





Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma
de Barcelona

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

Anàlisi de variants genètiques mitjançant NGS en
pacients amb distròfies de retina. Transcriptoma
(RNAseq) diferencial de cèl·lules de retina (RPE)
induïdes *in vitro* amb mutació en el factor de
splicing PRPF8.

Per Beatriz Pascual Rodríguez

Director: Dr. José Miguel Carballo Villarino

Tesi doctoral realitzada a la Unitat de Genètica Molecular del CST per optar al títol
de **Doctora en Bioquímica, Biologia molecular i Biomedicina**.

Juny 2018

El Dr. José Miguel Carballo Villarino, cap de la Unitat de Genètica Molecular de l'Hospital de Terrassa,

CERTIFICA:

Que Beatriz Pascual Rodríguez ha realitzat sota la seva direcció i supervisió el treball d'investigació que s'exposa en la memòria titulada Anàlisi de variants genètiques mitjançant NGS en pacients amb distròfies de retina. Transcriptoma (RNAseq) diferencial de cèl·lules de retina (RPE) induïdes in vitro amb mutació en el factor de splicing PRPF8 per optar al grau Doctor en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina, per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que aquest treball s'ha dut a terme a la Unitat de Genètica Molecular del Hospital de Terrassa del Consorci Sanitari de Terrassa (CST)

I perquè consti, es signa el present certificat:

Dr. José Miguel Carballo Villarino

Director de la Tesi

Beatriz Pascual Rodríguez

Autora de la Tesi

Terrassa, a 15 de juny de 2018

AGRAÏMENTS

Al voltant de la realització d'aquesta tesi doctoral, hi ha hagut bastantes persones a les quals els dec el meu sincer agraïment:

En primer lloc al Dr. Miguel Carballo, per haver-me donat la oportunitat de formar part de la Unitat de Genètica Molecular des del moment que vaig iniciar les pràctiques de la Llicenciatura de Bioquímica. Per haver confiat en mi per a la realització d'aquesta tesi doctoral, tot i la compaginació amb l'esport d'alt nivell, facilitant-me en tot moment les anades i tornades. Per ensenyar-me que no existeixen resultats bons o dolents, si no positius o negatius; per ensenyar-me com funciona una ment investigadora; i per les llargues converses que no tenen a veure amb la tesi, que m'han ajudat en la presa de decisions.

A les meves companyes: Begoña, Imma, M^a José i Emma; sense les quals aquesta tesi tampoc hagués estat possible. Sempre disposades a resoldre tots els meus dubtes (que no eren pocs), a preparar-me algun gel o alguna PCR perquè anava justa de temps... I sobre tot, perquè a més de companyes, s'han convertit en grans amigues.

No em puc oblidar del Dr. Miguel de Sousa Dias, per nosaltres "Miguelito", amb el qual vaig compartir un parell d'anys, i part del meu treball prové del que ell va iniciar.

A la Dra. Dunja Lukovic, per haver-me facilitat la familiarització amb les tècniques de desdiferenciació i diferenciació cel·lular. Gran part dels resultats obtinguts en aquest treball són gràcies a la seva col·laboració.

A la Dra Ana Dopazo, del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, i als membres del seu equip, per la realització de la seqüenciació de RNA. Especialment a José Luís Cabrera Alarcón, pel seu ajut en l'anàlisi de l'expressió

del transcriptoma, i per facilitar-me l'enteniment de la bioinformàtica, amb la qual no em porto gaire bé.

A la Dra. M^a Carmen Martínez el Dr. Pere Suau, per haver estat tutors d'aquesta tesi, donant-me suport en tot moment.

Al Dr. Jaume Farrés, per haver accedit a la direcció del seguiment d'aquest treball, mostrant interès per a la correcta avaluació i donar-me el seu suport també.

A la empresa Roche Diagnostics, per la contractació durant el període de realització d'aquesta tesi.

A la meva família i als meus amics, per donar-me suport i ànims en tot moment, ajudant-me a mantenir la motivació per a la realització d'aquest treball.

Al meu company, el Jordi, per no deixar d'animar-me, sobre tot en aquells moments més difícils; per posar-se en el meu lloc i trobar sempre les paraules adequades per motivar-me.

I per últim, al meu fill Gerard, perquè assabentar-me del meu embaràs, va ser el tret de sortida per l'escriptura d'aquesta tesi. Ell és qui sense saber-ho, m'ha fet més companyia durant totes les hores d'ordinador; tant a la panxa com al bressol.

Tots vosaltres formeu part d'una manera o altra d'aquest treball... GRÀCIES!

ÍNDEX

LLISTAT ABREVIATURES	IV
INDEX DE TAULES	VI
INDEX DE FIGURES	VII
1.- INTRODUCCIÓ.....	1
1.1- Estructura i funció de la retina	1
1.2- Distròfies hereditàries de retina: Retinosi pigmentària	6
1.2.1- Genètica molecular de la RP	9
1.2.2- Diagnòstic molecular de la RP	14
1.3- Processament o <i>splicing</i> de pre-mRNA	17
1.4- PRPFs i retinosi pigmentària autosòmica dominant.....	22
1.5- Reprogramació i diferenciació cel·lular com a model de diferents malalties.	24
2.- OBJECTIUS	27
3.- MATERIAL I MÈTODES	29
3.1.- Pacients i famílies estudiades.....	30
3.2- Obtenció i quantificació de mostres	30
3.2.1- Extracció d'àcids nucleics: DNA i RNA.....	30
3.2.2- Quantificació àcids nucleics	31
3.2.3- Control qualitat dels àcids nucleics.....	32
3.3- Panell de captura per Distròfies de retina	32
3.3.1- Disseny del panell	32
3.3.2- Protocol captura: preparació llibreria i seqüenciació.....	34
3.4- Estudi d'exomes mitjançant Whole Exome Sequence (WES)	36
3.4.1- Protocol captura: preparació llibreria i seqüenciació.....	36

