, restringit a aquest teixit.

### 3. ÉS CERKL UNA QUINASA DE LÍPIDS?

Els dominis conservats en les proteïnes són una de les majors fonts d'informació funcional comparativa pel disseny experimental i l'anotació genòmica. Mitjançant eines bioinformàtiques es va situar *CERKL* a la família de les quinases de ceramides, amb les qui comparteix un elevat grau d'homologia. No obstant i després de molts esforços realitzats per part de diversos grups, sembla que *CERKL*, tot i tenir el domini DAGK conservat, no és una quinasa de lípids. O com a mínim no ho és en les diferents reaccions *in vitro* testades en cèl·lules en cultiu i en lisats de retina. Aquests assajos han inclòs un gran ventall de condicions tant pel que fa a substrat, donadors d'energia, pH, concentració de sals, presència de putatius *partners* proteïcs, etc., i en cap d'ells s'ha detectat cap tipus d'activitat. No obstant, no es pot descartar la possibilitat que *CERKL* fosforili algun lípid en condicions extraordinàries, en moments i estats cel·lulars molt concrets, que potser no hem sigut capaços de reproduir *in vitro*. De tota manera, en el model murí obtingut per deleció de l'exó 5 de Graf i col·laboradors, en el qual es trunca el domini DAGK, sí que s'haurien d'haver donat aquestes condicions, ja sigui durant el desenvolupament embrionari o en l'adult, però no es van observar diferències en els nivells de C1P entre les retines dels animals WT i KO (Graf et al. 2008). Inicialment, es va creure que *CERKL* podria ser la quinasa de ceramides específica de retina, mentre que *CERK* ho seria de la resta de teixits. Després d'anàlisis *real time* RT-PCR es va comprovar que en la retina, l'expressió de *CERK* era elevada, superant en escreix l'expressió de *CERKL* (Mandal et al. 2012). En aquest teixit, per tant, la fosforilació de la ceramida vindria donada per l'activitat de *CERK* i, si *CERKL* també tingués aquesta activitat, la funció seria redundant.

L'any 2008, Lidome i col·laboradors van descriure un motiu de cisteïnes conservades (C347RAGCFVC354) essencials per la funció de *CERK* (situat entre els dominis d'homologia CC1 i CC2, Figura 12, pàgina 24), el qual regula l'activitat enzimàtica del domini DAGK de la proteïna (Lidome et al. 2008). A més, estudis amb mutants puntuals d'aquestes residus van revelar problemes en el transport de *CERK*, en l'exportació del nucli al citoplasma i en la correcta localització a l'aparell de Golgi (Rovina et al. 2009). En l'alineament de seqüències, s'observa la pèrdua d'aquest motiu a *CERKL*, fet que explicaria que tot i tenir el domini quinasa, aquest no sigui funcional per manca del domini activador/regulador. Això suggereix que potser el motiu de cisteïnes i, per tant el domini DAGK, no són importants per la funció que desenvolupa *CERKL* a les cèl·lules de la retina. No obstant, les quinases d'esfingosines (SPHK1 i SPHK2), les quals

comparteixen el domini DAGK amb CERK i CERKL, tampoc presenten el motiu de cisteïnes, i en aquest cas el seu domini DAGK és clarament funcional. De tota manera, existeix una regió homòloga en el domini C1 de les SPHKs (GGKGGK a SPHK1 i GGRGL a SPHK2) que comparteix CERK (GGKGGQ) però no CERKL, el qual és imprescindible per l'activitat quinasa de SPHK1 (Pitson et al. 2002). La construcció d'un mutant de CERKL on es va substituir el motiu SHKK original de la proteïna pel GGKGGK de SPHK1 no va ser suficient per estimular l'activitat de CERKL (Bornancin et al. 2005). Caldria comprovar si afegint a CERKL el domini de cisteïnes de CERK, CERKL adquiriria la capacitat fosforilativa, per tal d'assegurar-nos que el domini DAGK de CERKL és plenament funcional i que la manca d'activitat quinasa ve donada per la pèrdua d'aquest motiu.

En els estudis transcripcionals es van aïllar fins a 21 isoformes de CERKL a la retina humana. Mitjançant una anàlisi semi-quantitativa vàrem identificar els transcrits més abundants, 8 isoformes de mRNA a partir de les quals es generen, com a mínim, 3 proteïnes diferents (Figura 31). De les 3 variants proteïques, només en la proteïna llarga (isoforma 1) es manté el DAGK sencer, mentre que en les altres dues variants queda truncat. L'existència d'aquestes isoformes proteïques més petites s'ha demostrat en retines murines *in vivo* (Mandal et al. 2012). Això implica que, almenys en les variants 4 i 8, la funció de CERKL a la cèl·lula seria independent del domini DAGK. Si ens fixem amb les variants proteïques de les quinases amb qui CERKL comparteix aquest domini, l'SPHK1 i l'SPHK2 pateixen també AS, amb 4 isoformes proteïques descrites en cada cas. No obstant, totes les isoformes de les SPHK comparteixen el domini DAGK, suggerint que quan la presència d'un domini és essencial per la funció de la proteïna, aquest es manté encara que existeixi variabilitat d'isoformes.

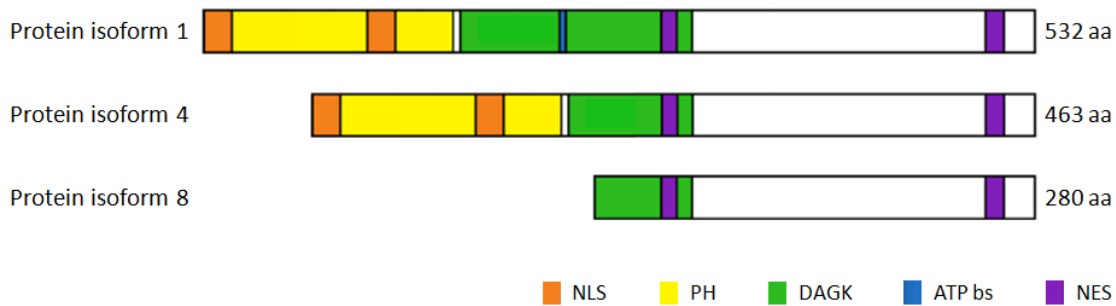


Figura 31. Variants proteïques de CERKL generades a partir dels 8 transcrits de mRNA més freqüents a la retina humana. S'indiquen els diferents dominis proteïcs codificats en cada cas, així com la mida de la proteïna en aminoàcids (aa). NLS: senyal de localització nuclear; PH: homologia a plextrina; DAGK: diacilglicerol quinasa; ATPbs: lloc d'unió a ATP; NES: senyal d'exportació nuclear.

Si el domini DAGK no és funcional, per què s'ha conservat a CERKL? Que el domini *per se* no sigui actiu no implica que no contingui residus importants pel que fa a les modificacions post-traduccionals o al plegament de la proteïna, o per la interacció amb d'altres molècules. A més, dins el domini DAGK existeix un domini d'unió a ATP (motiu GGDG) el qual es troba conservat a CERK, on s'ha comprovat que és imprescindible per la transferència del grup fosfat a la ceramida. Caldria comprovar si aquest domini és

funcional a CERKL i uneix ATP, encara que la seva finalitat sigui diferent a la del cas de CERK. D'aquesta manera, l'existència d'aquest motiu, així com la dels residus del voltant, explicaria el fet que es trobi conservat.

#### 4. CERKL, AGENT PROTECTOR D'ESTRÈS I MORT CEL·LULAR

Malgrat CERKL no sembla estar implicada en el metabolisme dels esfingolípid, podem afirmar que la seva funció a la retina és imprescindible, ja que mutacions en aquest gen causen RP i CRD. A més, el seu paper protector enfront l'estrès i mort cel·lular ha quedat àmpliament demostrat des que el nostre grup va comprovar que la sobreexpressió de CERKL en cèl·lules en cultiu protegeix de l'apoptosi causada per estrès oxidatiu (Tuson et al. 2009). Per una banda, s'ha confirmat *in vivo* en el nostre model murí, on els nivells de GFAP, un marcador d'estrès retinal implicat en la gliosi, així com el nombre de cèl·lules apoptòtiques en els assaigs de TUNEL, mostren augments significatius respecte els animals WT. *GFAP* es transcriu normalment a les cèl·lules de Müller, les cèl·lules glials de la retina, però l'augment de l'expressió d'aquest gen es troba associat a fenòmens d'estrès i a l'augment de l'edat. Els nostres resultats, basats en estudis qualitius en talls histològics i en anàlisis semi-quantitatives mitjançant Western-blot de retines WT i KO de diferents edats, varen revelar un increment d'aquest marcador en els animals transgènics. Aquesta diferència es mantenia constant en edats més avançades, on els nivells de GFAP augmentaven tant en els animals WT com KO. Tot plegat indica que les retines dels animals *Cerkl*<sup>-/-</sup> podrien estar patint algun tipus d'alteració estructural o funcional, que generaria l'expansió de les cèl·lules de Müller com a resposta a l'estrès. Mitjançant assaigs de TUNEL vàrem poder observar que, a part d'un augment en l'estrès cel·lular, les retines dels ratolins KO també mostraven un increment en el nombre de cèl·lules apoptòtiques. Malgrat els estudis semi-quantitatius amb marcadors de diferents tipus cel·lulars de la retina només varen mostrar alteracions en els animals KO a nivell de les ganglionars (l'expressió de *Brn3a* es trobava un 30% disminuïda), el marcatge de TUNEL no va ser exclusiu d'aquest tipus cel·lular. De fet, els assaigs d'hibridació *in situ* i immunolocalització en retines murines ens varen revelar una elevada expressió de CERKL en aquest tipus cel·lular, però també en les altres capes neuronals de la retina, on el silenciament del gen podria estar afectant igualment, encara que en menor grau, la viabilitat cel·lular.

En el model de peix zebra, la disminució de la mida de l'ull juntament amb els defectes en la laminació de la retina han estat sovint associades a un increment de l'apoptosi i/o a la reducció de la taxa proliferativa cel·lular. Assaigs d'immunolocalització de la caspasa-3 activa varen revelar un increment en el nombre de cèl·lules apoptòtiques a les retines dels animals *knockejats*, posant de manifest una vegada més la relació de CERKL amb la mort cel·lular. No obstant, el fenotip observat podria ser conseqüència d'un efecte directe de *Cerkl* en la proliferació/diferenciació cel·lular durant el desenvolupament de la vesícula òptica i formació de la retina, o bé d'una degeneració secundària causada per la possible contribució de *Cerkl* en la supervivència i protecció en front l'estrès i apoptosi cel·lular. Per tal d'avaluar aquestes qüestions, es va estudiar l'expressió de diferents marcadors del desenvolupament primerenc de la retina en diversos estadis embrionaris. Per una banda, es va analitzar l'expressió de *pax6a*, que participa en el control de la proliferació cel·lular i manteniment del potencial retinogènic de les cèl·lules progenitores, així com en la diferenciació de les cèl·lules amacrines, i, per l'altra, d'*otx2*, un factor de transcripció clau per la sortida del cicle cel·lular de les

cèl·lules retinals multipotents i en la determinació del llinatge de les cèl·lules fotoreceptores. En els estadis de 22 i 24 hpf, on les cèl·lules de la vesícula òptica precursors de la retina neural encara són proliferatives i no han abandonat el cicle cel·lular, no es van detectar diferències en l'expressió de cap dels dos marcadors, indicant que la proliferació cel·lular es troba inalterada en aquests estadis. A partir de les 27-28 hpf s'inicia la diferenciació de les primeres cèl·lules neuronals de la retina. En estadis posteriors, a 48 però sobretot a 72 hpf, es va detectar una clara disminució en l'expressió d'ambdós gens. A més, i atès que les cèl·lules ganglionars es trobaven pertorbades en el model murí, vàrem analitzar *in vivo* l'expressió d'*ath5*, un factor de transcripció senyalitzador de la gènesi d'aquest tipus cel·lular, el primer en diferenciar-se a la retina. La diferenciació de les ganglionars s'inicia en un clúster, situat a la part ventronasal de la retina, des d'on la gènesi (anomenada onada de les RGCs) avança cap a la part nasal i central de la retina, i des del centre a la perifèria. En el cas dels animals injectats amb el morfolino de *cerkl*, el clúster ventronasal es formava correctament, però l'expansió i intensitat de l'onada era menor i es trobava desorganitzada, suggerint que les cèl·lules ganglionars es podien diferenciar inicialment correctament, i que les alteracions vindrien donades per un procés de degeneració secundari. Tot plegat sembla indicar que *Cerkl* no participa en la proliferació cel·lular de les cèl·lules multipotents de la retina, ni tampoc en la diferenciació cel·lular d'aquestes. No obstant, sembla estar implicada en processos de supervivència cel·lular, relacionats amb la protecció en front l'estrès oxidatiu observat en les cèl·lules en cultiu transfectades amb aquesta proteïna.

La retina és un teixit que es troba sota estrès continu degut, en part, a la gran taxa metabòlica i de recanvis estructurals cel·lulars dels fotoreceptors. A més, la incidència constant de llum, font d'estrès oxidatiu, fa que aquestes cèl·lules, tot i ser molt estables, siguin a la vegada summament vulnerables (Stone et al. 1999). Estudis recents han revelat un augment significatiu de l'expressió de *CERKL* després d'aplicar estrès lumínic en rates, el qual no s'observa en *CERK* ni en d'altres gens DR, com ara la rodopsina, l'arrestina o la transducina (Mandal et al. 2012). Tenint en compte aquestes dades, l'expressió de *CERKL* es veuria activada preferencialment en condicions d'estrès, suggerint un paper actiu d'aquesta proteïna en la protecció en front la degeneració retinal progressiva.

## 5. ES TROBA CERKL IMPLICADA EN LA FOTOTRANSDUCCIÓ?

Recentment, Nevet i col·laboradors han publicat un estudi on demostren mitjançant estudis de doble híbrid i coimmunoprecipitació la interacció de *CERKL* amb diferents proteïnes neuronals sensores de calci (NCS), entre elles les implicades també en DR, GCAP1 i GCAP2, les quals intervenen en la fototransducció i la senyalització de  $Ca^{2+}$  (Nebet et al. 2012). Les GCAPs contenen 4 dominis EF; un que no és capaç d'unir cap metall (anomenat EF1), i tres que són capaços d'unir  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$  (EF2, 3 i 4) que són justament els que interactuen amb *CERKL*, on l'associació es donaria a nivell de l'N-terminal, bàsicament en el domini PH i part del DAGK. Estudis amb mutants puntuals que causen DR situats a les regions EF2-4 de GCAP1 (P50L, E89K, C99Y, N104K i D100E) i GCAP2 (G157R), així com els descrits al domini PH i part del DAGK de *CERKL* (R106S i C125W) no van pertorbar en cap cas la interacció entre aquestes proteïnes. Així doncs, semblaria que la interacció entre GCAPs-*CERKL* es trobaria intacta en els pacients portadors d'aquestes mutacions i, per tant, la funció de la proteïna afectada en cada cas es veuria compromesa independentment

d'aquesta unió. Les GCAPs es troben localitzades al segment extern (OS) dels fotoreceptors on també localitza CERKL. No obstant, CERKL presenta una localització més dinàmica, no solament restringida a l'OS, sinó trobant-se també situada als segments interns (IS) i a la regió perinuclear dels fotoreceptors. D'aquesta manera, l'única localització de CERKL dependent de GCAPs podria ser la de l'OS, però estudis en ratolins doble *knockout* GCAP1/GCAP2 van revelar que la localització de CERKL no es veia alterada, sent la localització de CERKL als fotoreceptors independent de les GCAPs (Nevet et al. 2012).

L'existència de diferents isoformes proteiques de CERKL, i el fet de presentar un patró de localització dinàmic, revela que pugui tractar-se d'una proteïna multifuncional, amb rols diferenciats en els diversos compartiments cel·lulars. En aquests context, Mandal i col·laboradors van aïllar segments externs de bastons de retines murines i, mitjançant Western-blot, varen demostrar que la isoforma curta de *Cerkl* (isoforma 8, Figura 31) és la majoritària en aquest compartiment (Mandal et al. 2012). No obstant, aquesta isoforma no conté els dominis PH i DAGK encarregats d'interaccionar amb les GCAPs en els discs d'aquests segments, en contradicció amb els resultats obtinguts per Nevet. Caldrà, doncs, realitzar estudis en detall sobre el patró de localització de les isoformes majoritàries de CERKL, el qual ens aportarà informació valuosa sobre la implicació de la proteïna en les diferents vies funcionals dels fotoreceptors. D'aquesta manera, mentre la isoforma llarga podria localitzar-se a la regió perinuclear i al segment intern, la isoforma curta podria estar situada als segments externs desenvolupant alguna funció alternativa. A més, es podrien realitzar estudis amb el nostre model murí de *Cerkl*, ja que aquest no expressa les isoformes que contenen el domini PH i, per tant, en aquest transgènic la interacció amb les GCAPs no es podria donar. Cal destacar que els models murins de GCAPs, de la mateixa manera que els de CERKL, no presenten cap alteració morfològica destacable. No obstant, els primers sí mostren anomalies en la recuperació i sensibilitat als flaixos de llum, pel que seria interessant determinar si el nostre model pateix algun tipus d'alteració en la resposta als estímuls lluminosos i, per tant, en la fototransducció.

## 6. LOCALITZACIÓ DINÀMICA DE CERKL EN CÈL·LULES EN CULTIU I A LA RETINA.

A l'inici d'aquesta tesi ens vàrem plantejar l'aproximació funcional de CERKL, començant per la localització histològica i citològica detallada de la isoforma proteica 1, la qual conté tots els dominis proteics. Tenint en compte les limitacions a l'hora de treballar amb cultius de cèl·lules retinals, l'abordatge es va centrar primerament en un estudi de co-immunolocalització en cèl·lules COS-7 i HeLa transfectades amb CERKL<sub>isoforma1</sub>, usant un ampli llistat de marcadors de diversos orgànuls cel·lulars. Tal i com s'ha comentat anteriorment, el patró de localització de CERKL és força dinàmic, viatjant del nucli al citoplasma, on s'hi troba de manera uniforme o bé en forma d'agregats. Primerament, vàrem estudiar la localització de la proteïna al citoplasma. Els nostres resultats varen revelar que CERKL colocalitza parcialment amb la calnexina, un marcador del reticle endoplasmàtic (ER), mentre que queda exclosa de l'aparell de Golgi, els mitocondris, els endosomes primerencs, tardans i de reciclatge, les vesícules de clatrina, els lisosomes i els autofagosomes (Figura 33, pàgina 211 de l'*Annex 1*). El fet de colocalitzar parcialment amb l'ER ens va suggerir la possible contribució de CERKL en el transport proteic. Per aquesta raó, vàrem decidir realitzar diversos estudis de transport anterògrad amb l'equip del Dr. Vivek Malhotra al Centre de Regulació

Genòmica (CRG). Aquest grup gaudeix de reconeixement internacional en aquest camp pels seus estudis amb la proteïna TANGO1 (Saito et al. 2009, Malhotra i Erlmann 2011), i disposaven d'un mutant sensible a la temperatura d'un marcador basolateral del virus de la estomatitis (VSVG-GFP) i d'un reporter constitutiu de secreció proteica (ss-HRP-Flag). Els resultats que vàrem obtenir van descartar la implicació de CERKL en el transport anterògrad.