3.5- Anàlisi de dades	36
3.5.1- Avaluació qualitat de les dades en cru	37
3.5.2- Avaluació de l'alineament de lectures i l'enriquiment de dianes	37
3.5.3- Identificació de variants	38
3.5.4- Predicció conseqüències mutació	40
3.5.6- Estudi variants panell captura	43
3.5.7- Estudi de variants per la detecció de gens candidats (WES).....	43
3.6- Estudi segregació variants candidates.....	44
3.6.1- Disseny oligos/primers	44
3.6.2- Reacció en cadena de la polimerasa (PCR).....	44
3.6.3- Electroforesi en gel d'agarosa	45
3.6.4- Purificació del producte de PCR.....	46
3.6.5- Seqüenciació automàtica dels productes de PCR (Sanger)	46
3.6.6- Seqüenciació directa de l'exó 5 del gen <i>RHO</i>	47
3.6.7- Seqüenciació directa de la regió ORF 15 del gen <i>RPGR</i>	47
3.6.8- Estudi de lligació de marcadors cromosoma 8: Realització haplotip.....	48
3.7- Anàlisi de la variant c.307G>A en gen <i>COL6A6</i> mitjançant FRET	49
3.8- Assaig MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification.....	49
3.9- Obtenció d'induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs).....	50
3.9.1- Cultiu primari de fibroblasts	50
3.9.2- Reprogramació de fibroblasts per obtenció d'iPSCs.....	51
3.9.3- Caracterització iPSCs i avaluació de la pluripotència	52
3.9.4- Diferenciació i caracterització de cèl·lules RPE	55
3.9.5- Anàlisi transcriptoma i expressió diferencial: RNAseq	56
3.9.6- Anàlisi d'esdeveniments de <i>splicing</i>	58
4.- RESULTATS	62
4.1- Estudi seqüenciació massiva per captura en panells dirigits:.....	62
4.2- Caracterització de variants genètiques per a la detecció de possibles gens candidats: seqüenciació de l'exoma complet (WES).....	67

4.3- Caracterització iPSCs i avaluació de la pluripotència.....	79
4.4- Diferenciació i caracterització de cèl·lules específiques RPE	85
4.5- Anàlisi expressió diferencial.....	85
4.5.1- Anàlisi RNA total extret	85
4.5.2- Control de qualitat RNAseq.....	86
4.5.3- Resultats expressió diferencial	88
4.5.4- Anàlisi d'esdeveniments de <i>splicing</i> i estudi d'isoformes	92
5.- DISCUSSIÓ	101
6.- CONCLUSIONS.....	121
7.- REFERÈNCIES.....	125
ANNEXOS	147

LISTAT ABREVIATURES

adRP: Retinosi pigmentària autosòmica dominant
arRP: Retinosi pigmentària autosòmica recessiva
BCV: Coeficient de variació biològica
BWA: Burrow-Wheeler Aligner)
CNIC: Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares
CO₂: Diòxid de carboni
CPM: Comptes per milió
dbSNP: Single nucleòtid polymorphism database
DGGE: Gel electroforesi en gradient desnaturalitzant
DMEM: Dulbecco modified eagle medium
DMSO: Dimetilsulfòxid
DNA: Àcid desoxirribonucleic
EDTA: Àcid etilendiamintetraacètic
EM: Expectation maximization
ESE: Exonic splicing enhancers
ESS: Exonic splicing silencers
FBS: Sèrum fetal boví
FGF: Factor de creixement de fibroblast
FRET: Transferència d'energia per ressonància de fluorescència
GMPc: Guanosin monofosfat cíclic
GO: Gene Ontology
GSEA: Gene set enrichment analysis
hiPSCs: Human induced pluripotent stem cells
iPSCs: Induced pluripotent stem cells
ISE: Intronic splicing enhancer
ISS: Intronic splicing silencer
KSR: Knockout sèrum replacement
LCA: Amaurosi congènita de Leber
MgCl₂: Clorur de magnesi
MLPA: Múltiplex ligand probe amplification
mRNA: Àcid ribonucleic missatger
NGS: Next generation sequencing
NMD: Nonsense mediated decay

ORA: Over-representation analysis
ORF: Open reading frame
PBS: Phosphate-buffered saline
PCR: Reacció en cadena de la polimerasa
PDE: Fosfodiesterasa
PFA: Paraformaldehid
qPCR: PCR quantitativa
PRPF: Factor de pre-processament del RNA
RFU: Unitat fluorescència relativa
RP: Retinosi Pigmentària
RPE: Epiteli pigmentari retinià
RPGR: Retinitis pigmentosa GTPase regulator
RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction
SCID: Severe Combined Inmuno Deficiency
SMA: Atròfia muscular espinal
SNP: Single nucleòtid polymorphism
snRNP: Small nuclear ribonucleoprotein
SRE: Elements reguladors de l'splicing
SRP: Retinosi pigmentària esporàdica
SSR: Simple Sequence Repeat
STR: Short Tandem Repeat
UGM: Unitat de genètica molecular
UPR: Unfolded protein response
UPS: Ubiquitin/Proteasome System
UV: Ultraviolat
WES: Whole exome sequencing
xIRP: Retinosi pigmentària lligada al cromosoma X

INDEX DE TAULES

Taula 1: gens associats a adRP no sindròmica. Fahim <i>et al.</i> , 2004-2017	12
Taula 2: gens associats a la arRP no sindròmica. Fahim <i>et al.</i> , 2004-2017	12
Taula 3: gens associats a xIRP no sindròmica. Fahim <i>et al.</i> , 2004-2017	13
Taula 4: gens continguts al panell de captura	33
Taula 5: Resolució de DNA lineal en gel d'agarosa	45
Taula 6: primers d'amplificació ORF15 (F/R) i primers interns per seqüenciació	47
Taula 7: SNPs utilitzats i dades de freqüència en la població.....	48
Taula 8: primers per RT-PCR utilitzats per detectar el genoma i transgens del SeV (ombrejats en gris) i els marcadors de pluripotència.....	55
Taula 9: Mètrica de la qualitat d'alineació.	64
Taula 10: mutacions responsables de la distròfia de retina trobades en 9 dels 21 pacients detectades amb panell dirigit Rpv1-GeneSGKit®.	66
Taula 11: variants trobades a 5 dels pacients analitzats amb panell dirigit Rpv1-GeneSGKit® que podrien ser causant de la distròfia de retina.....	67
Taula 12: variants estudiades en família RP65.....	69
Taula 13: resultats MLPA després de l'anàlisi de fragments	71
Taula 14: variants estudiades en família RP83.....	72
Taula 15: variants estudiades en família RPF3	74
Taula 16: variants estudiades en família RPN89	76
Taula 17: estudi haplotip als diferents individus afectes de la família RPN89.	77
Taula 18: resultats MLPA procedents de l'anàlisi de fragments.....	78
Taula 19: anàlisi fingerprinting on es mostra la igualtat de marcadors microsatèl·lits en ambdós tipus cel·lulars.....	84
Taula 20: Nombre de lectures de seqüència.	86
Taula 21: gens específics RP sobre-expressats en cèl·lules RPE de pacient vs sa.....	89
Taula 22: gens específics RP reprimits en cèl·lules RPE de pacient vs sa	90
Taula 23: proporció de les diferents isoformes seqüenciades del gen <i>UNC119</i> en cèl·lules RPE	97