El tràfic de CERKL entre els compartiments citoplasmàtic i nuclear està regulat per dos dominis d'entrada i dos dominis de sortida del nucli (NLSs i NESs, respectivament). Estudis d'altres autors amb mutants puntuals dels dominis NLS1 i NLS2 de CERKL, varen revelar que NLS2 sol pot regular l'entrada de CERKL al nucli, mentre que NLS1 no és capaç de fer-ho (Inagaki et al. 2006). Fent una comparativa d'aquestes dues seqüències en vertebrats hem corroborat la importància de NLS2 en la regulació del transport nuclear de CERKL, ja que aquest últim és l'únic conservat. A més, els estudis de sobreexpressió de Cerkl de peix zebra en cèl·lules en cultiu van demostrar que la proteïna d'aquest teleosti, a l'igual que la humana, localitzava a nucli, suggerint que la funció de la proteïna en aquest compartiment té una rellevància funcional. A més, una de les mutacions descrites a CERKL, causant de RP, afecta un domini altament conservat del senyal NLS2, R106S, reforçant encara més el seu paper clau per la correcta funció de la proteïna (Ali et al. 2008). En relació a la sortida del nucli, Rovina i col·laboradors varen descriure'n els dos dominis responsables: NES1 i NES2 (Rovina et al. 2009). Els senyals NES són seqüències riques en leucines que generalment són reconegudes per l'exportina 1 (CRM1), la qual recluta el *cargo* i l'exporta a través del porus nuclear (Hutten et al. 2007). Per tal d'avaluar si CRM1 és la responsable de l'exportació de CERKL, vàrem realitzar un experiment en cèl·lules en cultiu transfectades amb CERKL<sub>isoforma1</sub>-GFP i tractades amb leptomincina B (LMB), un inhibidor específic de l'exportina. Després de 6 h de tractament, CERKL quedava retinguda al nucli, indicant que la seva exportació és mitjançada per la unió de CRM1 a les seqüències NES(s) (Figura 34, pàgina 212 de l'*Annex 1*).

El patró de localització cel·lular de CERKL també va ser avaluat *in vivo* a nivell de les diferents capes de la retina, usant un anticòs específic anti-CERKL de ratolí, dissenyat i obtingut durant el desenvolupament d'aquesta tesi. Els estudis d'immunohistoquímica en crioseccions de retines de ratolí varen revelar que CERKL mostra un patró de localització molt dinàmic ens els diferents tipus cel·lulars d'aquest teixit, on CERKL s'expressa principalment a la capa de cèl·lules ganglionars (GCL) i en algunes cèl·lules de la capa nuclear externa (ONL) i interna (INL). No obstant, la localització és totalment depenent del tipus cel·lular: a la GCL, CERKL localitza tant al compartiment citoplasmàtic com nuclear, mentre que en les cèl·lules de la INL només es troba al nucli. En ambdós casos CERKL presenta una clara exclusió dels nuclèols. En canvi, a l'ONL no es va observar en cap cas localització nuclear, però sí un intens marcatge a nivell de la regió perinuclear d'alguns somes propers a la capa dels segments dels fotoreceptors, on CERKL localitza tant a nivell del segment intern (IS) com extern (OS) (Figura 35, pàgina 213 de l'*Annex 1*). A més, curiosament, es van detectar cúmuls de CERKL a la capa plexiforme interna (IPL). Si ens centrem en la localització als fotoreceptors, l'estudi amb marcadors específics de cons i bastons varen mostrar que la proteïna localitza de manera preferencial als primers, contràriament a l'esperat. La RP es caracteritza per la mort, en un primer terme, dels bastons, seguida de la dels cons, probablement induïda per dany oxidatiu degut a la reducció en el consum d'oxigen dels bastons i la consegüent hiperòxia a la retina externa (Shen et al. 2005). En canvi, a la CRD es produeix el procés invers. En els últims anys s'han descrit mutacions de CERKL responsables de CRD

(Aleman et al. 2009), que podrien explicar la localització observada a les retines murines. No obstant, ambdues patologies no difereixen en els estadis avançats, i aquest fet complica el seu diagnòstic clínic acurat.

La funció de CERKL és encara a dia d'avui desconeguda, però l'existència de diverses isoformes proteiques, juntament amb els diferents dominis i la seva localització dinàmica, suggereixen un paper multifuncional d'aquesta proteïna a la retina, amb tasques diferents a cada compartiment. A nucli, CERKL podria estar implicada en la regulació transcripcional d'alguns gens o en el transport de proteïnes o mRNAs a través del porus nuclear. Al citoplasma, la localització perinuclear i a l'IS reforçaria el fet que CERKL localitzi a l'ER, on podria formar part d'algun complex de traducció o de transport proteic, mentre que la localització a l'OS podria estar associada a la unió de les GCAPs i en una possible contribució en la fototransducció.

## 7. APROXIMACIONS FUNCIONALS *IN VIVO* I *IN VITRO* PER A L'ESTUDI DE MUTACIONS ALS GENS *CERKL* I *RP2*

En el futur, quan les teràpies gèniques estiguin ben establertes i els pacients puguin accedir a elles, serà fonamental el coneixement de les bases genètiques de la malaltia i l'impacte molecular de les mutacions identificades en cada cas. Per aquesta raó, una vegada identificada la variant patogènica és important realitzar estudis per tal d'establir la naturalesa de la mutació (mutant nul, mutant de guany de funció, haploinsuficiència, etc.).

Sempre i quan sigui possible, és preferible estudiar *in vivo* l'impacte de les variants utilitzant mostres de pacients. No obstant, el fet de treballar amb distròfies de retina restringeix l'ús de sang o saliva dels individus afectes, ja que sovint els gens o isoformes d'interès no s'hi troben expressats. En el cas de *RP2*, es tracta d'un gen d'expressió ubiqua amb una única isoforma transcripcional, fet que ens va permetre obtenir mostres del mRNA del gen a partir de sang de pacients. Les nostres anàlisis varen revelar que la mutació c.1073-9T>A comprometia el lloc acceptor d'*splicing* de l'intró 3, implicant l'escissió de l'exó 4 durant la maduració del pre-mRNA. En canvi, en el cas de *CERKL*, el fet que el gen no s'expressi ni a sang ni a saliva ens va obligar a abordar l'estudi de la patogenicitat de la mutació més prevalent, R257X, utilitzant una estratègia alternativa. Per aquesta raó, vàrem dissenyar i construir minigens tenint en compte, a més, la situació de la mutació en un dels exons alternatius del gen (exó 5). Vàrem demostrar que, en el cas del minigen mutant, les isoformes que contenen l'exó 5 eren eliminades mitjançant el mecanisme *nonsense-mediated decay* (NMD). En el cas de *RP2* també vàrem construir un minigen per tal de confirmar la patogenicitat de la mutació i vàrem obtenir resultats totalment comparables als assajos *in vivo*.

En ambdós casos, en la mutació c.1073-9T>A de *RP2* i la R257X de *CERKL*, es creen codons *stop* prematurs (PTCs) en el mRNA. No obstant, només en el cas de *CERKL* els transcrits aberrants són eliminats per NMD. Aquest fet posa de manifest la importància de la localització del PTC respecte la cua poli-A del mRNA i/o l'existència d'unions exó-exó *downstream* de l'*stop* prematur (Stalder i Mühlemann 2008, Brogna i Wen 2009). Mentre en el cas de *CERKL* el PTC es situa a l'exó 5 (del total de 13 exons), a *RP2* el transcrit aberrant enllaça l'exó 3 directament amb el 5, provocant l'aparició del PTC en l'últim exó del gen, que té una

mida de 84 nt i es troba a poca distància de la cua poli-A. En aquest últim cas, doncs, el transcrit no pateix NMD i és traduït a proteïna, a la qual li mancarà el domini NDPK (nucleòsid difosfat quinasa). Encara que la funció d'aquest motiu a RP2 és encara desconeguda, la deleció de l'exó 4 i altres mutacions puntuals en aquest domini reforcen la seva importància funcional. La nova variant identificada a RP2 es troba situada a la posició -9 respecte l'inici de l'exó 4, en un domini important per la correcta maduració del mRNA. La disrupció d'aquests senyals d'*splicing*, així com d'altres situats en regions promotores o reguladores, posa de manifest la necessitat d'abordar el diagnòstic genètic amb metodologies alternatives a la seqüenciació directa.

L'estudi de les mostres de les dones portadores ens ha permès demostrar un biaix en l'expressió dels al·lels de RP2, segurament donada per la inactivació no atzarosa del cromosoma X, com a causa directa del fenotip. Tot i que l'estudi s'ha dut a terme en cèl·lules sanguínies i, per tant, no podem conèixer la inactivació de l'X a la retina, podríem inferir que en les cèl·lules retinals de les portadores sanes es troba majoritàriament silenciada l'al·lel mutat, mentre que en el cas de les afectes, l'al·lel silvestre. A més, aquest estudi ens ha permès reportar per primera vegada un cas de semi-dominància degut a mutacions al gen RP2, fins el moment restringit a RPGR. No obstant, estudis d'inactivació del cromosoma X i del patró de metilació del locus del receptor d'androgen en dones portadores de mutacions a RPGR, no han mostrat en cap cas una inactivació unilateral d'aquest cromosoma, atribuint la dissemblança en els fenotips de les pacients al fons genètic (Neidhardt et al. 2008). Caldria, doncs, més estudis en el futur que permetin dilucidar les causes moleculars de la semi-dominància en algunes famílies XL-RP.

## 8. QUIN ÉS EL MILLOR MODEL ANIMAL PER A L'ESTUDI DE LES DISTRÒFIES DE RETINA?

Juntament amb la caracterització funcional, un dels altres grans objectius d'aquesta tesi ha estat la generació i caracterització de models animals per a l'estudi de CERKL, per així identificar les vies funcionals afectades en la patologia i poder aplicar en el futur teràpies per aturar-ne l'aparició o la progressió. A l'inici d'aquest treball, el grup havia enviat a l'empresa *Genoway* els clonatges necessaris per generar un *knockout* de *Cerkl* a ratolí. A finals de l'any 2009 es van rebre al laboratori els primers ratolins heterozigots *Cerkl*<sup>+/-</sup>, a partir dels quals es van realitzar els creuaments necessaris per a l'obtenció dels KO. No obstant, durant la generació d'aquest transgènic es va publicar un model murí deficient per *Cerkl* que consistia en l'escissió de l'exó 5, que codifica pel domini DAGK i és on es troba la mutació més prevalent (R257X) (Graf et al. 2008). En aquell moment només es coneixia una isoforma de *Cerkl* murina i, per tant, es va pensar que la deleció de l'exó 5 abolia tots els transcrits del gen. Actualment, sabem que aquest exó és el que es troba més freqüentment exclòs en les isoformes murines i, per tant, la deleció de l'exó 5 no compromet totes les isoformes. Segons els autors, aquests ratolins no van mostrar cap fenotip aparent ja que les retines eren completament normals.

A diferència del transgènic de Graf (Graf et al. 2008), el nostre ratolí havia d'ésser, *a priori*, un model *knockout* total. D'aquesta manera, es pretenia aportar noves pistes en la relació de CERKL amb la patogènesi. No obstant, el nostre model tampoc va manifestar cap fenotip morfològic o estructural a la retina. Estudis d'expressió ens van revelar que els animals KO continuaven expressant *Cerkl* en un 30-35% respecte els WT.

La deleció del promotor i l'exó 1 del gen no va ser suficient per suprimir l'expressió de *Cerkl*, ja que aquesta es donava també a partir d'altres promotors; en el cas de la retina, a partir dels promotors 3a i NeuroD1. La comparativa amb el WT va mostrar nivells semblants de transcripció a partir d'aquests promotors i, per tant, es va descartar qualsevol fenomen de compensació en els KO. Així doncs, tant el model de Graf com el nostre van resultar en ratolins *knockdown*, en comptes de *knockout*. Potser per aquest motiu no es va observar cap fenotip aparent en les retines d'aquests animals.

Després de realitzar estudis en detall en el nostre model murí, tant morfològics com electroretinogràfics, vàrem observar una pertorbació a nivell de les cèl·lules ganglionars i/o amacrines d'aquests animals. Pel que fa als resultats dels ERGs, es va detectar una davallada en les amplituds dels potencials oscil·latoris (OPs), indicatius de defectes en la transmissió del senyal a nivells d'aquests dos tipus cel·lulars. A més, estudis semi-quantitatius mitjançant Western-blot van mostrar una disminució de Brn3a, un marcador de ganglionars, cèl·lules on les hibridacions *in situ* varen revelar els majors nivells d'expressió del gen. Amb tot, aquests ratolins no mostraven cap afectació a nivell dels fotoreceptors i no recreaven el fenotip observat en els humans, fet que no es estrany en models murins de gens DR (Taula 3, pàgina 42). Arribats a aquest punt, i en relació al rol protector de CERKL en front l'apoptosi, vàrem pensar que potser observaríem algun símptoma de degeneració a nivell de fotoreceptors en condicions d'estrès lumínic. Després de sotmetre els animals a 5000-6000 lx durant 60 h, es va observar una lleugera disminució en la resposta dels bastons i mixta (cons i bastons) en els ERGs dels ratolins *Cerkl*<sup>-/-</sup>. No obstant, el dany lumínic no és molt efectiu en ratolins pigmentats, com és el cas de la soca C57BL/6J, pel que ens vam plantejar traslladar el genotip KO en fons albi, concretament a la soca CD-1. Aquesta soca, però, és portadora de la mutació espontània *rd1* (*Pde6b*<sup>-/-</sup>). De fet, estudis en soques albines revelen que el 30% de les femelles i el 56% dels mascles CD-1 mostren degeneració de retina (Serfilippi et al. 2003). Aquest fet limita l'ús de soques albines pels estudis de retina i obliga a ser molt estrictes a l'hora d'escollir els animals que formaran part de l'assaig. No obstant, realitzant un ERG previ a qualsevol experimentació amb aquests animals es poden descartar tots aquells que mostren signes de degeneració retinal. Recentment, hem obtingut els resultats dels ERGs post-estrès lumínic de la soca albina, els quals mostren una davallada significativa de la resposta dels bastons (*STR* i *Rod*) i mixta en els ratolins *Cerkl*<sup>-/-</sup>, respecte als WT (Figura 32). Aquestes dades, però, són preliminars ja que la *n* és petita per ser concloent i cal augmentar-la de 6 a 10 animals en cada cas. A més, encara manquen els estudis a nivell morfològic i estructural de les retines d'aquests animals. No obstant, amb aquests estudis hem obtingut resultats que mostren, per primera vegada, pertorbacions a nivell dels fotoreceptors de les retines de ratolins transgènics per *Cerkl*. Aquestes dades indiquen que, encara que CERKL localitza principalment als cons dels ratolins, és als bastons on s'ha vist afectada la funcionalitat visual, recreant les característiques clíniques típiques de la RP. No obstant, un estudi recent ha revelat la diferent susceptibilitat de cons i bastons en els experiments de dany lumínic, sent els bastons molt més vulnerables a l'exposició intensa de llum (Okano et al. 2012). D'aquesta manera, encara que els nostres resultats apunten una afectació dels bastons en el nostre model, no es pot descartar que els cons es puguin veure també afectats per la manca de *Cerkl*. En aquest cas, és interessant estudiar la funcionalitat de CERKL a cons i bastons de manera diferencial. Una bona estratègia per abordar aquest aspecte és la generació d'un doble KO de *Cerkl* i *Nrl*, tal i com s'ha publicat recentment en el cas del gen *Abca4* (Conley et al. 2012). Les retines dels ratolins *Nrl*<sup>-/-</sup> són *rodless*, ja que *Nrl* és un factor de transcripció el qual activa l'expressió de gens implicats en el desenvolupament i funció dels bastons (Mears et

al. 2001). D'aquesta manera, les retines d'aquests animals només presenten cons, els quals funcionen de manera totalment normal. En el cas del doble KO, observariem aquelles alteracions degudes a la manca de *Cerkl* de manera restringida als cons. Per aquesta raó, hem iniciat una col·laboració amb el grup de la Dra. Muna Naash del *University of Oklahoma Health Sciences Center* on ja s'estan realitzant els primers creuaments per tal d'obtenir els dobles KOs, *Nrl<sup>-/-</sup>/Cerkl<sup>-/-</sup>*.

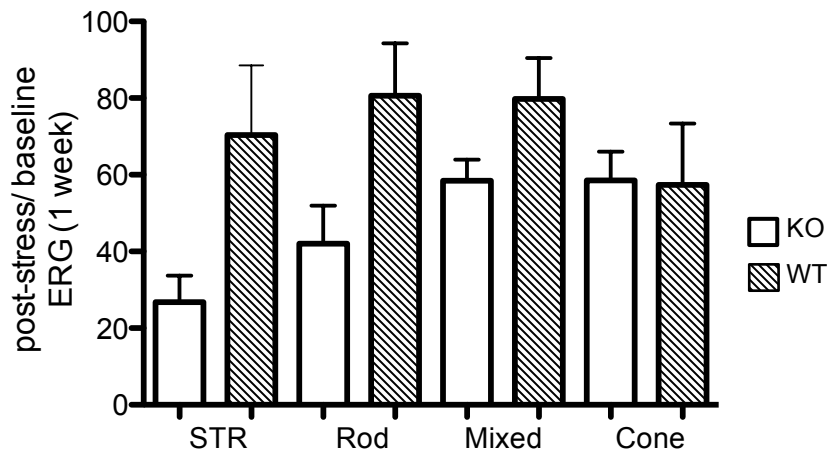


Figura 32. Diagrames corresponents a les diferents respostes analitzades en els ERGs de 6 animals WT i 6 KO. Els ratolins van ser exposats durant 68 h a 18000 lx amb atropina. Els ERGs es van realitzar una setmana després de realitzar el dany lumínic. STR, scotopic threshold response.

*A priori*, podríem pensar que el millor model per a l'estudi de les DR (o qualsevol altra malaltia), és aquell animal filogenèticament més proper a l'espècie humana, ja que suposadament reproduirà de manera més fidel el fenotip observat en els pacients. No obstant això, s'han de tenir en compte tota una sèrie d'aspectes a l'hora d'escollir el "millor" model, els quals han dut al ratolí a ser l'animal de laboratori per excel·lència en la recerca biomèdica. Per una banda, es tracta d'un mamífer (de rellevància per a l'humà) genèticament molt ben caracteritzat des que l'any 2002 es va donar a conèixer la seqüència completa del seu genoma, fet que ha permès des de llavors establir bons protocols d'enginyeria genètica per a la generació de transgènics. A més, les condicions ambientals òptimes pel seu creixement i reproducció estan ben caracteritzades i són de fàcil recreació en un estabulari, on aquests animals s'adapten fàcilment. En comparació amb d'altres mamífers, els ratolins assoleixen la maduresa sexual relativament aviat (a les 6-8 setmanes de vida) i el seu cicle reproductiu és molt curt (19-20 dies) amb llogrigades nombroses (de 6 a 12 cries). Econòmicament, el manteniment de ratolins en estabularis és molt més factible que el d'altres mamífers com les rates, gats, gossos, porcs o primats, ja que les mides mínimes estipulades per les gàbies dels ratolins són les més petites. A més, també s'ha de tenir en compte l'impacte que suposa per l'investigador el fet d'experimentar amb mamífers "propers", amb els quals el grau d'empatia és major. Amb tot, el ratolí ha esdevingut el model òptim on recrear i estudiar les malalties humanes, amb 478 soques consanguínies disponibles (Mouse Genome Database, <http://www.informatics.jax.org/>). Actualment, s'ha aconseguit analitzar poc més del 50% del total dels gens del genoma de ratolí (i, per tant, del genoma humà) mitjançant algun tipus de manipulació genètica. A més a més, només s'ha aconseguit reproduir un 6% (1.200) del total de malalties

humanes amb base genètica (al voltant d'unes 20.000). En aquest context, una sèrie d'institucions internacionals han unit esforços per tal d'assolir un projecte de grans dimensions, el *International Knockout Mouse Consortium* (<http://www.knockoutmouse.org/>), el qual té com a objectiu principal produir ratolins transgènics per tots i cadascun dels gens del genoma. No obstant, l'estudi amb ratolins té algunes limitacions, com és en el cas de les distròfies de retina. Encara que en les últimes dècades la cerca i generació de models animals per a l'estudi de les DR ha estat intensa i alhora exitosa (existeixen models de ratolí per aproximadament un 50% dels gens DR), manquen bons models que recreïn algunes patologies visuals com, per exemple, aquelles que es basen en la degeneració macular, on el ratolí (que no té màcula) no és *a priori* una bona eina d'estudi.

La dificultat dels models de ratolí per recrear el fenotip humà no es restringeix només a les distròfies maculars, sinó que és extens a les distròfies de retina en general. Per aquest motiu, en els últims anys el peix zebra ha emergit com un model alternatiu on estudiar els mecanismes d'aquestes patologies. Es tracta d'un animal diürn (a diferència del ratolí) on els principals tipus cel·lulars i estructura de l'ull es troben altament conservats. El seu desenvolupament embrionari és ràpid i la transparència de l'embrió permet una observació del fenotip a temps real. A més, l'obtenció d'un mutant en aquests animals és relativament fàcil i econòmicament abordable. En aquest context i després d'observar les limitacions del nostre model murí, ens vàrem plantejar la generació d'un *knockdown* a peix zebra mitjançant la microinjecció de morfolinos. Tenint en compte els precedents en ratolí, on el fet de no haver realitzat prèviament un estudi en detall de l'expressió, l'*splicing* i l'ús de promotors alternatius del gen va comportar l'obtenció d'un model diferent al previst, prèviament a la generació del model en peix zebra vàrem realitzar un estudi acurat a nivell genòmic i transcripcional de *cerkl*. Les dades obtingudes van ser imprescindibles a l'hora de dissenyar la localització dels morfolinos, per tal de bloquejar l'*splicing* de totes les isoformes del gen. Els mutants de *cerkl* en peix zebra varen mostrar un seguit d'anomalies en el desenvolupament de la retina, les quals incloïen una reducció de la mida de l'ull, problemes en la laminació de les tres capes de la retina i absència de segments externs en els fotoreceptors, tant en els cons com en el bastons. Encara que aquest fenotip s'ha observat en d'altres models DR de peix zebra, és difícil determinar si els gens silenciats es troben implicats en el desenvolupament de la retina embrionària i, per tant, els problemes en la formació d'aquesta venen donats per un efecte directe. No obstant i malgrat aquest model tampoc recrea fidelment el fenotip observat en els humans, hem pogut comprovar la importància de la funció de CERKL a la retina. Malgrat no disposem de dades d'expressió de *CERKL* en retines fetals humanes, diferències espacio-temporals en l'expressió del gen podrien explicar la diversitat de fenotips observats en humà, ratolí i peix zebra. En aquest últim, l'expressió de *cerkl* s'inicia molt aviat en el desenvolupament de l'embrió i s'incrementa al voltant de les 20 i 30 hpf, a l'inici de la formació de la retina; mentre que en ratolí, i encara que s'ha detectat expressió embrionària, el màxim d'expressió del gen no arriba fins a P60, amb la retina completament formada.

A part de la facilitat que ofereix per obtenir models, el peix zebra també ha despertat molt interès en el marc de les DR, en la capacitat de regenerar bastons al llarg de tota la vida a partir de cèl·lules pluripotents situades a la perifèria de la retina. A més, quan aquests animals pateixen algun tipus de dany a la retina, ja sigui lumínic, químic o físic, les cèl·lules de Müller són capaces de migrar a la zona afectada i diferenciar-se en qualsevol tipus de cèl·lula, entre elles fotoreceptors, regenerant la zona afectada. És sobretot en aquest últim

cas on s'han centrat molts estudis en els últims anys per tal de discernir quins són els factors que senyalitzen i estimulen la migració, la proliferació i la diferenciació de les cèl·lules de Müller, les quals existeixen també en la retina humana però no són capaces de regenerar el teixit un cop degenerat, per exemple, en les DR (Morris et al. 2011, Nelson et al. 2012, Nelson i Hyde 2012). Amb tot, l'experimentació animal ofereix nombrosos beneficis ja que permet estudiar i entendre els mecanismes implicats en la malaltia, tant a nivell histopatològic, molecular com electrofisiològic, però també investigar en els tractaments amb fàrmacs i teràpia gènica, amb l'objectiu principal de, en un futur no molt llunyà, prevenir o frenar la degeneració retinal en els pacients.

## 9. PERSPECTIVES FUTURES

Els avenços realitzats en genètica molecular en els darrers anys han estat basats en el desenvolupament de metodologies per manipular el DNA. Les tècniques de clonació, PCR i seqüenciació destaquen de la resta per la seva transcendència i aplicabilitat. En paral·lel, s'han obtingut eines bioinformàtiques molt potents per establir i manipular bases de dades d'interès biològic. L'evolució d'aquestes metodologies també ha estat espectacular degut a la incorporació progressiva d'estratègies d'alt rendiment (*highthroughput*) en l'estudi dels genomes. Al començament dels 80, el nombre de *loci* i gens coneguts causants de distròfies de retina era inferior a 5; aquest nombre avui ha crescut fins gairebé els 200 i continua incrementant-se. En relació a les patologies mendelianes, com les distròfies de retina objecte d'estudi en aquesta tesi, el coneixement dels gens responsables és el primer pas per dur a terme un diagnòstic genètic eficaç i començar a entendre les causes moleculars de les malalties. En el futur, i per tal d'oferir als pacients un diagnòstic eficient i teràpies efectives, caldrà combinar la recerca en els camps de la genètica, la biologia molecular, la proteòmica i l'oftalmologia. Per tal d'identificar la causa genètica dels 50% de les distròfies de retina que queden per diagnosticar, cal descobrir nous gens i nous tipus de mutacions, millorant en les estratègies de seqüenciació massiva genòmica (WGS) i exòmica (WES) per tal que cobreixin les regions riques en repeticions i detectin les delecions en heterozigosi. A més, aquestes eines s'hauran d'adequar al diagnòstic rutinari, tant pel que fa a costos econòmics, com temporals i de personal. En l'oftalmologia, i sempre que sigui possible, caldrà desenvolupar, validar i utilitzar correlacions genotip-fenotip, que facilitaran el diagnòstic genètic i milloraran la fiabilitat del pronòstic. La teràpia gènica, serà aviat possible en els casos on es conegui la causa genètica de la malaltia i a més es tingui un ampli coneixement de la funció del gen afectat. En aquest punt, la generació de models *in vivo* i *in vitro* són imprescindibles per comprendre els mecanismes d'aquestes patologies i per identificar les vies cel·lulars afectades en cada cas. A més, aquests models serveixen per avaluar l'efecte en la teràpia del tipus de vector, la dosi, o la via d'inoculació del gen terapèutic. En les últimes dècades, s'han publicat molts estudis de reemplaçament gènic mitjançant injeccions subretinals de construccions víriques en models animals portadors de mutacions nul·les en diversos gens DR (entre ells *RPE65*, *PDE6B*, *RDS*, *RPGRIP1* i *GUCY2D*) i, des de fa uns anys, ja s'estan realitzant amb èxit els primers assajos clínics en pacients de LCA portadors de mutacions a *RPE65*, els quals proveeixen una bona base a partir de la qual expandir aquesta tecnologia a la resta de gens causants de distròfies de retina.



# Conclusions



# CONCLUSIONS

---

1. La caracterització detallada de l'expressió de *CERKL* en vertebrats ha revelat una elevada heterogeneïtat d'isoformes transcripcionals, tant a nivell intra com interespecífic. S'han identificat 21 transcrits en humà, 32 en ratolí, 5 en pollastre, 2 en granota i 3 en peix zebra, 41 dels quals han estat descrits *de novo*. D'aquests, només la isoforma *h2* (NM\_201548.4) es troba conservada en totes les espècies analitzades. L'anàlisi comparativa a vertebrats de l'expressió tissular de *CERKL* mostra semblances importants a nivell del sistema nerviós central, amb una elevada expressió a la retina en els casos d'humà, murí i peix zebra.

2. Les causes de l'elevada heterogeneïtat de les isoformes transcripcionals de *CERKL* a mamífers són l'*splicing* diferencial i l'ús de promotors alternatius. Mitjançant metodologies *in silico* i experimentals, s'han identificat 4 inicis de transcripció (TSSs) a humà i a ratolí, dos d'ells conservats en ambdues espècies; el de *CERKL* i el del gen adjacent a 5', *NEUROD1*. Considerant les espècies analitzades, l'ús del promotor de *NEUROD1* es troba restringit a amniotes.

3. La comparativa transcripcional de *Cerkl* a ratolí revela l'existència de promotors específics de teixit. La retina presenta el grau més elevat d'heterogeneïtat transcripcional; s'han identificat 25 isoformes diferents d'un total de 32.

4. En humà, estudis *in silico* de matrius Kozak i experiments *in vitro* han demostrat un nou inici de traducció (TIS) a l'exó 5 de *CERKL*.

5. L'anàlisi de 6 famílies espanyoles ha posat de manifest que totes elles comparteixen 3 marcadors genètics (260 kb de longitud) de la regió que comprèn la mutació R257X de *CERKL*. L'estudi de minigens de *CERKL* en cèl·lules HEK293T ha demostrat que els transcrits que contenen la mutació R257X es degraden via NMD.

6. El ratolí transgènic *knockout* (*Cerkl*<sup>-/-</sup>) presenta alteracions lleus a la retina comparat amb el fenotip humà. Els estudis electroretinogràfics mostren alteracions en els potencials oscil·latoris (OPs), indicatius de perturbacions a les cèl·lules ganglionars i/o amacrines. A nivell de marcadors cel·lulars s'observa una davallada del factor de transcripció Brn3a, específic de les cèl·lules ganglionars.

7. Les retines dels ratolins *Cerkl*<sup>-/-</sup> mostren signes clars d'estrès cel·lular, amb nivells elevats de la proteïna glial GFAP; i també d'apoptosi, amb un increment significatiu del nombre de cèl·lules apoptòtiques detectades mitjançant assaigs TUNEL.

8. Els embrions *knockdown* de *cerkl* de peix zebra presenten ulls de mida reduïda, defectes en la laminació de la retina, absència de segments externs tant en els cons com en els bastons i increment de l'apoptosi cel·lular. *Cerkl* no sembla contribuir en el desenvolupament primerenc de la retina, si bé podria participar en processos de degeneració secundaris.

## Conclusions

9. Estudis de transfecció de CERKL humana en cultius cel·lulars demostren que el transport de la proteïna del nucli al citoplasma es troba regulat per l'exportina CRM1. En la retina murina, CERKL presenta un elevat dinamisme entre els compartiments citoplasmàtic i nuclear, amb una localització específica en cada tipus cel·lular. A nivell de fotoreceptors, la proteïna localitza principalment a cons.

10. La causa molecular d'una família espanyola afectada de XL-RP és una mutació d'*splicing*, c.1073-9T>A, al gen *RP2*. Aquesta substitució nucleotídica causa l'escissió d'un exó i genera l'aparició d'un codó *stop* prematur. En les dones portadores s'observa un biaix en l'expressió dels dos al·lels a nivell de les cèl·lules sanguínies.



# Abreviatures



# ABREVIATURES

---

ad	Autosòmic dominant
AGK	Diacilglicerol quinasa
ar	Autosòmic recessiu
AS	<i>Splicing</i> alternatiu
BB	Cos basal
C-CAP	Domini d'homologia al cofactor C
C1P	Ceramida-1-fosfat
CC	Cili connector
CDasa	Ceramidasa
Cer	Ceramida
CERK	Quinasa de ceramides
CHX	Cicloheximida
CRD	Distròfia de cons i bastons
DAGK	Domini diacilglicerol quinasa
dpf	Dies post fertilització
eRF	Factor d'alliberament eucariota
ERG	Electroretinograma
FBS	Sèrum fetal boví
G418	Geneticina
GAP	Proteïna activadora de GTPases
GCAP	Proteïna activadora de guanilat ciclases
GCL	Capa cèl·lules ganglionars
GCS	Glucosilceramida sintasa
HA	Hemaglutinina
hpf	Hores post fertilització
IFT	Transport intraflagelar
INL	Capa nuclear interna
IPL	Capa plexiforme interna
IS	Segment intern
LCA	Amaurosi congènita de Leber
MAF	Freqüència al·lel minoritari
NCS	Proteïna neuronal sensora de calci
NDPK	Domini d'homologia a les nucleòsid difosfat quinases
NES	Senyal d'exportació nuclear
NLS	Senyal de localització nuclear
NMD	<i>Nonsense-mediated decay</i>
ONL	Capa nuclear externa
OP	Potencial oscil·latori
OPL	Capa plexiforme externa

## Abreviatures

ORF	Pauta de lectura oberta
OS	Segment extern
PH	Domini d'homologia a plextrina
Phr o PR	Fotoreceptor
PTC	Codó stop prematur
RCD	Distròfia de bastons i cons
RD	Distròfies de retina
RetGC	Guanlitat ciclase de retina
RNP	Complex ribonucleoproteic
RP	Retinosi pigmentària
RPE	Epiteli pigmentari
SMasa	Esfingomielinasa
SMS	Esfingomielina sintasa
SNP	Polimorfisme d'un sol nucleòtid
snRNA	RNA nuclear petit
SPHK	Quinasa d'esfingosines
TIS	Lloc d'inici de traducció
TSS	Lloc d'inici de transcripció
XL	Lligat al cromosoma X



# Bibliografia



# BIBLIOGRAFIA

---

## A

- Abu-Safieh, L., Vithana, E. N. et al. (2006). "A large deletion in the adRP gene PRPF31: evidence that haploinsufficiency is the cause of disease." *Mol Vis* 12: 384-388.
- Aguirre, G., Alligood, J. et al. (1982). "Pathogenesis of progressive rod-cone degeneration in miniature poodles." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23(5): 610-630.
- Aguirre, G. D., Yashar, B. M. et al. (2002). "Retinal histopathology of an XLRP carrier with a mutation in the RPGR exon ORF15." *Exp Eye Res* 75(4): 431-443.
- Aherne, A., Kennan, A. et al. (2004). "On the molecular pathology of neurodegeneration in IMPDH1-based retinitis pigmentosa." *Hum Mol Genet* 13(6): 641-650.
- Akhmedov, N. B., Piriev, N. I. et al. (2000). "A deletion in a photoreceptor-specific nuclear receptor mRNA causes retinal degeneration in the rd7 mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10): 5551-5556.
- Aleman, T. S., Soumitra, N. et al. (2009). "CERKL mutations cause an autosomal recessive cone-rod dystrophy with inner retinopathy." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(12): 5944-5954.
- Ali, M., Ramprasad, V. L. et al. (2008). "A missense mutation in the nuclear localization signal sequence of CERKL (p.R106S) causes autosomal recessive retinal degeneration." *Mol Vis* 14: 1960-1964.
- Ali, R. R., Sarra, G. M. et al. (2000). "Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy." *Nat Genet* 25(3): 306-310.
- Auslender, N., Sharon, D. et al. (2007). "A common founder mutation of CERKL underlies autosomal recessive retinal degeneration with early macular involvement among Yemenite Jews." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(12): 5431-5438.
- Avidor-Reiss, T., Maer, A. M. et al. (2004). "Decoding cilia function: defining specialized genes required for compartmentalized cilia biogenesis." *Cell* 117(4): 527-539.
- Avila-Fernandez, A., Cantalapiedra, D. et al. (2010). "Mutation analysis of 272 Spanish families affected by autosomal recessive retinitis pigmentosa using a genotyping microarray." *Mol Vis* 16: 2550-2558.
- Avila-Fernandez, A., Riveiro-Alvarez, R. et al. (2008). "CERKL mutations and associated phenotypes in seven Spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(6): 2709-2713.

## B

- Bachmann-Gagescu, R., Phelps, I. G. et al. (2011). "The ciliopathy gene *cc2d2a* controls zebrafish photoreceptor outer segment development through a role in Rab8-dependent vesicle trafficking." *Hum Mol Genet* 20(20): 4041-4055.
- Banin, E., Mizrahi-Meissonnier, L. et al. (2007). "A non-ancestral RPGR missense mutation in families with either recessive or semi-dominant X-linked retinitis pigmentosa." *Am J Med Genet A* 143A(11): 1150-1158.
- Baye, L. M., Patrinoastro, X. et al. (2011). "The N-terminal region of centrosomal protein 290 (CEP290) restores vision in a zebrafish model of human blindness." *Hum Mol Genet* 20(8): 1467-1477.
- Bayes, M., Goldaracena, B. et al. (1998). "A new autosomal recessive retinitis pigmentosa locus maps on chromosome 2q31-q33." *J Med Genet* 35(2): 141-145.
- Benaglio, P., Nishiguch, K. et al. (2012). "Exome Sequencing In Individual Patients With Recessive Retinal Degeneration As A Tool For Mutation And Disease Gene Discovery." *ARVO*.

## Bibliografia

- Berger, W., Kloeckener-Gruissem, B. et al. (2010). "The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases." *Prog Retin Eye Res* 29(5): 335-375.
- Berson, E. L., Gouras, P. et al. (1969). "Temporal aspects of the electroretinogram." *Arch Ophthalmol* 81(2): 207-214.
- Berson, E. L., Rosner, B. et al. (1993). "A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa." *Arch Ophthalmol* 111(6): 761-772.
- Bi, F. C., Zhang, Q. F. et al. "A conserved cysteine motif is critical for rice ceramide kinase activity and function." *PLoS One* 6(3): e18079.
- Boldt, K., Mans, D. A. et al. (2011). "Disruption of intraflagellar protein transport in photoreceptor cilia causes Leber congenital amaurosis in humans and mice." *J Clin Invest* 121(6): 2169-2180.
- Bornancin, F., Mechtcheriakova, D. et al. (2005). "Characterization of a ceramide kinase-like protein." *Biochim Biophys Acta* 1687(1-3): 31-43.
- Bowes, C., Li, T. et al. (1990). "Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase." *Nature* 347(6294): 677-680.
- Branham, K., Othman, M. et al. (2012). "Mutations in RPGR and RP2 account for 15% of males with simplex retinal degenerative disease." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53(13): 8232-8237.
- Brogna, S. and Wen, J. (2009). "Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms." *Nat Struct Mol Biol* 16(2): 107-113.
- Brückner, R. (1951). "Spaltlampenmikroskopie und Ophthalmoskopie am Auge von Ratte und Maus." *Documenta Ophthalmologica* 5-6: 452-554.
- Buch, P. K., Mihelec, M. et al. (2011). "Dominant cone-rod dystrophy: a mouse model generated by gene targeting of the GCAP1/Guca1a gene." *PLoS One* 6(3): e18089.
- Bujakowska, K., Maubaret, C. et al. (2009). "Study of gene-targeted mouse models of splicing factor gene Prpf31 implicated in human autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP)." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(12): 5927-5933.
- Burset, M., Seledtsov, I. A. et al. (2000). "Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes." *Nucleic Acids Res* 28(21): 4364-4375.

## C

- Camenisch, T. D., Koller, B. H. et al. (1999). "A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF-alpha production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock." *J Immunol* 162(6): 3498-3503.
- Carre, A., Graf, C. et al. (2004). "Ceramide kinase targeting and activity determined by its N-terminal pleckstrin homology domain." *Biochem Biophys Res Commun* 324(4): 1215-1219.
- Cavenagh, M. M., Breiner, M. et al. (1994). "ADP-ribosylation factor (ARF)-like 3, a new member of the ARF family of GTP-binding proteins cloned from human and rat tissues." *J Biol Chem* 269(29): 18937-18942.
- Chader, G. J. (2002). "Animal models in research on retinal degenerations: past progress and future hope." *Vision Res* 42(4): 393-399.
- Chakarova, C. F., Khanna, H. et al. (2011). "TOPORS, implicated in retinal degeneration, is a cilia-centrosomal protein." *Hum Mol Genet* 20(5): 975-987.
- Chang, B., Grau, T. et al. (2009). "A homologous genetic basis of the murine cpfl1 mutant and human achromatopsia linked to mutations in the PDE6C gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(46): 19581-19586.