INDEX DE FIGURES

Figura 1: secció sagital del globus ocular humà adult.	1
Figura 2: imatge de les 10 capes de la retina.....	2
Figura 3: estructura de cons i bastons.....	4
Figura 4: activació de la fototransducció als bastons.	5
Figura 5: Imatges de la progressiva pèrdua de visió perifèrica	7
Figura 6: imatges de fons d'ull.....	7
Figura 7: Cicle d'acoblament i desacoblament del spliceosoma	18
Figura 8: Mecanismes de splicing alternatiu.....	20
Figura 9: flux de treball del Rpv1-GeneSGKit®	35
Figura 10: imatges a mode exemple de la informació continguda en la plataforma GeneSystems amb la que es fan les anàlisis genètiques.....	42
Figura 11: Electroforesi capil·lar de 11 mostres procedent de la primera validació de les llibreries.....	62
Figura 12: Electroforesi capil·lar de 11 mostres procedent de la segona validació de les llibreries.	62
Figura 13: Qualitat individual (per una única mostra) de l'assaig representada gràficament:.....	63
Figura 14: A) Percentatge de les bases diana cobertes a diferents profunditats, i per a cada cromosoma B) Percentatge de les lectures de regions diana respecte el número total de lectures mapejades.....	65
Figura 15: arbre genealògic família RP65.	68
Figura 16: Corbes de fusió (a dalt) i els pics de fusió (a baix) obtinguts després del FRET.....	70
Figura 17: Gel agarosa 1,5%. Amplificació amb primers M13_RHO-4F i M13_RHO-5R.	71
Figura 18: arbre genealògic família RP83	72
Figura 19: cromatograma que mostra seqüència de la regió ORF15.	73
Figura 20: arbre genealògic família RPF3	74
Figura 21: arbre genealògic família RPN89.....	75
Figura 22: visualització colònies hiPSCs al microscopi electrònic.	79
Figura 23: Gel agarosa 2% on es mostren les bandes procedents de la RT-PCR dels factors de reprogramació exògens i DNA viral.....	80

Figura 24: Cromatogrames que mostren la seqüència al voltant de la mutació (<i>PRPF8</i> , c.6974_6994del21bp) en hiPSCs de pacient i del control sa.	80
Figura 25: RT_PCR Semiquantitativa.....	81
Figura 26: Immunofluorescència que mostra l'expressió de marcadors de pluripotència: factors de transcripció OCT-4, NANOG, SOX2, i marcadors de superfície SSEA-4.....	82
Figura 27: Imatge del teratoma 5 setmanes post-injecció	82
Figura 28: Imatges obtingudes amb microscopi òptic de les 3 capes germinals: ectoderma, mesoderma i endoderma	83
Figura 29: Anàlisi cariotip. Imatges de 2 clons diferents de les iPSCs (RP2-FiPS4F1) procedents de fibroblasts de la pacient.....	84
Figura 30: quantificació RNA total de les 12 mostres de RNA.	85
Figura 31: Agrupació de mostres.....	87
Figura 32: Gràfic de correlació	87
Figura 33: Diferències de nivell d'expressió (log2FC) versus la mitjana d'expressió (log2(AvgExp)) de totes les mostres, per a cada gen individual.	88
Figura 34: Dotplot for 20 most significant GO biological processes gene-sets in retina.....	91
Figura 35: : Results of KEGG pathways gene-sets over-representation analysis	91
Figura 36: Distribució d'isoformes en cèl·lules RPE de pacient i control.	92
Figura 37: Utilització diferencial d'introns en cèl·lules RPE.....	93
Figura 38: Distribució d'isoformes en fibroblasts de pacient i control	93
Figura 39: Utilització diferencial d'introns en fibroblasts.....	94
Figura 40: Distribució d'isoformes entre cèl·lules RPE i fibroblasts de pacient.	94
Figura 41: Utilització diferencial d'introns en pacient.....	95
Figura 42: Distribució d'isoformes entre cèl·lules RPE i fibroblasts en control.	95
Figura 43: Utilització diferencial d'introns en control.....	96
Figura 44: Utilització diferencial d'exons de <i>UNC119</i> en cèl·lules RPE	98

Introducció

1.- INTRODUCCIÓ

1.1- Estructura i funció de la retina

La vista és el més especialitzat i complex de tots els sentits. Els ulls són els òrgans visuals a través dels quals, els individus perceben les realitats físiques. Molts organismes tenen receptors lluminosos que els fan reaccionar enfront diferents situacions; però la verdadera visió, consisteix en la formació d'imatges al cervell.

L'ull és un òrgan anatòmicament molt complex, i una de les seves parts més importants per a la formació d'imatges, és la retina. La retina és el teixit més intern del globus ocular i és molt sensible a la llum. Quan la llum incideix sobre aquest teixit, es desencadenen una sèrie de fenòmens químics i elèctrics, que es tradueixen en impulsos nerviosos que arriben al cervell a través del nervi òptic.

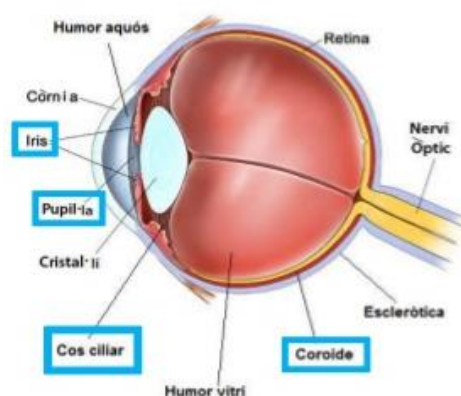


Figura 1: secció sagital del globus ocular humà adult.

[De: John Moran Eye Center. University of UTAH]

La retina és una estructura complexa formada per 10 capes paral·leles que, des de la més interna a la més externa, són:

1. Capa limitant interna: separa la retina de l'humor vitri
2. Capa de fibres del nervi òptic: formada per axons de cèl·lules ganglionars que formen el nervi òptic
3. Capa de cèl·lules ganglionars: formada per nuclis de les cèl·lules ganglionars.
4. Capa plexiforme interna: regió de connexió sinàptica entre cèl·lules bipolars, amacrines i ganglionars
5. Capa nuclear interna: formada per nuclis cel·lulars de les cèl·lules bipolars, horitzontals i amacrines. Són interneurons que transdueixen els senyals.
6. Capa plexiforme externa: regió de connexió sinàptica entre cèl·lules fotoreceptores i cèl·lules bipolars.
7. Capa nuclear externa: formada pels nuclis cel·lulars de les cèl·lules fotoreceptores
8. Capa limitant externa: unions intercel·lulars tipus *zonula adherens* entre cèl·lules fotoreceptores i cèl·lules de Müller.
9. Capa cèl·lules fotoreceptores: formada pels segments externs de cons i bastons
10. Epiteli pigmentari: capa més externa de la retina, formada per cèl·lules cúbiques no neuronals, que contenen grànuls de melanina que li donen una pigmentació característica. S'encarreguen del metabolisme dels fotoreceptores.

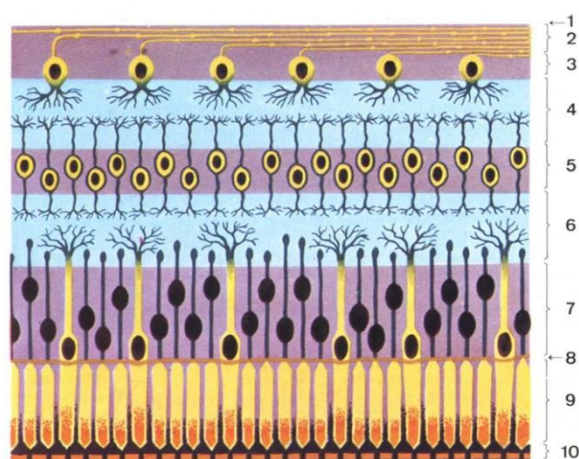


Figura 2: imatge de les 10 capes de la retina

[De: <http://www.enciclopedia.cat/EC-GEC-0139162.xml>]

La funció de la retina és capturar la llum externa i transformar-la en un estímul visual. La llum entra per la capa més interna i ha de penetrar tots els tipus cel·lulars fins arribar als fotoreceptors. Els segments externs dels fotoreceptors transdueixen la llum i envien el senyal a través dels cossos cel·lulars des de la capa nuclear externa cap als seus axons. Els axons (capa plexiforme externa) contacten amb les cèl·lules horitzontals que ajuden en el processament del senyal enviant-lo cap a les cèl·lules bipolars. Un cop en els axons de cèl·lules bipolars (capa plexiforme interna), aquests contacten amb les dendrites de les cèl·lules ganglionars i amacrines. Al final del recorregut, són els axons de les cèl·lules ganglionars els que envien el senyal cap a la capa de fibra que forma el nervi òptic.

S'anomena foto-transducció a la captació d'un fotó de llum i posterior conversió en un senyal elèctric. Aquest procés té lloc als segments externs dels fotoreceptors: cons i bastons. Els **fotoreceptors** són un tipus de neurones altament especialitzades i compartimentades en quatre regions: segment exterior, on es troben els discs; segment interior, on es troba el cos cel·lular; nucli i regió sinàptica. El segment exterior i l'interior estan connectats per una estructura ciliar. Els fotoreceptors són les cèl·lules més abundants de la retina i s'estima que a cada ull hi ha aproximadament 120 milions de bastons i entre 3-10 milions de cons. Els segments externs d'ambdós tipus cel·lulars són la part sensorial on s'inicia la cascada visual, i per tant, el procés de foto-transducció. Des del punt de vista anatòmic, el segment extern és una prolongació de la cèl·lula que té forma de con o de bastó, diferenciant així els dos tipus de fotoreceptor. La diferència no és únicament anatòmica, si no que també ho és funcional: els bastons són estimulats amb llum dèbil de longitud d'ona més baixa, per tant, són els que permeten la visió amb menys intensitat de llum. Són responsables de la visió perifèrica, ja que es troben situats fora de la part central de la retina. Com que no són capaços de diferenciar colors, donen lloc a una visió acromàtica. En canvi, els cons són

estimulats amb llum més brillant, de manera que són responsables de la visió en color i de l'agudesa visual. Aquests es concentren a la màcula, que és la part central de la retina; i al centre de la màcula es troba la fòvea (regió sense cap bastó).

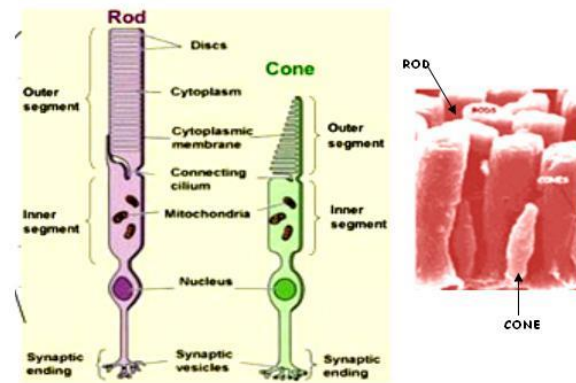


Figura 3: estructura de cons i bastons

A la dreta, imatge obtinguda per escombrat [De: <http://thebrain.mcgill.ca/>]

Aquestes diferències entre els dos tipus de fotorceptors són degudes a les molècules de foto-pigment que contenen als seus segments. Aquests foto-pigments són la base bioquímica del procés de la foto-transducció i es troben a les membranes dels discs del segment extern. Als bastons, el foto-pigment principal és la rodopsina, que absorbeix fotons a una longitud d'ona de 500nm, permetent la visió quan la llum és de baixa intensitat. Als segments externs dels cons hi ha 3 tipus d'opsines, i només hi ha una present a cada fotorceptor, diferenciant-los en cons-S (absorbeixen al blau), cons-L (absorció al vermell) i cons-M (absorció al verd). La combinació d'aquests tres tipus són responsables de la visió en color.

A cada disc dels segments externs hi ha milers d'opsines: proteïnes transmembrana indispensables pel procés de foto-transducció.

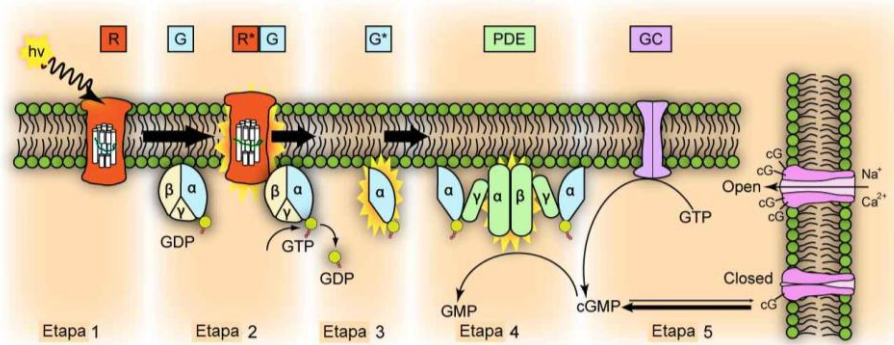


Figura 4: activació de la fototransducció als bastons.