- Chang, B., Hawes, N. L. et al. (2007). "Two mouse retinal degenerations caused by missense mutations in the beta-subunit of rod cGMP phosphodiesterase gene." *Vision Res* 47(5): 624-633.
- Chang, B., Khanna, H. et al. (2006). "In-frame deletion in a novel centrosomal/ciliary protein CEP290/NPHP6 perturbs its interaction with RPGR and results in early-onset retinal degeneration in the rd16 mouse." *Hum Mol Genet* 15(11): 1847-1857.
- Chapple, J. P., Hardcastle, A. J. et al. (2000). "Mutations in the N-terminus of the X-linked retinitis pigmentosa protein RP2 interfere with the normal targeting of the protein to the plasma membrane." *Hum Mol Genet* 9(13): 1919-1926.
- Chapple, J. P., Hardcastle, A. J. et al. (2002). "Delineation of the plasma membrane targeting domain of the X-linked retinitis pigmentosa protein RP2." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(6): 2015-2020.
- Chen, P., Hao, W. et al. (2001). "A photic visual cycle of rhodopsin regeneration is dependent on Rgr." *Nat Genet* 28(3): 256-260.
- Churbanov, A., Winters-Hilt, S. et al. (2008). "Accumulation of GC donor splice signals in mammals." *Biol Direct* 3: 30.
- Churchill, J. D., Bowne, S. J. et al. (2013). "Mutations in the X-linked Retinitis Pigmentosa Genes RPGR and RP2 Found in 8.5% of Families with a Provisional Diagnosis of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa." *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
- Clarke, G., Goldberg, A. F. et al. (2000). "Rom-1 is required for rod photoreceptor viability and the regulation of disk morphogenesis." *Nat Genet* 25(1): 67-73.
- Collin, R. W., Littink, K. W. et al. (2008). "Identification of a 2 Mb human ortholog of *Drosophila* eyes shut/spacemaker that is mutated in patients with retinitis pigmentosa." *Am J Hum Genet* 83(5): 594-603.
- Conley, S. M., Cai, X. et al. (2012). "Increased cone sensitivity to ABCA4 deficiency provides insight into macular vision loss in Stargardt's dystrophy." *Biochim Biophys Acta* 1822(7): 1169-1179.
- Coppieters, F., Casteels, I. et al. (2010). "Genetic screening of LCA in Belgium: predominance of CEP290 and identification of potential modifier alleles in AHI1 of CEP290-related phenotypes." *Hum Mutat* 31(10): E1709-1766.
- Curtis, R. and Barnett, K. C. (1993). "Progressive retinal atrophy in miniature longhaired dachshund dogs." *Br Vet J* 149(1): 71-85.
- Curtis, R., Barnett, K. C. et al. (1987). "An early-onset retinal dystrophy with dominant inheritance in the Abyssinian cat. Clinical and pathological findings." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28(1): 131-139.
- Cuvillier, A., Redon, F. et al. (2000). "LdARL-3A, a *Leishmania* promastigote-specific ADP-ribosylation factor-like protein, is essential for flagellum integrity." *J Cell Sci* 113 ( Pt 11): 2065-2074.

## D

- Daiger, S. P., Bowne, S. J. et al. (2007). "Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa." *Arch Ophthalmol* 125(2): 151-158.
- den Hollander, A. I., Black, A. et al. (2010). "Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies." *J Clin Invest* 120(9): 3042-3053.
- den Hollander, A. I., Roepman, R. et al. (2008). "Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms." *Prog Retin Eye Res* 27(4): 391-419.
- Ding, X. Q., Harry, C. S. et al. (2009). "Impaired cone function and cone degeneration resulting from CNGB3 deficiency: down-regulation of CNGA3 biosynthesis as a potential mechanism." *Hum Mol Genet* 18(24): 4770-4780.
- Ding, X. Q., Nour, M. et al. (2004). "The R172W mutation in peripherin/rds causes a cone-rod dystrophy in transgenic mice." *Hum Mol Genet* 13(18): 2075-2087.

## Bibliografia

- Downs, L. M., Bell, J. S. et al. (2012). "Late-onset progressive retinal atrophy in the Gordon and Irish Setter breeds is associated with a frameshift mutation in C2orf71." *Anim Genet*.
- Dryja, T. P., Hahn, L. B. et al. (1997). "Dominant and digenic mutations in the peripherin/RDS and ROM1 genes in retinitis pigmentosa." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(10): 1972-1982.
- Dryja, T. P., McGee, T. L. et al. (2005). "Night blindness and abnormal cone electroretinogram ON responses in patients with mutations in the GRM6 gene encoding mGluR6." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(13): 4884-4889.
- Dryja, T. P., McGee, T. L. et al. (1990). "Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa." *N Engl J Med* 323(19): 1302-1307.
- Dyer, M. A., Donovan, S. L. et al. (2004). "Retinal degeneration in Aipl1-deficient mice: a new genetic model of Leber congenital amaurosis." *Brain Res Mol Brain Res* 132(2): 208-220.

## E

- Ebermann, I., Phillips, J. B. et al. (2010). "PDZD7 is a modifier of retinal disease and a contributor to digenic Usher syndrome." *J Clin Invest* 120(6): 1812-1823.
- Estrada-Cuzcano, A., Roepman, R. et al. (2012). "Non-syndromic retinal ciliopathies: translating gene discovery into therapy." *Hum Mol Genet* 21(R1): R111-124.
- Evans, R. J., Schwarz, N. et al. (2010). "The retinitis pigmentosa protein RP2 links pericentriolar vesicle transport between the Golgi and the primary cilium." *Hum Mol Genet* 19(7): 1358-1367.

## F

- Fagnani, M., Barash, Y. et al. (2007). "Functional coordination of alternative splicing in the mammalian central nervous system." *Genome Biol* 8(6): R108.
- Fahim, A. T., Bowne, S. J. et al. (2011). "Allelic heterogeneity and genetic modifier loci contribute to clinical variation in males with X-linked retinitis pigmentosa due to RPGR mutations." *PLoS One* 6(8): e23021.
- Ferrante, M. I., Romio, L. et al. (2009). "Convergent extension movements and ciliary function are mediated by ofd1, a zebrafish orthologue of the human oral-facial-digital type 1 syndrome gene." *Hum Mol Genet* 18(2): 289-303.
- Ferrante, M. I., Zullo, A. et al. (2006). "Oral-facial-digital type I protein is required for primary cilia formation and left-right axis specification." *Nat Genet* 38(1): 112-117.
- Fishman, G. A. (1978). "Retinitis pigmentosa. Visual loss." *Arch Ophthalmol* 96(7): 1185-1188.
- Floquet, C., Hatin, I. et al. (2012). "Statistical analysis of readthrough levels for nonsense mutations in mammalian cells reveals a major determinant of response to gentamicin." *PLoS Genet* 8(3): e1002608.
- Friedman, J. S., Chang, B. et al. (2006). "Premature truncation of a novel protein, RD3, exhibiting subnuclear localization is associated with retinal degeneration." *Am J Hum Genet* 79(6): 1059-1070.
- Furukawa, T., Morrow, E. M. et al. (1999). "Retinopathy and attenuated circadian entrainment in Crx-deficient mice." *Nat Genet* 23(4): 466-470.

## G

- Gamsiz, E. D., Ouyang, Q. et al. (2012). "Genome-wide transcriptome analysis in murine neural retina using high-throughput RNA sequencing." *Genomics* 99(1): 44-51.
- Garanto, A., Mandal, N. A. et al. (2013). "Specific sphingolipid content decrease in Cerkl knockdown mouse retinas." *Exp Eye Res.*
- Gerner, M., Haribaskar, R. et al. (2010). "The retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1 (RPGRIP1) links RPGR to the nephronophthisis protein network." *Kidney Int* 77(10): 891-896.
- Gomez-Munoz, A., Frago, L. M. et al. (1997). "Stimulation of DNA synthesis by natural ceramide 1-phosphate." *Biochem J* 325 ( Pt 2): 435-440.
- Graf, C., Niwa, S. et al. (2008). "Wild-type levels of ceramide and ceramide-1-phosphate in the retina of ceramide kinase-like-deficient mice." *Biochem Biophys Res Commun* 373(1): 159-163.
- Graveley, B. R. (2001). "Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world." *Trends Genet* 17(2): 100-107.
- Graziotto, J. J., Farkas, M. H. et al. (2011). "Three gene-targeted mouse models of RNA splicing factor RP show late-onset RPE and retinal degeneration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(1): 190-198.
- Graziotto, J. J., Inglehearn, C. F. et al. (2008). "Decreased levels of the RNA splicing factor Prpf3 in mice and zebrafish do not cause photoreceptor degeneration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(9): 3830-3838.
- Green, E. S., Menz, M. D. et al. (2000). "Characterization of rhodopsin mis-sorting and constitutive activation in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(6): 1546-1553.

## H

- Hafezi, F., Grimm, C. et al. (2000). "Molecular ophthalmology: an update on animal models for retinal degenerations and dystrophies." *Br J Ophthalmol* 84(8): 922-927.
- Hagstrom, S. A., Adamian, M. et al. (2001). "A role for the Tubby-like protein 1 in rhodopsin transport." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(9): 1955-1962.
- Hamel, C. (2006). "Retinitis pigmentosa." *Orphanet J Rare Dis* 1: 40.
- Hamel, C. P. (2007). "Cone rod dystrophies." *Orphanet J Rare Dis* 2: 7.
- Hannun, Y. A. and Luberto, C. (2000). "Ceramide in the eukaryotic stress response." *Trends Cell Biol* 10(2): 73-80.
- Hartong, D. T., Berson, E. L. et al. (2006). "Retinitis pigmentosa." *Lancet* 368(9549): 1795-1809.
- Hong, D. H., Pawlyk, B. S. et al. (2004). "Dominant, gain-of-function mutant produced by truncation of RPGR." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(1): 36-41.
- Hong, D. H., Pawlyk, B. S. et al. (2005). "A single, abbreviated RPGR-ORF15 variant reconstitutes RPGR function in vivo." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(2): 435-441.
- Hong, D. H., Pawlyk, B. S. et al. (2000). "A retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-deficient mouse model for X-linked retinitis pigmentosa (RP3)." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3649-3654.
- Humphries, M. M., Rancourt, D. et al. (1997). "Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene." *Nat Genet* 15(2): 216-219.
- Hutten, S. and Kehlenbach, R. H. (2007). "CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond." *Trends Cell Biol* 17(4): 193-201.

## Bibliografia

Huttl, S., Michalakos, S. et al. (2005). "Impaired channel targeting and retinal degeneration in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel subunit CNGB1." *J Neurosci* 25(1): 130-138.

## I

Iacovelli, J., Zhao, C. et al. (2011). "Generation of Cre transgenic mice with postnatal RPE-specific ocular expression." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(3): 1378-1383.

Iannaccone, A., Breuer, D. K. et al. (2003). "Clinical and immunohistochemical evidence for an X linked retinitis pigmentosa syndrome with recurrent infections and hearing loss in association with an RPGR mutation." *J Med Genet* 40(11): e118.

Iannaccone, A., Rispoli, E. et al. (1995). "Correlation between Goldmann perimetry and maximal electroretinogram response in retinitis pigmentosa." *Doc Ophthalmol* 90(2): 129-142.

Ikeda, S., Shiva, N. et al. (2000). "Retinal degeneration but not obesity is observed in null mutants of the tubby-like protein 1 gene." *Hum Mol Genet* 9(2): 155-163.

Inagaki, Y., Mitsutake, S. et al. (2006). "Identification of a nuclear localization signal in the retinitis pigmentosa-mutated RP26 protein, ceramide kinase-like protein." *Biochem Biophys Res Commun* 343(3): 982-987.

## J

Jang, G. F., Van Hooser, J. P. et al. (2001). "Characterization of a dehydrogenase activity responsible for oxidation of 11-cis-retinol in the retinal pigment epithelium of mice with a disrupted RDH5 gene. A model for the human hereditary disease fundus albipunctatus." *J Biol Chem* 276(35): 32456-32465.

## K

Kajiwara, K., Berson, E. L. et al. (1994). "Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci." *Science* 264(5165): 1604-1608.

Keeler, C. E. (1924). "The Inheritance of a Retinal Abnormality in White Mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 10(7): 329-333.

Kefalov, V. J. (2011). "Rod and cone visual pigments and phototransduction through pharmacological, genetic, and physiological approaches." *J Biol Chem* 287(3): 1635-1641.

Kim, E., Magen, A. et al. (2007). "Different levels of alternative splicing among eukaryotes." *Nucleic Acids Res* 35(1): 125-131.

Kirschner, R., Rosenberg, T. et al. (1999). "RPGR transcription studies in mouse and human tissues reveal a retina-specific isoform that is disrupted in a patient with X-linked retinitis pigmentosa." *Hum Mol Genet* 8(8): 1571-1578.

Koenekoop, R. K. (2004). "An overview of Leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development." *Surv Ophthalmol* 49(4): 379-398.

Koenekoop, R. K., Lopez, I. et al. (2007). "Genetic testing for retinal dystrophies and dysfunctions: benefits, dilemmas and solutions." *Clin Experiment Ophthalmol* 35(5): 473-485.

Kolb, H. (2003). "How the retina works." *American Scientist* 91(1): 28-35.

Krawczak, M., Reiss, J. et al. (1992). "The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences." *Hum Genet* 90(1-2): 41-54.

- Kuhnel, K., Veltel, S. et al. (2006). "Crystal structure of the human retinitis pigmentosa 2 protein and its interaction with Arl3." *Structure* 14(2): 367-378.
- Kukekova, A. V., Goldstein, O. et al. (2009). "Canine RD3 mutation establishes rod-cone dysplasia type 2 (rcd2) as ortholog of human and murine rd3." *Mamm Genome* 20(2): 109-123.
- Kumanogoh, A., Shikina, T. et al. (2005). "Nonredundant roles of Sema4A in the immune system: defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in Sema4A-deficient mice." *Immunity* 22(3): 305-316.
- Kurth, I., Thompson, D. A. et al. (2007). "Targeted disruption of the murine retinal dehydrogenase gene Rdh12 does not limit visual cycle function." *Mol Cell Biol* 27(4): 1370-1379.
- Kuznetsova, T., Zangerl, B. et al. (2011). "Structural organization and expression pattern of the canine RPGRIP1 isoforms in retinal tissue." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(6): 2989-2998.

## L

- Li, L., Nakaya, N. et al. (2010). "A mutation in ZNF513, a putative regulator of photoreceptor development, causes autosomal-recessive retinitis pigmentosa." *Am J Hum Genet* 87(3): 400-409.
- Li, T., Snyder, W. K. et al. (1996). "Transgenic mice carrying the dominant rhodopsin mutation P347S: evidence for defective vectorial transport of rhodopsin to the outer segments." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 14176-14181.
- Lidome, E., Graf, C. et al. (2008). "A conserved cysteine motif essential for ceramide kinase function." *Biochimie* 90(10): 1560-1565.
- Lieschke, G. J. and Currie, P. D. (2007). "Animal models of human disease: zebrafish swim into view." *Nat Rev Genet* 8(5): 353-367.
- Linder, B., Dill, H. et al. (2010). "Systemic splicing factor deficiency causes tissue-specific defects: a zebrafish model for retinitis pigmentosa." *Hum Mol Genet* 20(2): 368-377.
- Liou, G. I., Fei, Y. et al. (1998). "Early onset photoreceptor abnormalities induced by targeted disruption of the interphotoreceptor retinoid-binding protein gene." *J Neurosci* 18(12): 4511-4520.
- Littink, K. W., Koenekoop, R. K. et al. (2010). "Homozygosity mapping in patients with cone-rod dystrophy: novel mutations and clinical characterizations." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(11): 5943-5951.
- Liu, J., Huang, Q. et al. (2005). "Distinct gene expression profiles and reduced JNK signaling in retinitis pigmentosa caused by RP1 mutations." *Hum Mol Genet* 14(19): 2945-2958.
- Liu, Q., Zuo, J. et al. (2004). "The retinitis pigmentosa 1 protein is a photoreceptor microtubule-associated protein." *J Neurosci* 24(29): 6427-6436.
- Liu, X., Bulgakov, O. V. et al. (2007). "Usherin is required for maintenance of retinal photoreceptors and normal development of cochlear hair cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(11): 4413-4418.
- Liu, X., Bulgakov, O. V. et al. (2004). "AIPL1, the protein that is defective in Leber congenital amaurosis, is essential for the biosynthesis of retinal rod cGMP phosphodiesterase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(38): 13903-13908.
- Lu, X. and Ferreira, P. A. (2005). "Identification of novel murine- and human-specific RPGRIP1 splice variants with distinct expression profiles and subcellular localization." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(6): 1882-1890.

## M

- Machida, S., Kondo, M. et al. (2000). "P23H rhodopsin transgenic rat: correlation of retinal function with histopathology." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(10): 3200-3209.
- Maeda, T., Cideciyan, A. V. et al. (2009). "Loss of cone photoreceptors caused by chromophore depletion is partially prevented by the artificial chromophore pro-drug, 9-cis-retinyl acetate." *Hum Mol Genet* 18(12): 2277-2287.
- Maita, H., Kitauro, H. et al. (2005). "Association of PAP-1 and Prp3p, the products of causative genes of dominant retinitis pigmentosa, in the tri-snRNP complex." *Exp Cell Res* 302(1): 61-68.
- Makino, C. L., Peshenko, I. V. et al. (2008). "A role for GCAP2 in regulating the photoresponse. Guanylyl cyclase activation and rod electrophysiology in GUCA1B knock-out mice." *J Biol Chem* 283(43): 29135-29143.
- Makino, C. L., Wen, X. H. et al. (2012). "Enzymatic relay mechanism stimulates cyclic GMP synthesis in rod photoresponse: biochemical and physiological study in guanylyl cyclase activating protein 1 knockout mice." *PLoS One* 7(10): e47637.
- Malhotra, V. and Erlmann, P. (2011). "Protein export at the ER: loading big collagens into COPII carriers." *EMBO J* 30(17): 3475-3480.
- Mandal, N. A., Tran, J. T. et al. (2012). "Expression and localization of CERKL in the mammalian retina, its response to light-stress, and relationship with NeuroD1 gene." *Exp Eye Res* 106: 24-33.
- Mansergh, F. C., Millington-Ward, S. et al. (1999). "Retinitis pigmentosa and progressive sensorineural hearing loss caused by a C12258A mutation in the mitochondrial MTTS2 gene." *Am J Hum Genet* 64(4): 971-985.
- Marshall, H., Bhaumik, M. et al. (2010). "Deficiency of the dual ubiquitin/SUMO ligase Topors results in genetic instability and an increased rate of malignancy in mice." *BMC Mol Biol* 11: 31.
- Mears, A. J., Kondo, M. et al. (2001). "Nrl is required for rod photoreceptor development." *Nat Genet* 29(4): 447-452.
- Mehalow, A. K., Kameya, S. et al. (2003). "CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina." *Hum Mol Genet* 12(17): 2179-2189.
- Menotti-Raymond, M., David, V. A. et al. (2007). "Mutation in CEP290 discovered for cat model of human retinal degeneration." *J Hered* 98(3): 211-220.
- Menotti-Raymond, M., Deckman, K. H. et al. (2010). "Mutation discovered in a feline model of human congenital retinal blinding disease." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(6): 2852-2859.
- Modrek, B. and Lee, C. (2002). "A genomic view of alternative splicing." *Nat Genet* 30(1): 13-19.
- Mordes, D., Luo, X. et al. (2006). "Pre-mRNA splicing and retinitis pigmentosa." *Mol Vis* 12: 1259-1271.
- Morris, A. C., Forbes-Osborne, M. A. et al. (2011). "Microarray analysis of XOPS-mCFP zebrafish retina identifies genes associated with rod photoreceptor degeneration and regeneration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(5): 2255-2266.

## N

- Naash, M. I., Hollyfield, J. G. et al. (1993). "Simulation of human autosomal dominant retinitis pigmentosa in transgenic mice expressing a mutated murine opsin gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(12): 5499-5503.
- Nandrot, E. F. and Dufour, E. M. (2010). "Mertk in daily retinal phagocytosis: a history in the making." *Adv Exp Med Biol* 664: 133-140.
- Narfstrom, K., David, V. et al. (2009). "Retinal degeneration in the Abyssinian and Somali cat (rdAc): correlation between genotype and phenotype and rdAc allele frequency in two continents." *Vet Ophthalmol* 12(5): 285-291.

Neidhardt, J., Glaus, E. et al. (2007). "Identification and characterization of a novel RPGR isoform in human retina." *Hum Mutat* 28(8): 797-807.