R: rodopsina R*:rodopsina activada G:proteïna G PDE: fosfodiesterasa GC: guanilat ciclasa

[De: Leskov *et al.* 2000]

Als discs dels bastons s'inicia el procés de foto-transducció en incidir la llum sobre la rodopsina. És un receptor acoblat a proteïna G, que quan s'excita, activa gran quantitat de molècules de proteïna G del voltant. Aquesta activa la PDE (fosfodiesterasa), de manera que disminueix el GMPc cel·lular. Aquests canvis en la polarització de la membrana desencadenaran el senyal elèctric com a resposta a la intensitat de la llum. Les diferents intensitats de llum activaran uns o altres fotoreceptors; i a la mateixa vegada haurà d'haver-hi una inactivació del procés. En aquesta inactivació intervenen altres proteïnes, com la rodopsina quinasa o l'arrestina, per tal que no hi hagi dessensibilització dels receptors, i es pugui tornar a restaurar l'activitat basal per poder respondre al següent estímul lluminós.

Constantment els discs del extrem extern són fagocitats per cèl·lules de RPE (epiteli pigmentari retinià), i per tant, la cèl·lula els ha d'anar sintetitzant al segment intern per ser transportats cap al segment extern a través del cili connector (Ferrari *et al.* 2011). Això comporta una gran despesa energètica a nivell de metabolisme cel·lular, i per tant una elevada activitat a nivell de síntesi de mRNA i proteïnes.

Tota aquesta complexitat en el procés permet fer-nos una idea de la gran quantitat d'elements i la gran coordinació/regulació de tots ells que ha d'haver-hi per tal que el procés de la visió es doni de forma correcta.

1.2- Distròfies hereditàries de retina: Retinosi pigmentària

Les distròfies de retina (DR) hereditàries són malalties rares que provoquen una degeneració progressiva dels fotoreceptors, donant lloc a una pèrdua de visió (Bravo-Gil *et al.*, 2016). Les DR es caracteritzen per la elevada heterogeneïtat clínica i genètica, havent-hi formes sindròmiques i simples; i moltes vegades mostrant superposició fenotípica (Di Resta *et al.*, 2018)

Dins les distròfies de retina, la més comuna és la retinosi pigmentària (RP) o retinitis pigmentosa (Ayuso i Millan, 2010), en la qual els desordres oculars es caracteritzen per la producció d'anormalitats en els fotoreceptors o en les cèl·lules d'epiteli pigmentari retinià (RPE). Es caracteritza per la degeneració primària dels bastons, i es veuen afectades 1 de cada 3000-7000 persones (Ferrari *et al.*, 2011).

La RP es classifica en *no-sindròmica o simple*, quan no es veuen afectats altres òrgans o teixits; i en *sindròmica o sistèmica*, quan es veuen afectats múltiples teixits. En aquesta última forma, la RP es troba present juntament amb altres desordres multisistèmics. La forma simple té una prevalença d'1/4000 (Hamel, 2006).

Les manifestacions clíniques de la forma simple són:

Ceguesa nocturna. Un dels primers símptomes que apareixen en la RP és una deficiència per adaptar-se a la obscuritat (nictalopia o ceguesa nocturna). Aquest símptoma és causat per la pèrdua de funcionalitat dels bastons. En general, com més primerenca és l'edat d'aparició d'aquest defecte en l'adaptació a l'obscuritat, més sever serà el curs la malaltia.

Visió en túnel. La pèrdua de visió perifèrica també és un dels primers símptomes de la malaltia, però moltes vegades no es considera com a tal; i els malalts s'interpreten com a "torpes". Aquest fet és degut a la constricció del camp visual que pateixen.



Figura 5: Imatges de la progressiva pèrdua de visió perifèrica

Agudesia visual. L'agudesia visual té a veure amb la funcionalitat dels cons; i generalment aquesta agudesia a nivell central es conserva en els primers estadis de la RP. Però a mesura que avança la malaltia, la pèrdua de funcions dels bastons, acaba derivant també a la disminució funcionalitat de cons.

Fons d'ull. La imatge que s'observa al fons d'ull d'un individu afectat són uns pigments tipus espícules a la part perifèrica.



Figura 6: imatges de fons d'ull.

A l'esquerra individu sa. A la dreta, individu afectat RP, amb presència de pigments a la perifèria.

Cataractes. En casos de malaltia més severa, apareixen cataractes caracteritzades per canvis al cristal·lí de color groguenc que apareixen a l'eix visual de la lent del còrtex posterior. La severitat de la cataracta es correlaciona amb l'edat de l'individu afectat.

Partícules de pols a l'humor vitri són presents a la majoria d'individus amb RP. Aquestes són partícules petites incolores, que inclouen grànuls de pigment sense melanina, epiteli pigmentari, melanòcits uveals i cèl·lules tipus macròfags, distribuïts uniformement per tot l'humor vitri. L'observació d'aquestes partícules pot ser útil en el diagnòstic de la RP primerenca, abans que els canvis al fons d'ull siguin evidents.

La RP presenta una gran heterogeneïtat clínica. Es poden trobar diferents fenotips, amb una aparició més o menys primerenca; i evolució més o menys lenta; i per tant, també amb diferents graus de gravetat.

El diagnòstic que realitza l'oftalmòleg per determinar l'aparició de RP en un pacient, es basa en la història clínica, l'exploració oftalmològica i en l'estudi neurofisiològic.

1. *Anamnesi:* estudi de la simptomatologia, edat d'inici, arbre genealògic i antecedents
2. *Exploració oftalmològica:* estudi de diversos paràmetres com l'agudeses visual, segment anterior, pressió intra-ocular, test de colors i campimetria.
3. *Estudi neurofisiològic:* consisteix en explorar la funció de la retina mitjançant un electro-retinograma (tècnica que mesura la resposta dels fotoreceptors a diferents nivells d'estímuls lluminosos), i determinar l'estat del nervi òptic mitjançant l'estudi dels potencials evocats.

1.2.1- Genètica molecular de la RP

A més de l'heterogeneïtat clínica, la RP també és una malaltia molt heterogènia des del punt de vista genètic. La major part de gens associats a la RP codifiquen per proteïnes que estan involucrades en la foto-transducció, regulació del cicle visual, estructura del fotoreceptor i transcripció dels gens dels fotoreceptors (Berger *et al.*, 2010, Wright *et al.*, 2010). Tot i així, existeixen alteracions genètiques en alguns gens d'expressió ubíqua, és a dir, gens que tenen una funcionalitat bàsica a totes les cèl·lules de l'organisme, però que únicament donen lloc a patologia en retina; tal i com és el cas dels factors de processament de pre-mRNA o PRPFs (Martínez-Gimeno *et al.*, 2003; Hamel, 2006)

També hi ha gens amb variants patogèniques que causen RP, la funció dels quals encara es desconeix. S'espera que amb els nous avenços en l'àrea de la genètica molecular es puguin establir aquests mecanismes patogènics de moltes mutacions, que encara no s'han pogut descriure.

La complexitat de la RP radica en:

- heterogeneïtat de locus: variants patogèniques en diferents gens causen el mateix fenotip (Daiger *et al.*, 2007)
- heterogeneïtat al·lèlica: hi ha diferents variants patogèniques en un mateix gen; tot i així, algunes variants específiques poden ser comunes entre diferents individus afectats. A més, en alguns gens com el *PRPH2*, hi ha variants que causen RP (Manes *et al.*, 2015) i altres que produeixen un fenotip tipus distròfia macular central (Gamundi *et al.*, 2007; Coco *et al.*, 2010).
- desordres al·lèlics: diferents variants patogèniques en un mateix gen poden causar diferent fenotip. Per exemple, en *NR2E3* hi ha mutacions que poden causar RP (Yang *et al.*, 2010) i altres que causen "Enhanced S cone

syndrome” (Kuniyoshi *et al.*, 2013). El gen *RP1* conté variants que causen RP autosòmica dominant, i d’altres més rares que causen formes recessives de RP (Al-Rashed *et al.*, 2012)

- variabilitat en la severitat de la malaltia i en el fenotip entre diferents individus amb la mateixa mutació: probablement degut a factors genètics diferencials del propi individu (fons genètic característic i individual).

Els patrons d’herència de la RP no sindròmica són:

autosòmica dominant (adRP): herència en la qual el gen responsable de la malaltia, que es troba a un cromosoma autosòmic, presenta una mutació en un dels dos al·lels. Un dels pares del pacient pot estar afectat. El risc de transmissió és del 50% a cada fill, independentment del sexe. Aquest tipus d’herència s’estima en el 15-25% dels afectats (Ferrari *et al.* 2011). Els gens associats a aquesta forma de malaltia es troben a la taula 1. En alguns d’aquests gens, com *RP1* o *PRPF31*, s’han detectat casos de penetrància incompleta en la RP.

autosòmica recessiva (arRP): tipus d’herència en que els dos progenitors del pacient són portadors asimptomàtics de la malaltia (presenten un al·lel normal i un mutat). El fill o filla afecte hereta les dues formes anòmales tant del pare com de la mare. El risc de transmissió és del 25%. La freqüència d’aquesta herència augmenta en famílies amb consanguinitat. Representa aproximadament el 15-20% dels afectats (Ferrari *et al.* 2011). A la taula 2 es troben els gens associats a aquesta forma d’herència.

lligada al cromosoma X (xIRP): herència en la qual la mutació que provoca la malaltia es troba en un gen contingut al cromosoma X. Aquest patró fa que els homes siguin afectats, ja que només tenen un cromosoma X; i les dones poden ser portadores, ja que presenten un al·lel normal i un altre mutat. Algunes dones

portadores són asimptomàtiques, inclús en edats avançades; tot i que, de vegades poden presentar una forta miopia no bilateral. En altres casos, s'ha observat que algunes dones portadores, presenten un fenotip de RP més lleu que en homes, i pot aparèixer a mitjana edat. Aquest fet pot portar de vegades a confusió en la classificació genètica entre les formes de RP dominants i lligades al cromosoma X. Aquest tipus d'herència representa el 10-15% dels afectats (Ferrari *et al.* 2011); i els gens associats es citen a la taula 3.

formes esporàdiques (SRP): casos que apareixen de forma aïllada o esporàdica, sense antecedents familiars. La major part d'aquest s'associa a una transmissió recessiva (Ayuso i Millan, 2010). Aquests casos poden derivar de dones portadores de mutació al cromosoma X, i s'observaria més freqüentment en homes d'afectació més primerenca i evolució més ràpida de la malaltia; o bé casos menys freqüents que deriven d'una mutació *de novo* en una família dominant, o una segona mutació *de novo* en casos de portadors recessius.

formes digèniques: tipus d'herència en la qual interaccionen dues mutacions recessives en dos gens que codifiquen per proteïnes que estan funcionalment connectades. S'han descrit famílies que són heterozigotes per 2 variants patogèniques, una al gen *ROM1* i altra al *PRPH2* (Kajiwara *et al.*, 1994; Daiger *et al.*, 2008). Aquesta és una forma d'herència bastant rara i qüestionable.

Taula 1: gens associats a adRP no sindròmica. Fahim *et al.*, 2004-2017

Gen	Dades freqüència
<i>ARL3</i>	Rara
<i>BEST1</i>	Rara
<i>CA4</i>	Rara
<i>CRX</i>	1%
<i>FSCN2</i>	Improbable causa de la malaltia segons Daiger <i>et al.</i> , 2008, Gamundi <i>et al.</i> , 2005
<i>GUCA1B</i>	5% al Japó
<i>HK1</i>	Rara
<i>IMPDH1</i>	2%-3%
<i>KLHL7</i>	1%-2%
<i>NR2E3</i>	1%-2%
<i>NRL</i>	Rara
<i>PRPF3</i>	1%
<i>PRPF6</i>	Rara
<i>PRPF8</i>	2%-3%
<i>PRPF31</i>	8%
<i>PRPH2</i>	5%-10%. Generalment els fenotips varien des de la degeneració macular fins a maculopaties més complexes
<i>RDH12</i>	Desconeguda
<i>RHO</i>	20%-30%
<i>ROM1</i>	Rara
<i>RP1</i>	3%-4%
<i>RP9 (PAP1)</i>	Rara
<i>RPE65</i>	Rara
<i>SEMA4A</i>	3%-4% al Pakistan
<i>SNRNP200</i>	1%-2%
<i>SPP2</i>	Rara
<i>TOPORS</i>	1%

Els símptomes de la arRP coincideixen amb altres retinopaties autosòmiques recessives, en particular amb la Amaurosi congènita de Leber (LCA); és per això que és necessari un diagnòstic diferencial entre aquestes dues patologies.