Neidhardt, J., Glaus, E. et al. (2008). "Identification of novel mutations in X-linked retinitis pigmentosa families and implications for diagnostic testing." *Mol Vis* 14: 1081-1093.

Nelson, C. M., Gorsuch, R. A. et al. (2012). "Stat3 defines three populations of Muller glia and is required for initiating maximal muller glia proliferation in the regenerating zebrafish retina." *J Comp Neurol* 520(18): 4294-4311.

Nelson, C. M. and Hyde, D. R. (2012). "Muller glia as a source of neuronal progenitor cells to regenerate the damaged zebrafish retina." *Adv Exp Med Biol* 723: 425-430.

Nevet, M. J., Vekslin, S. et al. (2012). "Ceramide kinase-like (CERKL) interacts with neuronal calcium sensor proteins in the retina in a cation-dependent manner." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53(8): 4565-4574.

Nishimura, D. Y., Baye, L. M. et al. (2010). "Discovery and functional analysis of a retinitis pigmentosa gene, C2ORF71." *Am J Hum Genet* 86(5): 686-695.

## O

Ochocinska, M. J. and Hitchcock, P. F. (2009). "NeuroD regulates proliferation of photoreceptor progenitors in the retina of the zebrafish." *Mech Dev* 126(3-4): 128-141.

Oh, E. C., Cheng, H. et al. (2008). "Rod differentiation factor NRL activates the expression of nuclear receptor NR2E3 to suppress the development of cone photoreceptors." *Brain Res* 1236: 16-29.

Oh, E. C., Khan, N. et al. (2007). "Transformation of cone precursors to functional rod photoreceptors by bZIP transcription factor NRL." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(5): 1679-1684.

Okano, K., Maeda, A. et al. (2012). "Retinal cone and rod photoreceptor cells exhibit differential susceptibility to light-induced damage." *J Neurochem* 121(1): 146-156.

Olsson, J. E., Gordon, J. W. et al. (1992). "Transgenic mice with a rhodopsin mutation (Pro23His): a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa." *Neuron* 9(5): 815-830.

Omori, Y., Chaya, T. et al. (2010). "Negative regulation of ciliary length by ciliary male germ cell-associated kinase (Mak) is required for retinal photoreceptor survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(52): 22671-22676.

Otto, E. A., Loeys, B. et al. (2005). "Nephrocystin-5, a ciliary IQ domain protein, is mutated in Senior-Loken syndrome and interacts with RPGR and calmodulin." *Nat Genet* 37(3): 282-288.

## P

Pang, J. J., Chang, B. et al. (2005). "Retinal degeneration 12 (rd12): a new, spontaneously arising mouse model for human Leber congenital amaurosis (LCA)." *Mol Vis* 11: 152-162.

Parry, D. A., Toomes, C. et al. (2009). "Loss of the metalloprotease ADAM9 leads to cone-rod dystrophy in humans and retinal degeneration in mice." *Am J Hum Genet* 84(5): 683-691.

Payton, S. G., Haska, C. L. et al. (2007). "Effects of 5' untranslated region diversity on the posttranscriptional regulation of the human reduced folate carrier." *Biochim Biophys Acta* 1769(2): 131-138.

Petersen-Jones, S. M., Entz, D. D. et al. (1999). "cGMP phosphodiesterase-alpha mutation causes progressive retinal atrophy in the Cardigan Welsh corgi dog." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(8): 1637-1644.

## Bibliografia

- Pettus, B. J., Chalfant, C. E. et al. (2002). "Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives." *Biochim Biophys Acta* 1585(2-3): 114-125.
- Pickering, B. M. and Willis, A. E. (2005). "The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease." *Semin Cell Dev Biol* 16(1): 39-47.
- Pickrell, J. K., Pai, A. A. et al. (2010). "Noisy splicing drives mRNA isoform diversity in human cells." *PLoS Genet* 6(12): e1001236.
- Pitson, S. M., Moretti, P. A. et al. (2002). "The nucleotide-binding site of human sphingosine kinase 1." *J Biol Chem* 277(51): 49545-49553.
- Pittler, S. J. and Baehr, W. (1991). "Identification of a nonsense mutation in the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene of the rd mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(19): 8322-8326.
- Pomares, E., Marfany, G. et al. (2007). "Novel high-throughput SNP genotyping cosegregation analysis for genetic diagnosis of autosomal recessive retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis." *Hum Mutat* 28(5): 511-516.
- Prokisch, H., Hartig, M. et al. (2007). "A population-based epidemiological and genetic study of X-linked retinitis pigmentosa." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(9): 4012-4018.

## R

- Riboni, L., Giussani, P. et al. (2010). "Sphingolipid transport." *Adv Exp Med Biol* 688: 24-45.
- Rice, D. S., Huang, W. et al. (2004). "Severe retinal degeneration associated with disruption of semaphorin 4A." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(8): 2767-2777.
- Rio Frio, T., Wade, N. M. et al. (2008). "Premature termination codons in PRPF31 cause retinitis pigmentosa via haploinsufficiency due to nonsense-mediated mRNA decay." *J Clin Invest* 118(4): 1519-1531.
- Rivas, M. A. and Vecino, E. (2009). "Animal models and different therapies for treatment of retinitis pigmentosa." *Histol Histopathol* 24(10): 1295-1322.
- Robson, A. G., Saihan, Z. et al. (2006). "Functional characterisation and serial imaging of abnormal fundus autofluorescence in patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity." *Br J Ophthalmol* 90(4): 472-479.
- Rohrer, B., Goletz, P. et al. (2003). "Correlation of regenerable opsin with rod ERG signal in Rpe65<sup>-/-</sup> mice during development and aging." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(1): 310-315.
- Rovina, P., Jaritz, M. et al. (2006). "A critical beta6-beta7 loop in the pleckstrin homology domain of ceramide kinase." *Biochem J* 400(2): 255-265.
- Rovina, P., Schanzer, A. et al. (2009). "Subcellular localization of ceramide kinase and ceramide kinase-like protein requires interplay of their Pleckstrin Homology domain-containing N-terminal regions together with C-terminal domains." *Biochim Biophys Acta* 1791(10): 1023-1030.
- Rozet, J. M., Perrault, I. et al. (2002). "Dominant X linked retinitis pigmentosa is frequently accounted for by truncating mutations in exon ORF15 of the RPGR gene." *J Med Genet* 39(4): 284-285.

## S

- Saari, J. C., Nawrot, M. et al. (2001). "Visual cycle impairment in cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) knockout mice results in delayed dark adaptation." *Neuron* 29(3): 739-748.

- Saito, K., Chen, M. et al. (2009). "TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites." *Cell* 136(5): 891-902.
- Sakamoto, K., McCluskey, M. et al. (2009). "New mouse models for recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the *Pde6a* gene." *Hum Mol Genet* 18(1): 178-192.
- Salchow, D. J., Gouras, P. et al. (1999). "A point mutation (W70A) in the rod PDE-gamma gene desensitizing and delaying murine rod photoreceptors." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(13): 3262-3267.
- Samardzija, M., J. von Lintig, et al. (2008). "R91W mutation in *Rpe65* leads to milder early-onset retinal dystrophy due to the generation of low levels of 11-cis-retinal." *Hum Mol Genet* 17(2): 281-292.
- Sandberg, M. A., Weigel-DiFranco, C. et al. (1996). "The relationship between visual field size and electroretinogram amplitude in retinitis pigmentosa." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(8): 1693-1698.
- Sanyal, S., De Ruiter, A. et al. (1980). "Development and degeneration of retina in *rds* mutant mice: light microscopy." *J Comp Neurol* 194(1): 193-207.
- Sarra, G. M., Stephens, C. et al. (2001). "Gene replacement therapy in the retinal degeneration slow (*rds*) mouse: the effect on retinal degeneration following partial transduction of the retina." *Hum Mol Genet* 10(21): 2353-2361.
- Schafer, T., Putz, M. et al. (2008). "Genetic and physical interaction between the *NPHP5* and *NPHP6* gene products." *Hum Mol Genet* 17(23): 3655-3662.
- Schmidt, S. Y. and Aguirre, G. D. (1985). "Reductions in taurine secondary to photoreceptor loss in Irish setters with rod-cone dysplasia." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26(5): 679-683.
- Schwahn, U., Lenzner, S. et al. (1998). "Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2." *Nat Genet* 19(4): 327-332.
- Schwarz, N., Hardcastle, A. J. et al. (2012). "Arl3 and RP2 mediated assembly and traffic of membrane associated cilia proteins." *Vision Res* 75: 2-4.
- Seko, Y., Azuma, N. et al. (2012). "Derivation of human differential photoreceptor-like cells from the iris by defined combinations of *CRX*, *RX* and *NEUROD*." *PLoS One* 7(4): e35611.
- Semple-Rowland, S. L. and Lee, N. R. (2000). "Avian models of inherited retinal disease." *Methods Enzymol* 316: 526-536.
- Serfilippi, L. M., Pallman, D. R. et al. (2003). "Serum clinical chemistry and hematology reference values in outbred stocks of albino mice from three commonly used vendors and two inbred strains of albino mice." *Contemp Top Lab Anim Sci* 42(3): 46-52.
- Shah, G. N., Ulmasov, B. et al. (2005). "Carbonic anhydrase IV and XIV knockout mice: roles of the respective carbonic anhydrases in buffering the extracellular space in brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(46): 16771-16776.
- Shen, J., Yang, X. et al. (2005). "Oxidative damage is a potential cause of cone cell death in retinitis pigmentosa." *J Cell Physiol* 203(3): 457-464.
- Shen, Y. C. and Raymond, P. A. (2004). "Zebrafish cone-rod (*crx*) homeobox gene promotes retinogenesis." *Dev Biol* 269(1): 237-251.
- Shu, X., Zeng, Z. et al. (2011). "Knockdown of the zebrafish ortholog of the retinitis pigmentosa 2 (*RP2*) gene results in retinal degeneration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(6): 2960-2966.
- Shu, X., Zeng, Z. et al. (2010). "Zebrafish *Rpgr* is required for normal retinal development and plays a role in dynein-based retrograde transport processes." *Hum Mol Genet* 19(4): 657-670.
- Sidjanin, D. J., Lowe, J. K. et al. (2002). "Canine *CNGB3* mutations establish cone degeneration as orthologous to the human achromatopsia locus *ACHM3*." *Hum Mol Genet* 11(16): 1823-1833.

## Bibliografia

- Smith, A. J., Bainbridge, J. W. et al. (2009). "Prospects for retinal gene replacement therapy." *Trends Genet* 25(4): 156-165.
- Stalder, L. and Muhlemann, O. (2008). "The meaning of nonsense." *Trends Cell Biol* 18(7): 315-321.
- Stenkamp, D. L. (2011). "The rod photoreceptor lineage of teleost fish." *Prog Retin Eye Res* 30(6): 395-404.
- Stone, J., Maslim, J. et al. (1999). "Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina." *Prog Retin Eye Res* 18(6): 689-735.
- Strauss, O. (2005). "The retinal pigment epithelium in visual function." *Physiol Rev* 85(3): 845-881.
- Strauss, O., Stumpff, F. et al. (1998). "The Royal College of Surgeons rat: an animal model for inherited retinal degeneration with a still unknown genetic defect." *Acta Anat (Basel)* 162(2-3): 101-111.
- Sun, L., Bittner, M. A. et al. (2003). "Rim, a component of the presynaptic active zone and modulator of exocytosis, binds 14-3-3 through its N terminus." *J Biol Chem* 278(40): 38301-38309.
- Sung, C. H. and Chuang, J. Z. (2010). "The cell biology of vision." *J Cell Biol* 190(6): 953-963.
- Sung, C. H., Makino, C. et al. (1994). "A rhodopsin gene mutation responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa results in a protein that is defective in localization to the photoreceptor outer segment." *J Neurosci* 14(10): 5818-5833.

## T

- Tadenev, A. L., Kulaga, H. M. et al. (2011). "Loss of Bardet-Biedl syndrome protein-8 (BBS8) perturbs olfactory function, protein localization, and axon targeting." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(25): 10320-10325.
- Tanackovic, G., Ransijn, A. et al. (2011). "PRPF mutations are associated with generalized defects in spliceosome formation and pre-mRNA splicing in patients with retinitis pigmentosa." *Hum Mol Genet* 20(11): 2116-2130.
- Tanackovic, G. and Rivolta, C. (2009). "PRPF31 alternative splicing and expression in human retina." *Ophthalmic Genet* 30(2): 76-83.
- Tang, Z., Wang, Z. et al. (2009). "Novel compound heterozygous mutations in CERKL cause autosomal recessive retinitis pigmentosa in a nonconsanguineous Chinese family." *Arch Ophthalmol* 127(8): 1077-1078.
- Tao, W., Wen, R. et al. (2002). "Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(10): 3292-3298.
- Thompson, D. A., Khan, N. W. et al. (2012). "Rd9 is a naturally occurring mouse model of a common form of retinitis pigmentosa caused by mutations in RPGR-ORF15." *PLoS One* 7(5): e35865.
- Tobin, J. L., Di Franco, M. et al. (2008). "Inhibition of neural crest migration underlies craniofacial dysmorphology and Hirschsprung's disease in Bardet-Biedl syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(18): 6714-6719.
- Travis, G. H., Brennan, M. B. et al. (1989). "Identification of a photoreceptor-specific mRNA encoded by the gene responsible for retinal degeneration slow (rds)." *Nature* 338(6210): 70-73.
- Tsang, S. H., Gouras, P. et al. (1996). "Retinal degeneration in mice lacking the gamma subunit of the rod cGMP phosphodiesterase." *Science* 272(5264): 1026-1029.
- Tu, X. and Palczewski, K. (2012). "Crystal structure of the globular domain of C1QTNF5: Implications for late-onset retinal macular degeneration." *J Struct Biol* 180(3): 439-446.
- Tubb, B. E., Bardien-Kruger, S. et al. (2000). "Characterization of human retinal fascin gene (FSCN2) at 17q25: close physical linkage of fascin and cytoplasmic actin genes." *Genomics* 65(2): 146-156.

Tuson, M., Garanto, A. et al. (2009). "Overexpression of CERKL, a gene responsible for retinitis pigmentosa in humans, protects cells from apoptosis induced by oxidative stress." *Mol Vis* 15: 168-180.

Tuson, M., Marfany, G. et al. (2004). "Mutation of CERKL, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26)." *Am J Hum Genet* 74(1): 128-138.

## U

Ulshafer, R. J., Allen, C. et al. (1984). "Hereditary retinal degeneration in the Rhode Island Red chicken. I. Histology and ERG." *Exp Eye Res* 39(2): 125-135.

## V

Vajaranant, T. S., Seiple, W. et al. (2002). "Detection using the multifocal electroretinogram of mosaic retinal dysfunction in carriers of X-linked retinitis pigmentosa." *Ophthalmology* 109(3): 560-568.

van de Pavert, S. A., Kantardzhieva, A. et al. (2004). "Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure." *J Cell Sci* 117(Pt 18): 4169-4177.

van de Pavert, S. A., Meuleman, J. et al. (2007). "A single amino acid substitution (Cys249Trp) in Crb1 causes retinal degeneration and deregulates expression of pituitary tumor transforming gene Pttg1." *J Neurosci* 27(3): 564-573.

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

Veltel, S. and Wittinghofer, A. (2009). "RPGR and RP2: targets for the treatment of X-linked retinitis pigmentosa?" *Expert Opin Ther Targets* 13(10): 1239-1251.

Vervoort, R., Lennon, A. et al. (2000). "Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa." *Nat Genet* 25(4): 462-466.

Veske, A., Nilsson, S. E. et al. (1999). "Retinal dystrophy of Swedish briard/briard-beagle dogs is due to a 4-bp deletion in RPE65." *Genomics* 57(1): 57-61.

Vetter, I. R. and Wittinghofer, A. (2001). "The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions." *Science* 294(5545): 1299-1304.

## W

Wahl, M. C., Will, C. L. et al. (2009). "The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine." *Cell* 136(4): 701-718.

Wang, E. T., Sandberg, R. et al. (2008). "Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes." *Nature* 456(7221): 470-476.

Wang, J. S. and Kefalov, V. J. (2011). "The cone-specific visual cycle." *Prog Retin Eye Res* 30(2): 115-128.

Wang, Q. L., Chen, S. et al. (2004). "QRX, a novel homeobox gene, modulates photoreceptor gene expression." *Hum Mol Genet* 13(10): 1025-1040.

Webb, T. R., Parfitt, D. A. et al. (2012). "Deep intronic mutation in OFD1, identified by targeted genomic next-generation sequencing, causes a severe form of X-linked retinitis pigmentosa (RP23)." *Hum Mol Genet* 21(16): 3647-3654.

## Bibliografia

Webber, A. L., Hodor, P. et al. (2008). "Dual role of Nr2e3 in photoreceptor development and maintenance." *Exp Eye Res* 87(1): 35-48.

Weng, J., Mata, N. L. et al. (1999). "Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice." *Cell* 98(1): 13-23.

Weskamp, G., Cai, H. et al. (2002). "Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life." *Mol Cell Biol* 22(5): 1537-1544.

Won, J., Gifford, E. et al. (2009). "RPGRIP1 is essential for normal rod photoreceptor outer segment elaboration and morphogenesis." *Hum Mol Genet* 18(22): 4329-4339.

Wright, A. F., Chakarova, C. F. et al. (2010). "Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait." *Nat Rev Genet* 11(4): 273-284.

Wycisk, K. A., Budde, B. et al. (2006). "Structural and functional abnormalities of retinal ribbon synapses due to *Cacna2d4* mutation." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(8): 3523-3530.

## X

Xu, J., Dodd, R. L. et al. (1997). "Prolonged photoresponses in transgenic mouse rods lacking arrestin." *Nature* 389(6650): 505-509.

## Y

Yang, R. B., Robinson, S. W. et al. (1999). "Disruption of a retinal guanylyl cyclase gene leads to cone-specific dystrophy and paradoxical rod behavior." *J Neurosci* 19(14): 5889-5897.

Yang, Z., Chen, Y. et al. (2008). "Mutant prominin 1 found in patients with macular degeneration disrupts photoreceptor disk morphogenesis in mice." *J Clin Invest* 118(8): 2908-2916.

Yau, K. W. and Hardie, R. C. (2009). "Phototransduction motifs and variations." *Cell* 139(2): 246-264.

Yokokura, S., Wada, Y. et al. (2005). "Targeted disruption of *FSCN2* gene induces retinopathy in mice." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(8): 2905-2915.

## Z

Zacchigna, S., Oh, H. et al. (2009). "Loss of the cholesterol-binding protein prominin-1/CD133 causes disk dysmorphogenesis and photoreceptor degeneration." *J Neurosci* 29(7): 2297-2308.

Zeiss, C. J., Acland, G. M. et al. (1999). "Retinal pathology of canine X-linked progressive retinal atrophy, the locus homologue of RP3." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(13): 3292-3304.

Zhang, Q., Acland, G. M. et al. (2002). "Different RPGR exon ORF15 mutations in Canids provide insights into photoreceptor cell degeneration." *Hum Mol Genet* 11(9): 993-1003.

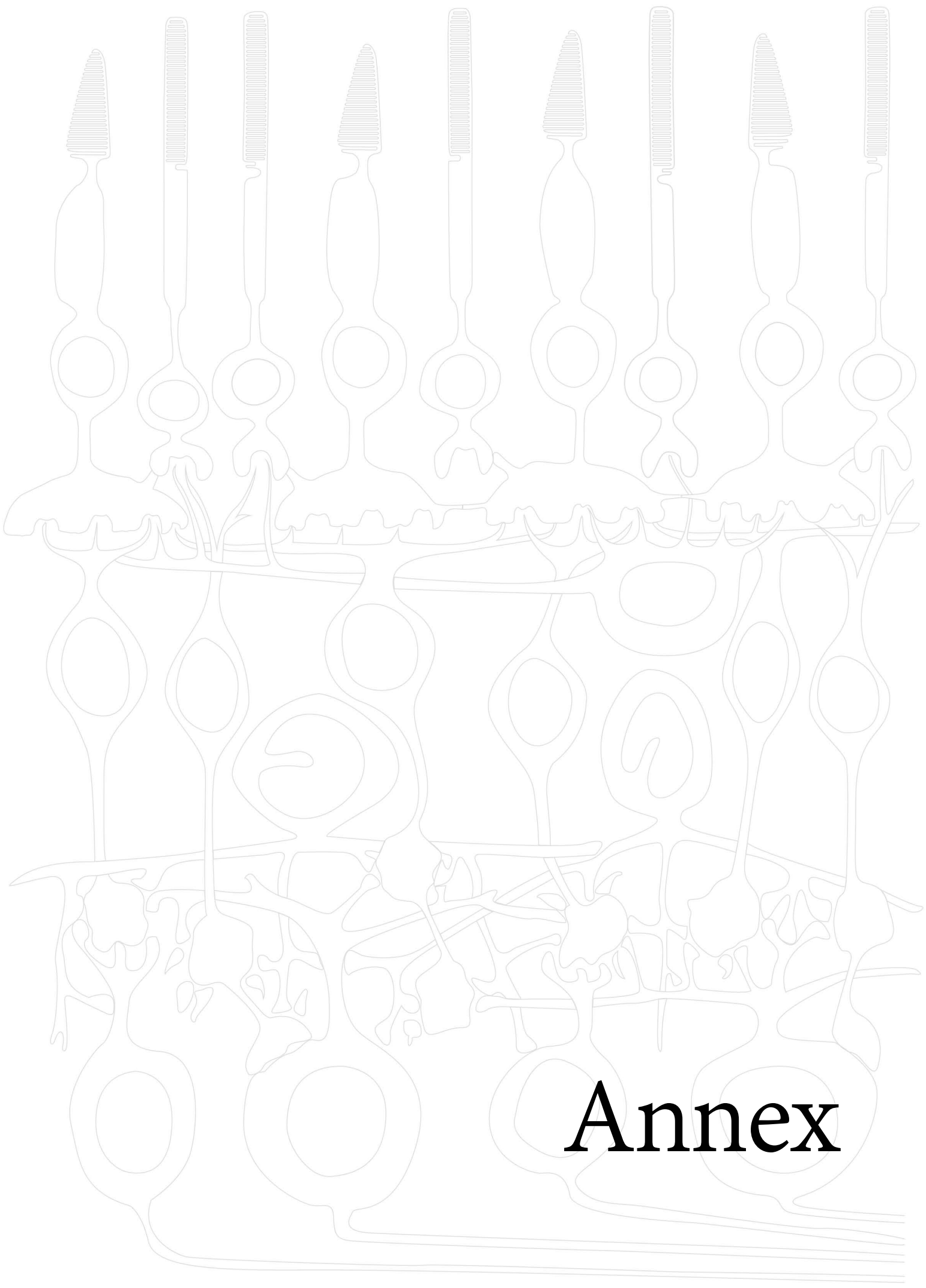
Zhao, C., Bellur, D. L. et al. (2009). "Autosomal-dominant retinitis pigmentosa caused by a mutation in *SNRNP200*, a gene required for unwinding of U4/U6 snRNAs." *Am J Hum Genet* 85(5): 617-627.

Zhao, Y., Hong, D. H. et al. (2003). "The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)- interacting protein: subserving RPGR function and participating in disk morphogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7): 3965-3970.

Zito, I., Downes, S. M. et al. (2003). "RPGR mutation associated with retinitis pigmentosa, impaired hearing, and sinorespiratory infections." *J Med Genet* 40(8): 609-615.

Zuchner, S., Dallman, J. et al. (2012). "Whole-exome sequencing links a variant in *DHDDS* to retinitis pigmentosa." *Am J Hum Genet* 88(2): 201-206.





# Annex



## ANNEX 1

### ESTUDIS DE LA LOCALITZACIÓ CEL·LULAR DE CERKL

Figura 33

Figura 34

Figura 35



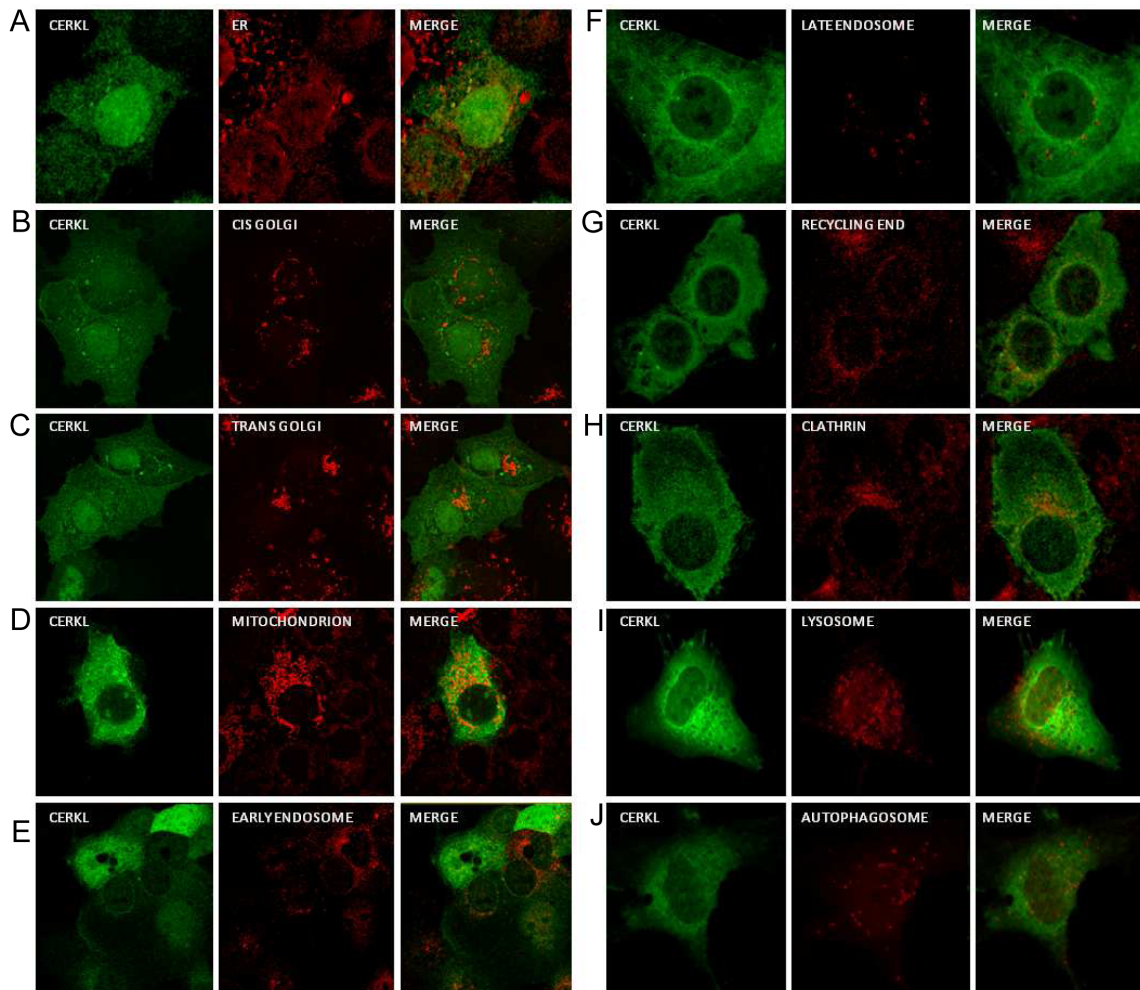


Figura 33. Estudis de colocalització de CERKL amb marcadors de diversos orgànuls cel·lulars, en cèl·lules COS7 i HeLa transfectades amb la isoforma 1 fusionada a HA o GFP. (A) CERKL colocalitza parcialment amb el reticle endoplasmàtic, marcat amb calnexina; mentre queda exclosa de (B i C) cis i trans-Golgi (detectats amb GM130 i TGN48, respectivament), (D) de mitocondris (Mitotracker), (E-G) d'endosomes primerencs, tardans i de reciclatge (EEA1, LBPA i Rab11a, respectivament), (H) de vesícules de clatrina (detectades amb un anticòs anti-clatrina), (I) de lisosomes (LAMP1), i (J) d'autofagosomes (LC3).

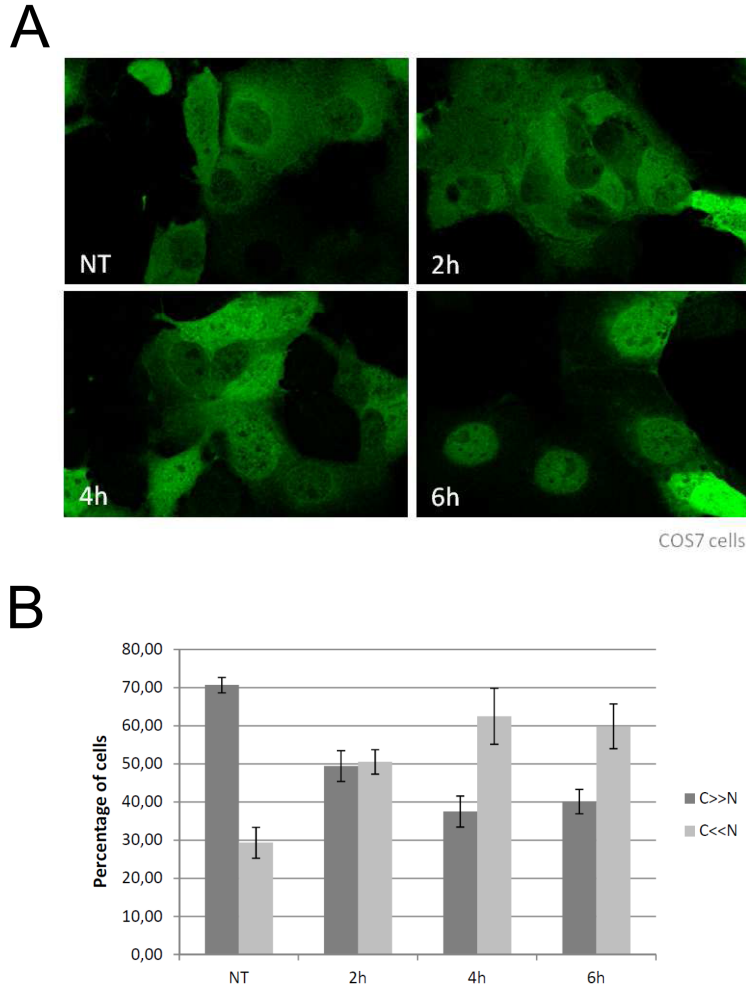


Figura 34. Els estudis del transport nucli-citoplasma de CERKL revelen que l'exportina CRM1 regula la sortida del nucli de CERKL. (A) La construcció CERKL-HA va ser transfectada en cèl·lules COS7 no tractades (NT) o tractades durant 2, 4 o 6 h amb leptomicina B (40 nM). Després de 6 h, la majoria de la proteïna quedava retinguda a nucli. (B) La localització de CERKL va ser avaluada en un mínim de 100 cèl·lules transfectades en cadascun del tres replicats de cada condició, que van ser categoritzades en dos grups segons la localització de CERKL: majoritàriament localitzada a citoplasma (C>>N) o a nucli (N>>C).

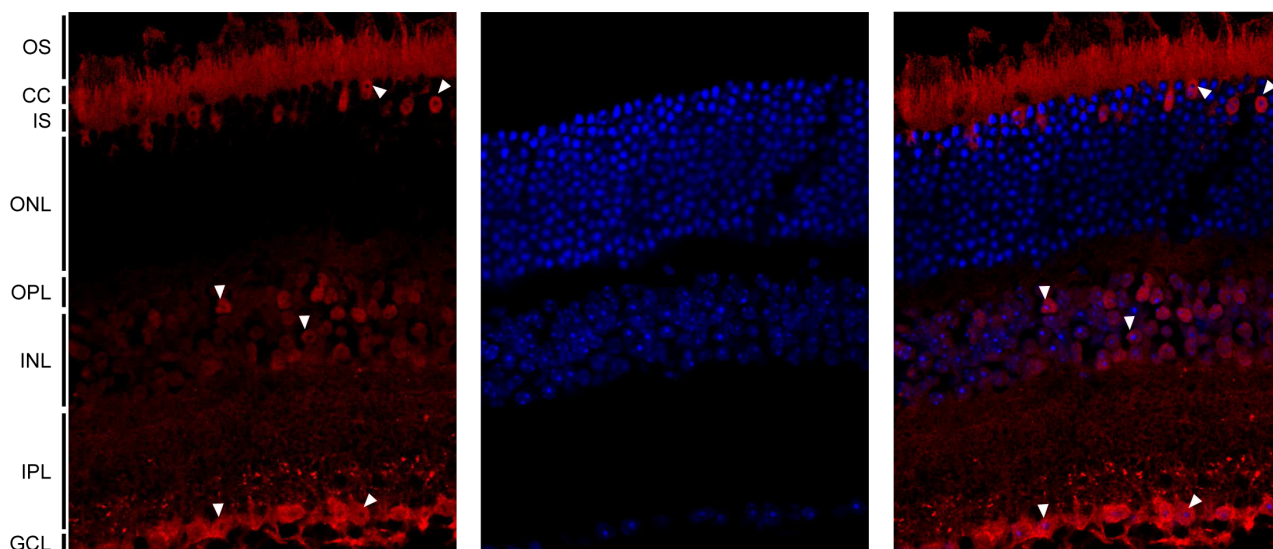


Figura 35. Estudis de localització de CERKL en retines de ratolí. La proteïna localitza principalment a nivell de les cèl·lules ganglionars (GCL) i en alguns somes de la capa nuclear interna (INL) i externa (ONL). També localitza al segment intern (IS) i extern (OS) dels fotoreceptors. El patró de localització és totalment depenent de tipus cel·lular: mentre a la GCL CERKL localitza tant a nucli com a citoplasma, a la INL només ho fa a nucli. En els dos casos s'observa una clara exclusió dels nuclèols (triangles). A nivell de l'ONL, en canvi, CERKL no localitza a nucli, però sí es va detectar un fort marcatge perinuclear (triangles).



## ANNEX 2

### PUBLICACIÓ 5

*Comprehensive SNP-chip for retinitis pigmentosa-Leber congenital amaurosis diagnosis:  
new mutations and detection of mutational founder effects.*



## ARTICLE

# Comprehensive SNP-chip for retinitis pigmentosa-Leber congenital amaurosis diagnosis: new mutations and detection of mutational founder effects

Esther Pomares<sup>1,2,3</sup>, Marina Riera<sup>1,2,3</sup>, Jon Permanyer<sup>1,2,3</sup>, Pilar Méndez<sup>1,2,3</sup>, Joaquín Castro-Navarro<sup>4</sup>, Ángeles Andrés-Gutiérrez<sup>5</sup>, Gemma Marfany<sup>1,2,3</sup>, Roser González-Duarte<sup>\*1,2,3</sup>

Fast and efficient high-throughput techniques are essential for the molecular diagnosis of highly heterogeneous hereditary diseases, such as retinitis pigmentosa (RP). We had previously approached RP genetic testing by devising a chip based on co-segregation analysis for the autosomal recessive forms. In this study, we aimed to design a diagnostic tool for all the known genes (40 up to now) responsible for the autosomal dominant and recessive RP and Leber congenital amaurosis (LCA). This new chip analyzes 240 single nucleotide polymorphisms (SNPs) (6 per gene) on a high-throughput genotyping platform (SNPlex, Applied Biosystems), and genetic diagnosis is based on the co-segregation analysis of SNP haplotypes in independent families. In a single genotyping step, the number of RP candidates to be screened for mutations is considerably reduced, and in the most informative families, all the candidates are ruled out at once. In a panel of RP Spanish pedigrees, the disease chip became a crucial tool for selecting those suitable for genome-wide RP gene search, and saved the burdensome direct mutational screening of every known RP gene. In a large adRP family, the chip allowed ruling out of all but the causative gene, and identification of an unreported null mutation (E181X) in *PRPF31*. Finally, on the basis of the conservation of the SNP haplotype linked to this pathogenic variant, we propose that the E181X mutation spread through a cohort of geographically isolated families by a founder effect.

*European Journal of Human Genetics* (2010) 18, 118–124; doi:10.1038/ejhg.2009.114; published online 8 July 2009

**Keywords:** co-segregation; SNP genotyping; RP; LCA; mutation; founder effect

## INTRODUCTION

Retinitis pigmentosa (RP), the most common form of inherited retinal dystrophies (prevalence 1:3500 individuals), shows extremely high clinical and genetic heterogeneity.<sup>1,2</sup> To date, more than 35 genes have been associated with this disease, which follows all patterns of Mendelian inheritance: autosomal dominant – adRP, autosomal recessive – arRP, and X-linked – XLRP (Retnet, <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>). Although the number of RP causative genes is continuously expanding, more than 40% of the cases remain unassigned. Direct mutational screening of all known RP genes involves the analysis of more than 500 exons and/or sequencing at least 120 kb, which is too burdensome in time and cost for most laboratories. Hence, high-throughput techniques are now being used to deal with the genetic diagnosis of heterogeneous diseases. Some commercial disease chips for retinal dystrophies (Asper Ophthalmics, Tartu, Estonia) screen for nearly all reported mutations in a cost-effective manner, although for RP, only 35% of the cases are finally diagnosed. In a previous study, we developed a novel strategy for arRP genetic diagnosis, which merged co-segregation analysis and high-throughput single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping. This analysis allowed us to efficiently exclude non-causative RP genes

(82–88%), thereby diminishing greatly the number of candidates to be sequenced per family.<sup>3</sup>

Autosomal dominant RP accounts for 20–40% of all RP cases. Eighteen causative genes (*CA4*, *CRX*, *FSCN2*, *GUCA1B*, *IMPDH1*, *NRL*, *NR2E3*, *PRPF3*, *PRPF8*, *PRPF31*, *RDH12*, *RDS*, *RHO*, *ROM1*, *RPI*, *RP9*, *SEMA4A*, *TOPORS*) have been identified so far and thus, the molecular diagnosis of adRP is also challenging. Indeed, the boundaries between genes causing dominant and recessive forms are no longer meaningful, given the increasing number of cases where the same gene explains both types of inheritance, as is the case for *RHO* or *NRL*, which were first assigned as adRP.<sup>4–8</sup> The need to build a comprehensive disease chip for the autosomal RP forms also applies to the closest retinal dystrophy, Leber congenital amaurosis (LCA), which shares more than half the causative genes (seven out of thirteen) with RP (the shared genes are *CRB1*, *CRX*, *IMPDH1*, *LRAT*, *RDH12*, *RPE65*, *TULP1*).

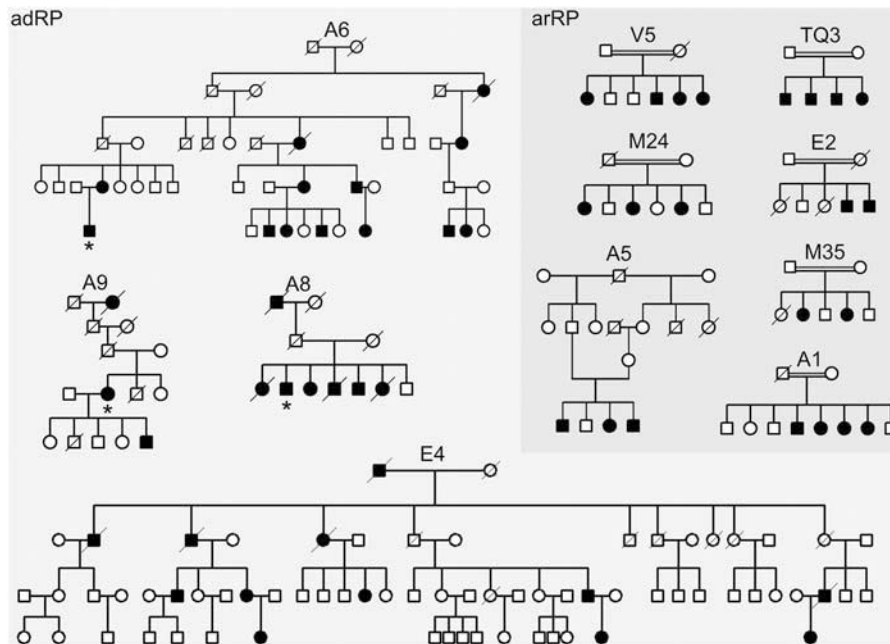
Apart from genetic diagnosis, one of the key unsolved issues in RP research is to elucidate the molecular basis of the pathology as a means to design effective therapies and, to this end, the identification of novel genes is crucial. Before undertaking a genome-wide search for new causative genes, all the RP and LCA candidates have to be ruled out,

<sup>1</sup>Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>IBUB (Institut de Biomedicina), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>CIBERER, Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Servicio de Oftalmología, Unidad de Retina, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain; <sup>5</sup>Neurofisiología Clínica, Hospital San Agustín, Avilés, Spain

\*Correspondence: Professor R González-Duarte, Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal 645, Barcelona, E08028, Spain.