Taula 2: gens associats a la arRP no sindròmica. Fahim *et al.*, 2004-2017

Gen	Dades freqüència	Gen	Dades freqüència
ABCA4	2%-5%	MAK	≤1%
ADGRA3	Rara	MERTK	≤1%
AGBL5	Rara	MVK	Rara
ARL6	Rara	NEK2	Rara
ARL2BP	Rara	NEUROD1	Rara
BBS1	≤1%	NR2E3	Rara
BBS2	≤1%	NRL	≤1%
BEST1	≤1%	PDE6A	2%-5%
C2ORF71	≤1%	PDE6B	2%-5%
C8ORF37	≤1%	PDE6G	≤1%
CERKL	3%-4% a Espanya	POMGNT1	Rara
CLRN1	≤1%	PRCD	≤1%
CNGA1	1%-2%	PROM1	≤1%
CNGB1	≤1%	RBP3	≤1%
CRB1	6%-7% a Espanya	RGR	≤1%
CYP4V2	≤1%	RHO	≤1%
DHDDS	≤1%	RLBP1	≤1%
DHX38	≤1%	RP1	≤1%
EMC1	≤1%	RPE65	2%-5%
EYS	10%-30% a Espanya. Comú a Xina	SAG	2%-3% al Japó
FAM161A	≤1%	SPATA7	≤1%
HGSNAT	≤1%	SLC7A14	Rara
IDH3B	≤1%	TRNT1	Rara
IFT140	≤1%	TTC8	≤1%
IFT172	≤1%	TULP1	≤1%
IMPG2	≤1%	USH2A	10%-15%; també causa Síndrome Usher tipus 2
KIAA1549	Rara	ZNF408	≤1%
KIZ	Rara	ZNF513	≤1%
LRAT	≤1%		

Taula 3: gens associats a xIRP no sindròmica. Fahim *et al.*, 2004-2017

Gen	Dades freqüència
OFD1	Rara
RP2	10%-20%
RPGR	70%-90% ³

Les variants patogèniques en el gens *RPGR* (també anomenat *RP3*) i *RP2*, són les causes més comunes de xIRP. Estudis de lligament suggereixen que entre el 70-

90% de xLRP es troben al gen *RPGR* i entre el 10-20% al gen *RP2* (Vervoort *et al.*, 2000). Dins del gen *RPGR* hi ha un exó, ORF15, on es troben la major part de mutacions (Mears *et al.*, 2000; Rozet *et al.*, 2002; Sharon *et al.*, 2003)

Una dada a tenir en compte és que el 15% d'homes amb RP, que són casos esporàdics o simples, tenen una variant patogènica al gen *RPGR* (Branham *et al.*, 2012), i generalment presenten una simptomatologia de RP d'aparició primerenca i greu.

La patologia retiniana en dones amb xLRP, generalment és molt menys severa que en homes; a diferència de la adRP, que afecta ambdós sexes per igual. Això és degut a que les dones heterozigotes per una variant patogènica d'un gen de xLRP, poden no ser afectes, o bé, poden expressar des d'una lleugera a una severa degeneració retiniana (Souied *et al.*, 1997). Moltes famílies amb xLRP, que tenen dones afectades, poden ser confoses amb una herència adRP.

1.2.2- Diagnòstic molecular de la RP

La tecnologia NGS (Next Generation Sequencing) ha suposat un gran avanç a nivell de la biologia molecular, ja que permet un diagnòstic molecular molt més ràpid i beneficiós a nivell cost-efectiu (Metzker 2010). Això queda reflectit en el temps que es triga en diagnosticar una malaltia, sobretot en aquelles que presenten una gran variabilitat fenotípica i genètica, com és el cas de la RP; i que a més contenen un gran nombre de gens associats (Neveling *et al.*, 2012; Audo *et al.*, 2012). En el cas de la RP, el diagnòstic molecular que es realitzava al Unitat de Genètica Molecular de l'hospital de Terrassa, consistia únicament en l'estudi de la adRP, detectant alteracions de seqüència mitjançant DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) i seqüenciant per Sanger tots els gens més comuns d'aquesta forma de malaltia, exó per exó (Gamundi *et al.*, 2006; Gamundi *et al.*, 2007). Això requeria molt de

temps fins que s'arribava a la seqüenciació del gen causant; i conseqüentment, uns costos elevats.

La NGS és una tècnica d'alt rendiment basada en la seqüenciació massiva i en paral·lel de molècules de DNA obtingudes per amplificació clonal, a partir de molècules individuals fixades sobre un suport sòlid. En funció de la plataforma utilitzada, la NGS pot generar milers lectures, des de megabases fins a gigabases, en un únic assaig, i detecta variants molt minoritàries (fins al 1%). Aquesta seqüenciació massiva i en paral·lel permet analitzar varies mostres a la vegada (Pareek *et al.*, 2011). El gran avantatge que ofereix aquest tipus de tecnologia, és la capacitat que té per produir un gran volum de dades en poc temps i amb un cost relativament baix. Hi ha diferents tipus de plataformes, cada una d'elles amb diferents protocols de preparació de llibreries (Myllykangas 2011), diferent mecanisme químic de seqüenciació i diferents formes d'obtenció d'imatges. Totes elles han d'anar acompanyades d'un sistema bioinformàtic que s'encarregui del processament, alineament i assamblatge dels milers de seqüències obtingudes.

El sistema de seqüenciació que s'utilitzi en cada cas, dependrà del tipus de malaltia a estudiar:

Estudis directes sobre un únic gen

- Es recomana seqüenciació Sanger quan la malaltia es produeix per mutacions específiques produïdes en un únic gen; com per exemple la Acondroplasia (gen *FGFR3*) (Heuertz *et al.*, 2006), o el Síndrome Nail-Patella (gen *LMX1b*) (Millá *et al.*, 2007)
- Anàlisi més específic amb una tecnologia determinada com: estudis d'expansions de triplets en malalties tipus Síndrome X-fràgil o Huntington (Blanco *et al.*, 2008); MLPA (Multiplex Ligation Amplification Probe) en

malalties com les Distròfies musculars de Duchenne o Becker (Ji *et al.*, 2015); o estudis de metilació en malalties com el Síndrome de Prader Willi o Angelman (Pangkanon 2003).

Panells de seqüenciació dirigits: aquests van dirigits a malalties amb gran heterogeneïtat genètica.

- Una determinada malaltia, que presenta gran quantitat de gens que poden ser causants per tenir la mutació. *Ex:* Retinosi pigmentària, càncer familiar (Hernán *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017), etc
- Diferents tipus de trastorns dins d'una mateixa patologia que requereixen un diagnòstic diferencial. *Ex:* miocardiopaties, epilèpsies, RASopaties, etc

Exoma: estudi dirigit a la recerca de nous gens candidats a una determinada malaltia, en la qual l'estudi de panells de seqüenciació massiva no ha detectat cap mutació ni variant en els gens coneguts (de Sousa Dias *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015). Consisteix en la seqüenciació de totes les seqüències codificants (exons), i també de les regions flanquejants als exons on es puguin trobar mutacions de *splicing* que afectin al processament final de la proteïna.

Aquest últim sistema encara requereix del desenvolupament d'estratègies d'anàlisi més eficients, en quant a les diferències de cobertura i a la interpretació de resultats.