Tel: +34 934021034; FAX: +34 934034420; E-mail: rgonzalez@ub.edu

Received 19 February 2009; revised 22 May 2009; accepted 4 June 2009; published online 8 July 2009



**Figure 1** Structure of the Spanish adRP and arRP pedigrees analyzed in this study. Seven arRP families (background in dark gray) and four adRP (background in light gray) were genotyped using the combined RP-LCA chip. Asterisks in pedigrees A6, A8 and A9 indicate probands shown in Figure 6.

and at present, indirect genetic analysis is the most suitable way to achieve this goal.

In this study, we aimed to extend the range of the chip previously designed, which now carries out a comprehensive molecular analysis of all the genes causing autosomal forms of RP and LCA.

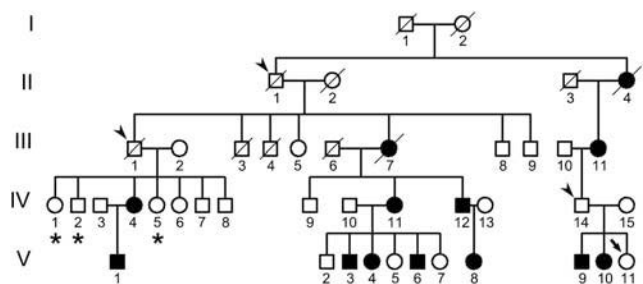
## MATERIALS AND METHODS

### DNA from patients and families

Four adRP and seven arRP families (Figure 1) were analyzed using the RP-LCA SNP-co-segregation chip. Previous clinical examination categorized the patients as suffering from RP. Informed consent from all the family members was obtained, following the tenets of the Declaration of Helsinki. All the study concerning patient recruitment and sample collection had been approved by the Bioethics Committee of the University of Barcelona (Barcelona, Spain). DNA was obtained from blood samples using the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA). DNA from 104 matched Spanish control individuals was obtained from whole blood using the method stated above.

### Clinical examination

A large Spanish pedigree (A6) compatible with autosomal dominant RP (Figure 2) with incomplete penetrance was clinically evaluated. All affected members were diagnosed with RP after ophthalmological examination at the Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, Spain). The clinical diagnosis included best-corrected visual acuity and slit lamp biomicroscopy, followed by indirect ophthalmoscopy and fundus photography after pupillary dilatation. The size and the extent of the visual-field defects were assessed with Humphrey static perimetry. Ganzfeld full-field electroretinography was performed and the electrodes were applied to the conjunctiva, following the recommendations of the IFCN committee.<sup>9</sup> The scotopic electroretinogram (ERG) was recorded after the patient had adapted to 20 min of darkness, using a single-flash dim blue light (1 metre-candle-second) and a single-flash white light (2 metre-candle-second). The photopic ERG was recorded after 10 min adaptation to light (25 metre-candle) followed by a standard flash of 2 metre-candle-second. All ERGs were recorded in accordance with the protocol of the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision at the Hospital San Agustín (Avilés, Spain).



**Figure 2** Enlarged adRP pedigree A6 showing incomplete penetrance. Obligate incomplete penetrants are marked with an arrowhead. Asymptomatic incomplete penetrants revealed by the genetic analysis are indicated with an asterisk. Previously undiagnosed female V.11 (arrow) showed early symptoms of RP in a diagnostic clinical reappraisal after the genetic testing.

### SNP selection

The previous autosomal recessive RP-LCA chip analyzed four SNPs for 22 arRP-arLCA genes.<sup>3</sup> Now, the chip has been enlarged with two SNPs per gene to increase the informativity. To generate a comprehensive RP-LCA chip for the two types of autosomal forms, markers for the 14 known adRP-adLCA genes (*CA4*, *FSCN2*, *GUCA1B*, *IMPDH1*, *NRL*, *PRPF3*, *PRPF8*, *PRPF31*, *RDS*, *ROM1*, *RP1*, *RP9*, *SEMA4A*, *TOPORS*) were added, as well as for the arRP-arLCA genes, *CEP290*, *LCA5*, *PRCD* and *RD3*, all identified after the first arRP chip was designed. The six SNPs per gene were selected prioritizing the following criteria: (i) high informativity according to SNPbrowser (2007) and dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>); (ii) position physically close to the gene, and if possible, located in the promoter, intragenic and downstream regions; (iii) that they belonged to different haplotypic blocks. The selected markers are listed in Table 1.

### SNP genotyping using a high-throughput platform and haplotype analyses

Sample DNA was diluted to 20 ng/ $\mu$ l and a total of 1  $\mu$ g per sample was arrayed in 96-well plates. SNPs were genotyped with the SNPlex (Applied Biosystems, Inc.,

**Table 1** SNPs of the genes added to the comprehensive RP-LCA chip<sup>a</sup>

Gene <sup>b</sup>	SNP	Alleles	MAF	Gene <sup>b</sup>	SNP	Alleles	MAF	Gene <sup>b</sup>	SNP	Alleles	MAF
CA4	rs180519	G>A	0.451	RDS	rs2038261	A>G	0.375	CEP290	rs2468243	T>A	0.483
CA4	rs3744375	A>G	0.442	RDS	rs373341	T>C	0.475	CEP290	rs2471503	C>T	0.385
CA4	rs8075789	C>T	0.235	RDS	rs9471904	C>T	0.491	CEP290	rs2471534	T>C	0.400
CA4	rs345182	A>G	0.210	RDS	rs3846893	T>C	0.402	CEP290	rs12318967	A>G	0.300
CA4	rs8079220	C>T	0.214	RDS	rs9381218	T>C	0.447	CEP290	rs12316831	A>G	0.363
CA4	rs12162165	C>T	0.235	RDS	rs2894478	G>A	0.397	CEP290	rs2216153	A>G	0.267
FSCN2	rs1984641	C>T	0.428	ROM1	rs2849030	A>G	0.327	LCA5	rs1485376	A>G	0.473
FSCN2	rs7342974	T>C	0.350	ROM1	rs2516633	C>A	0.274	LCA5	rs2655668	T>C	0.394
FSCN2	rs6565588	G>A	0.319	ROM1	rs11231168	C>T	0.438	LCA5	rs9352745	A>C	0.274
FSCN2	rs7224579	A>G	0.325	ROM1	rs2956993	T>G	0.372	LCA5	rs2803204	C>T	0.302
FSCN2	rs4076819	G>C	0.432	ROM1	rs597259	A>T	0.267	LCA5	rs2655688	C>G	0.425
FSCN2	rs7222241	C>G	0.389	ROM1	rs2850597	G>A	0.284	LCA5	rs9448745	A>T	0.391
GUCA1B	rs2236046	A>G	0.389	RP9	rs12113707	G>A	0.371	NRL	rs1157625	A>G	0.283
GUCA1B	rs2281462	G>A	0.478	RP9	rs17472290	A>G	0.473	NRL	rs10146843	C>G	0.414
GUCA1B	rs12199321	G>C	0.383	RP9	rs6980186	G>A	0.467	NRL	rs743271	A>G	0.283
GUCA1B	rs2395803	C>A	0.325	RP9	rs4720102	T>C	0.469	NRL	rs3561	T>C	0.292
GUCA1B	rs3749921	G>A	0.341	RP9	rs3847009	A>G	0.456	NRL	rs2071586	G>C	0.216
GUCA1B	rs7755400	A>G	0.372	RP9	rs1548880	G>A	0.462	NRL	rs2277483	A>G	0.265
IMPDH1	rs359650	C>T	0.301	SEMA4A	rs4661033	C>T	0.336	PRCD	rs4315367	T>A	0.416
IMPDH1	rs359652	A>G	0.496	SEMA4A	rs12128066	T>C	0.394	PRCD	rs4647879	G>A	0.283
IMPDH1	rs2278294	C>T	0.323	SEMA4A	rs1984508	G>A	0.403	PRCD	rs4648343	G>C	0.397
IMPDH1	rs11770116	C>T	0.363	SEMA4A	rs3738581	C>T	0.398	PRCD	rs2120886	G>A	0.451
IMPDH1	rs4731451	A>G	0.392	SEMA4A	rs2072499	A>G	0.323	PRCD	rs2590260	T>C	0.412
IMPDH1	rs11765126	A>G	0.305	SEMA4A	rs2758605	G>C	0.367	PRCD	rs717571	G>T	0.482
PRPF3	rs2274127	G>T	0.483	TOPORS	rs626214	A>C	0.496	RD3	rs784379	A>G	0.412
PRPF3	rs7512552	C>T	0.442	TOPORS	rs12348918	A>G	0.265	RD3	rs1055565	G>A	0.389
PRPF3	rs11205357	C>T	0.384	TOPORS	rs7855693	A>C	0.407	RD3	rs10449313	T>C	0.375
PRPF3	rs1498308	G>T	0.376	TOPORS	rs593700	T>A	0.392	RD3	rs11119750	G>A	0.483
PRPF3	rs1625468	G>A	0.381	TOPORS	rs629566	T>C	0.261	RD3	rs10863904	T>C	0.460
PRPF3	rs696616	G>A	0.376	TOPORS	rs3739674	C>G	0.350	RD3	rs784838	T>G	0.347
PRPF8	rs4790232	G>T	0.376					RDH12	rs2295644	T>A	0.386
PRPF8	rs4790712	A>G	0.379					RDH12	rs8012815	C>T	0.239
PRPF8	rs2272011	A>G	0.447					RDH12	rs2057119	A>G	0.317
PRPF8	rs11078563	C>T	0.212					RDH12	rs718212	T>C	0.376
PRPF8	rs8065368	C>A	0.367					RDH12	rs1044126	T>C	0.250
PRPF8	rs4790814	G>A	0.491					RDH12	rs1015023	T>C	0.434
PRPF31	rs10500316	C>T	0.486					RP1	rs9643828	T>C	0.301
PRPF31	rs11669029	A>G	0.469					RP1	rs429668	T>C	0.243
PRPF31	rs254264	G>C	0.491					RP1	rs2293869	A>T	0.450
PRPF31	rs254271	G>C	0.366					RP1	rs423841	A>G	0.310
PRPF31	rs10853869	G>A	0.290					RP1	rs446222	A>G	0.308
PRPF31	rs36633	T>C	0.420					RP1	rs9774102	C>T	0.451

<sup>a</sup>The first two gene columns show the adRP-adLCA genes, whereas the third one lists the new reported genes causing arRP-arLCA, not included in the first chip.

<sup>b</sup>List of gene symbols: CA4 – carbonic anhydrase IV; FSCN2 – fascin 2; GUCA1B – guanylate cyclase activator 1B; IMPDH1 – inosine-5-prime-monophosphate dehydrogenase type I; PRPF3 – precursor mRNA-processing factor 3; PRPF8 – precursor mRNA-processing factor 8; PRPF31 – precursor mRNA-processing factor 31; RDS – retinal degeneration slow or peripherin 2; ROM1 – rod outer segment protein 1; RP9 – retinitis pigmentosa 9; SEMA4A – semaphorin 4A; TOPORS – topoisomerase I-binding arginine/serine-rich protein; CEP290 – centrosomal protein 290 kDa; LCA5 – Leber congenital amaurosis 5; NRL – neural retina leucine zipper; PRCD – progressive rod cone degeneration; RD3 – retinal degeneration 3; RDH12 – retinol dehydrogenase 12; RP1 – retinitis pigmentosa 1.

Carlsbad, CA, USA) platform, following the instructions, protocol and software provided by the manufacturers. The platform generated raw data genotypes, which were then assigned to each individual. Haplotype and co-segregation analyses were carried out by hand.

#### Mutational screening of non-excluded genes

All the exons and exon–intron boundaries of non-excluded genes were subsequently directly screened for mutations. Genomic DNA of patients was amplified and sequenced with the BigDye v3.1 kit (Applied Biosystems, Inc.) in the ABI PRISM 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems, Inc.) and compared with the wild-type gene sequence.

#### Reverse transcriptase–PCR analysis of PRPF31 expression

Total RNA from patients and carriers, IV.1, IV.2, IV.4, IV.5, IV.9, IV.11, of the A6 family were obtained after processing frozen white cells pelleted from 600 µl of blood, using the RiboPure-Blood purification kit (Ambion, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and following the manufacturer's instructions. First, cDNA chains were obtained by reverse transcription with the Cells-to-cDNA kit (Ambion) with MMLV reverse transcriptase, using 0.62 µM oligo d(T) and 1.25 µM random decamers for 15 min at 37°C plus 15 min at 39°C, and finally for 45 min at 42°C. Amplification of transcripts from PRPF31 and GAPDH (used as control) was achieved using specific primers from different exons. The PCR was carried out in a final volume of 25 µl, using the GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) under three different sets of conditions. For

amplification of *GAPDH*, a two-step PCR was carried out as follows: first denaturation for 2 min at 94°C, followed by 35 cycles of 20 s at 94°C and 2 min at 63°C. For amplification of *PRPF31*, a three-step PCR was carried out: first denaturation for 2 min at 94°C, followed by 35 cycles of 20 s at 94°C, 30 s at 58°C and 25 s at 72°C. Longer cycles (up to 40) were carried out to detect transcripts in patients, who were heterozygotes for a null allele. The reverse transcriptase (RT)-PCR products were resolved by electrophoresis and a semiquantitative analysis was carried out using the Quantity One 4.5 software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The values were normalized against *GAPDH* levels and represented considering the wild-type ratio *PRPF31/GAPDH* as 100%.

## RESULTS

### Genotyping of autosomal dominant retinitis pigmentosa families

Four adRP families were analyzed by the combined RP-LCA co-segregation chip. The original chip consisted of 88 SNPs (4 SNPs for a total of 22 arRP-arLCA genes), but considering that dominant pedigrees need more genetic information for co-segregation analysis, the number of SNPs genotyped per gene was increased to six. Thus, the current chip contains 240 SNP markers covering the 40 autosomal RP/LCA genes reported at the beginning of this study.

Two of the adRP families had a large number of affected and non-affected members available for analysis (families A6 and E4, Figure 1), whereas the size of the other two was much smaller (families A8 and A9, Figure 1), with merely 2–3 affected live members. Incomplete penetrance is relatively frequent in dominantly inherited disorders, such as adRP,<sup>10,11</sup> and thus, it was also taken into account while carrying out the co-segregation analysis. Also in our families there were some obligate carriers, who were non-penetrant but had affected progeny. Our criterion was that all affected individuals should share one haplotype that could be present in some non-affected family members.

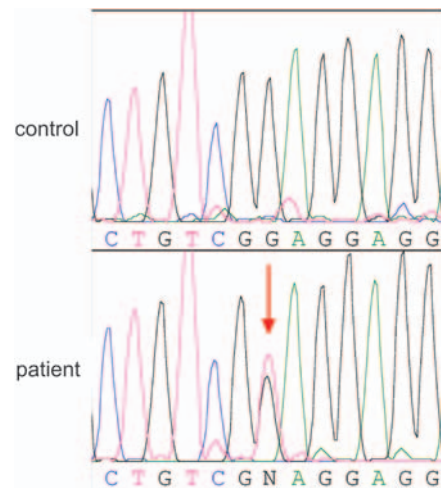
Overall, the efficiency of this high-throughput analysis was much higher in the two large families, as we ruled out all genes but one (maximum informativity) in family A6, and only 4 genes out of 40 (90% efficiency) remained as candidates in family E4. Even in the two small families, which were less informative because of the scarce number of meioses available, half the RP-LCA candidate genes were ruled out.

### Mutational screening of the remaining candidates in the adRP families

Subsequent to the chip analysis, we aimed to identify the pathogenic mutation in those adRP families where the number of remaining candidates was manageable (<5). Thus, families A8 and A9 were not further pursued at this stage. In the two larger pedigrees, all the genes were ruled out but one in family A6 or four in family E4. In the latter, these four genes were directly sequenced but no pathogenic mutation was detected, and thus, this pedigree is now being considered for RP gene search.

Remarkably, for family A6 (Figure 2), the sequence of the single candidate left, *PRPF31*, revealed a new nonsense mutation, a G>T transversion (c.541 G>T) (Figure 3). This pedigree showed three asymptomatic obligate carriers (indicated with arrowheads in Figure 2), as they had several affected descendants. After haplotype analysis, four additional incomplete penetrants were identified (shown by asterisks and one arrow, Figure 2), who were later confirmed by sequence. These results prompted us to request a second clinical assessment. It must be noted that individual V.11 (aged 19), who had been previously categorized as normal was diagnosed with early symptoms of RP (arrow, Figure 2).

This new mutation, c.541 G>T, introduces a nonsense codon (E181X). It has been shown that transcripts containing premature

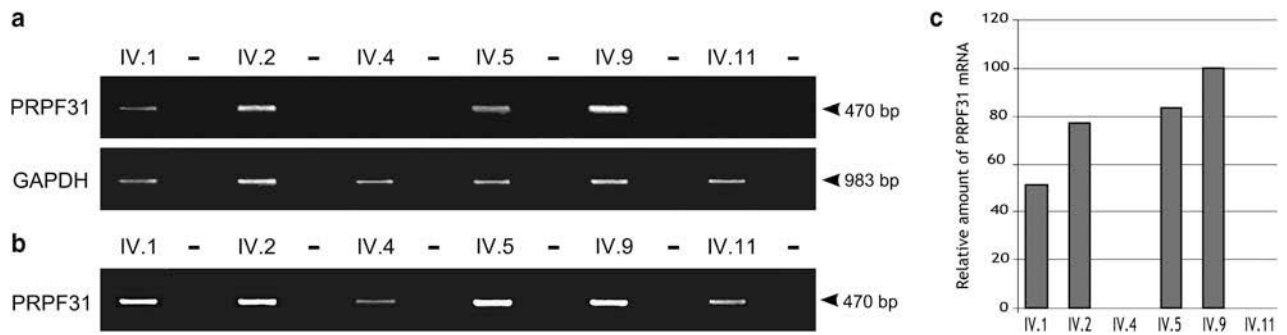


**Figure 3** Identification of the c.541 G>T mutation. *PRPF31* exon 6 sequence from a control and patient V.10, showing heterozygosity in position c.541(G>T).

termination codons are detected by the mRNA quality control system and eliminated before translation by non-sense mediated decay (NMD).<sup>12,13</sup> To assess whether the E181X mutation resulted in reduced levels of *PRPF31* transcripts, we carried out a semi-quantitative RT-PCR analysis of *PRPF31* expression in blood white cells from a non-carrier sibling (IV.9), two full penetrants (IV.4 and IV.11) and three incomplete penetrants (IV.1, IV.2 and IV.5) (Figure 4a). Incomplete penetrants produced lower *PRPF31* transcript levels than the non-carrier. Even more relevant to pathogenicity, the *PRPF31* expression in full penetrants (patients) was not detected under standard RT-PCR conditions (35 cycles), but could be observed in the two patients (IV.4 and IV.11) after extending the number of PCR cycles up to 45 (Figure 4b). The relative quantitative analysis of the normalized *PRPF31* mRNA expression in leukocytes after 35 cycles showed that non-penetrant heterozygotes *PRPF31* levels were 51–84% of the control, in contrast to full penetrants in which *PRPF31* was undetectable (Figure 4c). Taken together, our results indicate that the E181X mutation is the cause of the disorder in this family, in agreement with previous reports showing that dominant inheritance of *PRPF31* mutations is mainly due to haploinsufficiency.<sup>13,14</sup>

### Clinical assessment and findings of the A6 family

Our results highlighted several members of the family who were carriers of the E181X mutation but who had not been clinically assessed. Our genetic testing prompted a diagnostic reappraisal of the incomplete penetrants. Individuals IV.1, IV.5, IV.14 and V.11 volunteered and their phenotype were compared with that of patient V.10 (Table 2). As observed in Figure 5, patient V.10 showed conventional RP features, such as, severe night blindness, decreased visual acuity and loss of mid-peripheral visual field. In contrast, individuals IV.1, IV.5 and IV.14 presented normal ERGs and eye fundi, and hence were categorized as incomplete penetrants (Table 2 and Figures 5a–d). The loss of visual acuity in individual IV.5 was due to cataracts (Table 2), but the retina was unaffected (Figure 5b). Remarkably, the clinical evaluation of the individual V.11, who had not been previously diagnosed with RP, revealed some of the early RP traits: mild Retinal Pigmented Epithelium (RPE) atrophy in the peripheral and nasal retina, and vascular attenuation (Figure 5e). In addition, this patient



**Figure 4** *PRPF31* RT-PCR analysis in blood of incomplete penetrants, full penetrants and a control sibling of the A6 family. (a) Incomplete penetrants IV.1, IV.2 and IV.5 showed lower, although detectable levels of *PRPF31* transcripts compared with a healthy sibling (IV.9). In contrast, *PRPF31* expression was non-detected in patients IV.4 and IV.11 under standard RT-PCR conditions (35 cycles). *GAPDH* was used as control for normalization. (b) *PRPF31* expression in patients was observed only when the number of PCR cycles was extended (up to 45). (c) Semiquantitative analysis of *PRPF31* levels (at 35 cycles) using *GAPDH* expression for normalization, and considering the *PRPF31* levels of the wild-type control (IV.9) as 100%.

**Table 2** Clinical characteristics of three incomplete penetrants (IV.1, IV.5, IV.14), one patient (V.10) and one young carrier who showed early RP symptoms (V.11) (pedigree A6, numeration according to Figure 2)

Individual	Age <sup>a</sup> (year)	RP symptoms	Age of onset	Progression	Visual acuity (OD/OS)	Refraction (OD/OS)	Visual field	Fundus	ERG
IV.1	55	No	—	—	1.0/1.0	Emetropic/emetropic	Normal	Normal	Normal responses OU
IV.5	47	No	—	—	0.4/0.3 cataracts	-6.5/-6.5	Normal	Normal	Normal responses OU
IV.14	52	No	—	—	1.0/1.0	+1.50/+1.50	Normal	Normal	Normal responses OU
V.10	26	Yes	23	Moderate	0.6/0.6	105+3.75+0.25/ 80+3.50+0.75	Highly altered OU	RPE atrophy, vascular attenuation	Altered OU
V.11	19	Yes	19	Mild (early symptoms)	0.5/0.6	110+3.50+2.75/ 80+3.00+3.50	Light altered OU	RPE peripheral atrophy	Altered OU

Abbreviations: ERG, electroretinogram; OD, right eye; OS, left eye; OU, the two eyes; RPE, retinal pigmented epithelium.  
<sup>a</sup>Current age.

showed moderate night blindness and mild visual field constriction in both eyes, the ERG showed decreased amplitude and increased latency in both rod and cone waves, and flicker response with decreased amplitude (Table 2). Therefore, in this particular case, genetic diagnosis preceded clinical phenotype and was instrumental for early detection of RP onset.

#### Haplotype conservation as indicative of a mutational founder effect

The analysis of this large A6 pedigree allowed us to identify the haplotype linked to the new mutation. We then considered whether the pedigrees A8 and A9, which came from the same geographical area in Asturias (north west of Spain) as family A6, but with no previous record of genetic relationship, shared the causative mutation due to a founder effect. These two families were not selected earlier for mutational screening, given the high number of remaining RP candidates, among them *PRPF31*. Our hypothesis of common ancestry was further supported on the grounds that all affected individuals in the three families shared the SNP haplotype linked to the E181X mutation (Figure 6). Direct sequencing revealed that the RP patients in the A8 and A9 families carried the same mutation.

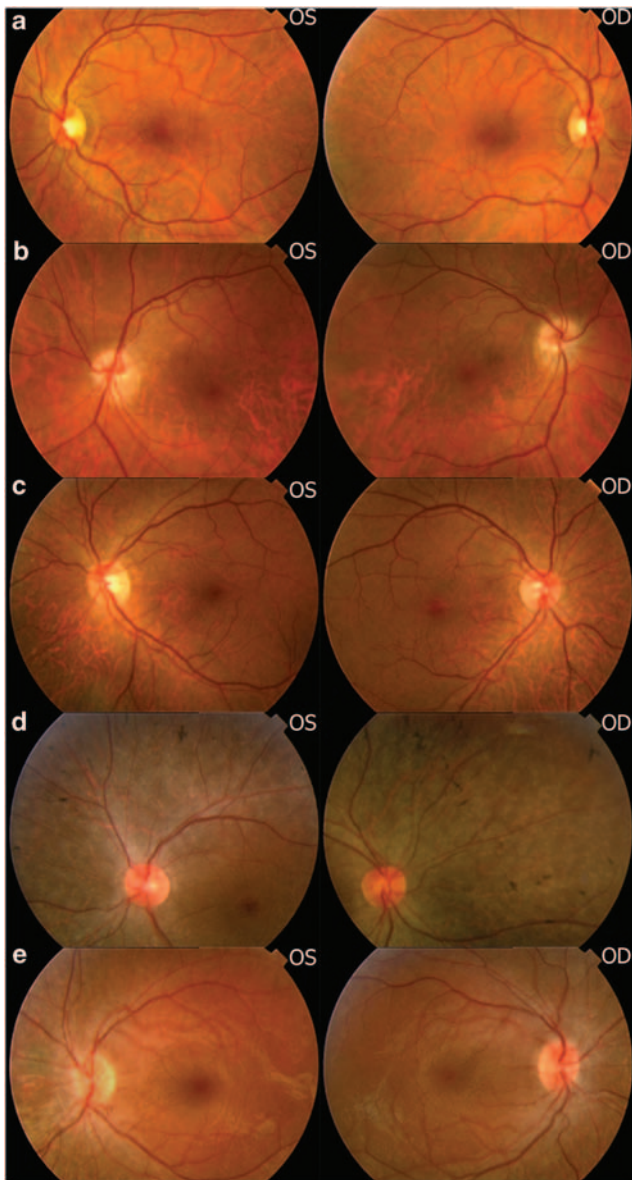
We believe that these results provide a proof-of-principle for identifying mutational founder effects, and underscore the usefulness of haplotype co-segregation analysis based on SNPs located close to RP genes, particularly in families with poor informativity.

#### Genotyping and mutational screening of autosomal recessive retinitis pigmentosa families

Seven arRP families were also collected (Figure 1) and analyzed by the RP-LCA co-segregation chip. All of them were consanguineous and thus, RP candidates must abide to both, co-segregation and homozygosity-by-descent criteria. The chip efficiency in these cases was extremely high (95%), as an average of only two genes remained as candidates per family. In two large pedigrees (A1 and A5, Figure 1), all the RP-LCA genes (dominant and recessive) were directly ruled out after this single genotyping step. Hence, we are now undertaking genome-wide gene identification in these two families. Concerning the five remaining arRP pedigrees, the non-excluded candidates were screened for mutational analysis but no pathogenic mutation was found. However, their small size did not warrant statistical significance in linkage analysis.

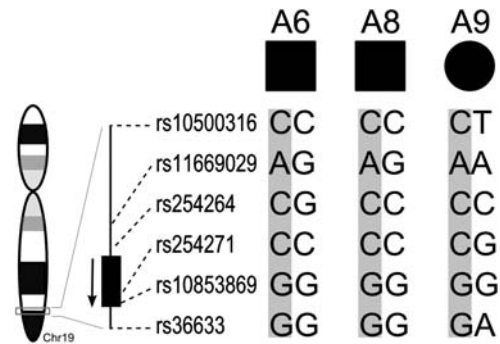
#### DISCUSSION

As more causative genes are identified in highly heterogeneous diseases, the more imperative is the use of a comprehensive high-throughput approach for molecular diagnoses. Our SNP-based co-segregation chip for RP and LCA genetic testing is fast, reliable and cost-effective, as it directly rules out a high number of retinal dystrophy candidates and highlights those for mutational screening. From the technical point of view, our multiplex strategy is very



**Figure 5** Fundus eye photographs (OS-left eye; OD-right eye) from one affected and several mutation carriers detected after genetic testing. (a) Incomplete penetrant IV.1. (b) Incomplete penetrant IV.5. (c) Incomplete penetrant IV.14. (d) Patient V.10, the view of the OD fundus is lateral to show the peripheral bone-spicule pigment deposits and vascular attenuation. (e) Previously undiagnosed female V.11, now showing early symptoms of RP, such as peripheral retinal pigmented epithelium atrophy.

flexible, as additional SNPs for new genes can be easily incorporated. Moreover, no previous knowledge of reported mutations is required, as the main criterion for candidate inclusion is co-segregation with the disease. The key issue of this type of analysis is genetic informativity, which depends on the average heterozygosity of the genetic markers and the number of meioses available. The selection of SNPs is of utmost relevance, as they have to be both very informative and close enough to the gene to minimize double recombination events. To increase the exclusion score of our RP-LCA chip, the number of SNPs per gene has been raised from four to six. As a result, the number of candidates ruled out per family has increased, reducing the number of genes left for mutational screening. In fact, although the number of recessive consanguineous families used in this study did not allow for



**Figure 6** Single nucleotide polymorphism (SNP) haplotype conservation in patients from A6, A8 and A9 families. The *PRPF31* SNP haplotype co-segregating with the disease is conserved in three families from the same geographical region, as exemplified by one affected member of each family (gray bar). The relative location with respect *PRPF31* (black box) of the SNPs and their chromosomal position is also depicted. The SNP genotypes are given by the SNPlex design: the first five correspond to the allele of the plus chromosomal strand, whereas the last one is read on the minus strand.

statistical significance, the comparison of the same genes analyzed in the first chip *versus* this new comprehensive version showed that the average of non-excluded arRP candidates per family dropped from 2.7 to 1.

The efficiency of the genetic analysis depends on the structure of the pedigrees and the type of inheritance. Therefore, dominant forms – where only one allele causes the disease – require a higher number of affected individuals compared with recessive forms, in which all the affected siblings have to share the two alleles. Furthermore, in consanguineous cases homozygosity-by-descent adds further constraint to mere co-segregation, making the molecular diagnosis of even a single-affected family member possible. According to our results, dominant pedigrees with a minimum of four to five affected individuals are informative enough to be effectively screened by our chip. In this context, family A6 was paradigmatic, as all candidates but the causative gene were directly excluded. Mutational screening of this family by direct sequencing allowed us to identify a new nonsense mutation in position c.541 G>T of *PRPF31*, which introduced a premature termination codon (E181X). Interestingly, *PRPF31* is ubiquitously expressed as it encodes a pre-mRNA splicing factor, which is an integral factor of the snRNP complex (spliceosome). Yet, the only phenotype associated to *PRPF31* mutations is RP. It can be noted that, other pre-mRNA splicing factors, *PRPF3* and *PRFP8*, are also involved in autosomal dominant RP. Many *PRPF31* pathogenic alleles are null mutations, which have been previously shown to cause RP by haploinsufficiency, mainly through the NMD surveillance mechanism.<sup>10,13,14</sup> The variation in the levels of expression of the remaining wild-type allele directly correlates with incomplete penetrance in pedigrees.<sup>11</sup> Moreover, this expression variation has been shown to be a highly heritable character, depending on at least two transacting expression quantitative trait loci (eQTLs) (expression quantitative trait locus), which would therefore act as genetic modifiers.<sup>15</sup> In our case, the mRNA levels in the blood of symptomatic and asymptomatic individuals support the pathogenicity of the identified mutation in the A6 family, and confirm that the disease depends on the amount of wild-type mRNA produced.

This disease chip requires familial cases for co-segregation analysis, and although family sample collection is more demanding than the mere analysis of probands, the benefits derived from this additional information are worthwhile as: (i) it directly detects presymptomatic carriers (as in the case of individual V.11 in pedigree A6); (ii) it

facilitates prenatal diagnosis and genetic counselling; and (iii) it identifies mutation-associated SNP haplotypes, which under the assumption of a mutational founder effect, provide the genetic basis of the disease in families otherwise unsuitable for linkage analysis.

Finally, our approach highlights the families in which all the known candidate genes are excluded, thus singling out the pedigrees for the identification of novel RP genes. As 40% of the RP cases remain unassigned, this still is one of the main challenges in the inherited retinal disorders.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the members of all the families for their participation in this study. We are obliged to A Mayor for sample collection, helpful discussions and constant support to our research. EP was a recipient of an FPI fellowship from the Spanish Ministry of Education and Science (MEC), and is now under contract by CIBERER. MR was a recipient of a scholarship from Bidons Egara and is now a recipient of an FPU fellowship from MEC. PM and JP are under contract by CIBERER. This study was funded by Fundaluce (2004), Grant BFU2006-04562 (Ministerio de Educación y Ciencia) and CIBERER INTRA/07-08/718.1 to RG-D. This study was approved by the Bioethics Committee of the University of Barcelona (Barcelona, Spain).

- 1 Rivolta C, Sharon D, DeAngelis MM, Dryja TP: Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 1219–1227.
- 2 Hims MM, Diager SP, Inglehearn CF: Retinitis pigmentosa: genes, proteins and prospects. *Dev Ophthalmol* 2003; **37**: 109–125.

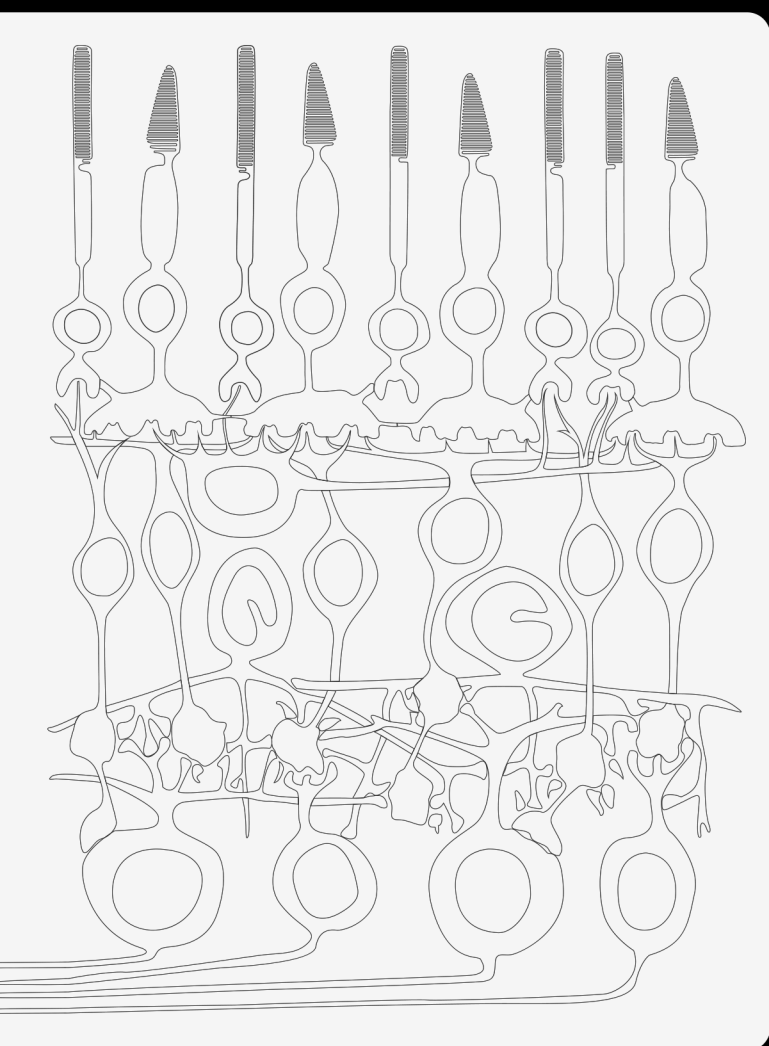
- 3 Pomares E, Marfany G, Brion MJ, Carracedo A, Gonzalez-Duarte R: Novel high-throughput SNP genotyping cosegregation analysis for genetic diagnosis of autosomal recessive retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. *Hum Mutat* 2007; **28**: 511–516.
- 4 Dryja TP, McGee TL, Reichel E *et al*: A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 1990; **343**: 364–366.
- 5 Farrar GJ, McWilliam P, Bradley DG *et al*: Autosomal dominant retinitis pigmentosa: Linkage to rhodopsin and evidence for genetic heterogeneity. *Genomics* 1990; **8**: 35–40.
- 6 Rosenfeld PJ, Cowley GS, McGee TL, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP: A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 1992; **1**: 209–213.
- 7 Bessant DA, Payne AM, Mitton KP *et al*: A mutation in NRL is associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 1999; **21**: 355–356.
- 8 Nishiguchi KM, Friedman JS, Sandberg MA, Swaroop A, Berson EL, Dryja TP: Recessive NRL mutations in patients with clumped pigmentary retinal degeneration and relative preservation of blue cone function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 17819–17824.
- 9 Celesia GG, Bodis-Wollner I, Chatrian GE, Harding GF, Sokol S, Spekreijse H: Recommended standards for electroretinograms and visual evoked potentials. Report of an IFCN committee. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1993; **87**: 421–436.
- 10 Vithana EN, Abu-Safieh L, Pelosini L *et al*: Expression of PRPF31 mRNA in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa: a molecular clue for incomplete penetrance? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 4204–4209.
- 11 Sato M, Nakazawa M, Usui T, Tanimoto N, Abe H, Ohguro H: Mutations in the gene coding for guanylate cyclase-activating protein 2 (GUCA1B gene) in patients with autosomal dominant retinal dystrophies. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005; **243**: 235–242.
- 12 Rivolta C, McGee TL, Rio Frio T, Jensen RV, Berson EL, Dryja TP: Variation in retinitis pigmentosa-11 (PRPF31 or RP11) gene expression between symptomatic and asymptomatic patients with dominant RP11 mutations. *Hum Mutat* 2006; **27**: 644–653.
- 13 Rio Frio T, Wade NM, Ransijn A, Berson EL, Beckmann JS, Rivolta C: Premature termination codons in PRPF31 cause retinitis pigmentosa via haploinsufficiency due to nonsense-mediated mRNA decay. *J Clin Invest* 2008; **118**: 1519–1531.
- 14 Abu-Safieh L, Vithana EN, Mantel I *et al*: A large deletion in the adRP gene PRPF31: evidence that haploinsufficiency is the cause of disease. *Mol Vis* 2006; **12**: 384–388.
- 15 Rio Frio T, Civic N, Ransijn A, Beckmann JS, Rivolta C: Two trans-acting eQTLs modulate the penetrance of PRPF31 mutations. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 3154–3165.











“ [...] mis aficiones a la retina son historia antigua. El tema me cautivó siempre, porque, en mi sentir, la vida no alcanzó jamás a forjar máquina de tan sutil artificio y tan perfectamente adecuada a un fin como el aparato visual. Por raro caso, además, la naturaleza se ha dignado emplear aquí resortes físicos accesibles a nuestro saber actual. No debo ocultar que en el estudio de dicha membrana sentí por primera vez flaquear mi fe darwinista, abrumado y confundido por el soberano ingenio constructor que campea, no sólo en la retina y aparato dióptrico de los vertebrados, sino hasta en el ojo más ruin de los insectos. Allí, en fin, sentí más profundamente que en ningún otro tema de estudio, la sensación escalofriante del insondable misterio de la vida.”

Santiago Ramón y Cajal, *Recuerdos de mi vida*, 1923