Aquest avanços en la seqüenciació han facilitat el diagnòstic molecular de moltes malalties genètiques, com les distròfies de retina, que es caracteritzen per gran variabilitat clínica i una elevada heterogeneïtat genètica. La suma de les mutacions atribuïdes a les formes sindròmiques i les no-sindròmiques és superior a 200 gens (<https://sph.uth.edu/retnet/>). I només en el cas de la RP, hi ha mutacions descrites en més de 60 gens. De manera que les tecnologies NGS, suposen una gran aproximació per a la identificació de mutacions (Weisschuh *et al.*, 2016). Actualment

a la Unitat de Genètica Molecular de l'Hospital de Terrassa, el diagnòstic molecular de la RP i algunes altres formes sindròmiques, s'inicia per seqüenciació en panell dirigit; i en cas que no es trobi la mutació causant en cap dels gens coneguts, s'aplica el WES (Whole Exome Sequence) a les famílies no diagnosticades, per a la recerca de nous gens candidats.

1.3- Processament o *splicing* de pre-mRNA

Un dels descobriments més importants dins la biologia molecular va ser la discontinuïtat del DNA en cèl·lules eucariotes (Maquat 1996; Sharp PA. 2005; Krainer 2015). La informació genètica que codifica per les proteïnes està disposada en *exons* (segments que codifiquen per proteïnes), que es troben al llarg del genoma separats per *introns* (regions no codificants) (Sharp PA, 2005). Un dels passos essencials en l'expressió gènica és el processament, o *splicing* del pre-mRNA. Aquest pas es dona entre la transcripció i la traducció del DNA i té lloc al nucli cel·lular. Consisteix en l'eliminació d'introns i unió dels exons, donant lloc a la molècula de RNA madur, que serà el que un cop exportat al citoplasma, es traduirà donant lloc a la proteïna final. Aquest *splicing* és dut a terme per una estructura complexa anomenada *spliceosoma*, la funció del qual consisteix en un cicle d'acoblament, reacció de *splicing*, i desacoblament (Will & Lührmann, 2011) . Està format per 5 subunitats de ribonucleoproteïnes o snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*): U1 i U2, les quals són les encarregades de reconèixer els punts de tall i d'unió; i U4/U6/U5, que són el *core* catalític i realitzen el tall i l'acoblament (Wahl *et al.*, 2009; Will & Lührmann, 2011). Els llocs de reconeixement del *spliceosoma* són els senyals intrònics de *splicing*, que consisteixen en una sèrie de seqüència determinada de bases als extrems 5' i 3' dels introns que determinen els

punts de tall; i el *branch point*, que és una seqüència intrònica que es troba a 20-50bp del lloc de *splicing* 3', on s'hi uneix la snRNP U2 del *spliceosoma*.

Cadascuna de les diferents snRNPs estan formades per l'associació de diferents tipus de proteïnes, entre les quals es troben els factors de processament del pre-mRNA o PRPFs.

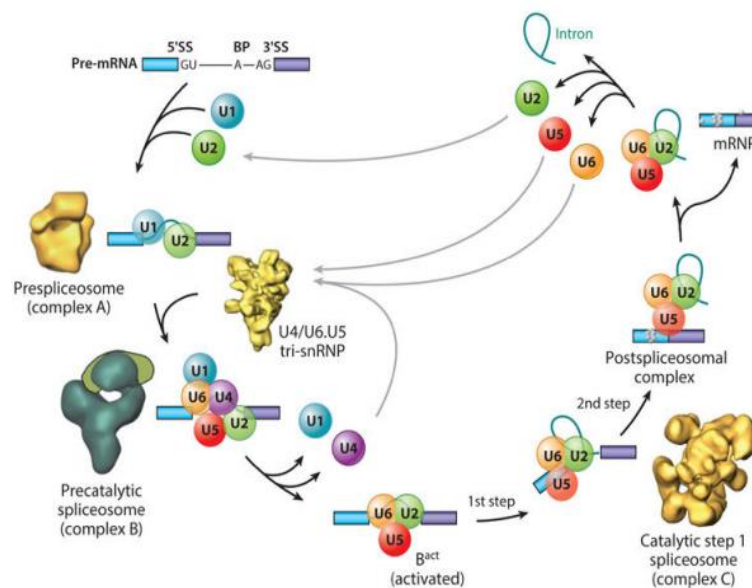


Figura 7: Cicle d'acoblament i desacoblament del *spliceosoma*

L'esquema mostra com s'uneixen les diferents snRNPs a diferents etapes per tal de eliminar l'intró d'un pre-mRNA que conté dos exons (blau i lila). Abreviatures: SS(splice site). BP (branch point) [De: Lee and Rio 2015]

Els llocs de reconeixement del *spliceosoma* són crítics per a que el procés de *splicing* es doni de forma correcta (Wang *et al.*, 2006) A més dels senyals intrònics 5', 3' i *branch point*, en el processament de mRNA també poden intervenir altres seqüències reguladores que actuen tant a nivell d'exons com d'introns, que s'anomenen elements reguladors del *splicing* o SRE (*splicing regulatory elements*). Trobem els ESE (*exonic splicing enhancers*) i ESS (*exonic splicing silencers*), que són seqüències que en funció de la seva localització promouen o inhibeixen la

inclusió de l'exó en el qual es troben (Wang & Burge, 2008); i els ISE (*intronic splicing enhancers*) i ISS (*intronic splicing silencers*), que són seqüències que augmenten o inhibeixen la utilització de llocs de *splicing* o exons, des d'una localització intrònica. Les característiques d'aquestes seqüències poden ajudar a la predicció funcional d'aquests elements en seqüències de RNA (Wu *et al.*, 2005).

La major part dels exons del genoma eucariota són constitutius, de manera que el RNA madur conté tots els exons del pre-mRNA. Però moltes vegades el procés de *splicing* no és constitutiu, si no que, pot donar lloc a models de traducció alternatius generant múltiples RNAs madurs procedents del mateix precursor. D'això se'n diu ***splicing alternatiu***, essent el procés que dóna lloc a la gran diversitat de proteïnes i isoformes, amb diferents característiques químiques i biològiques.

Dins els mecanismes de *splicing* alternatiu es troben:

- eliminació d'exó (*exon skipping*)
- retenció de l'intró
- ús alternatiu del lloc de *splicing*, que pot ser a 3' o a 5'

Al genoma humà el processament alternatiu de pre-mRNA té lloc en el 95% dels seus gens; donant lloc a l'expansió de la gran quantitat de formes i funcions del proteoma (Nilsen *et al.*, 2010; Irimia *et al.*, 2012). Una altra funció del *splicing* alternatiu és la regulació post-transcripcional de l'expressió genètica; ja que durant els processos es pot introduir un codó de terminació en una determinada isoforma, donant lloc a la seva degradació per la via NMD (Nonsense Mediated Decay) (Lareau *et al.*, 2007). La funció principal del NMD és la reducció d'errades que es produeixen durant l'expressió genètica mitjançant l'eliminació de mRNAs madurs que contenen algun codó de terminació prematur, el qual produiria una mutació nonsense.

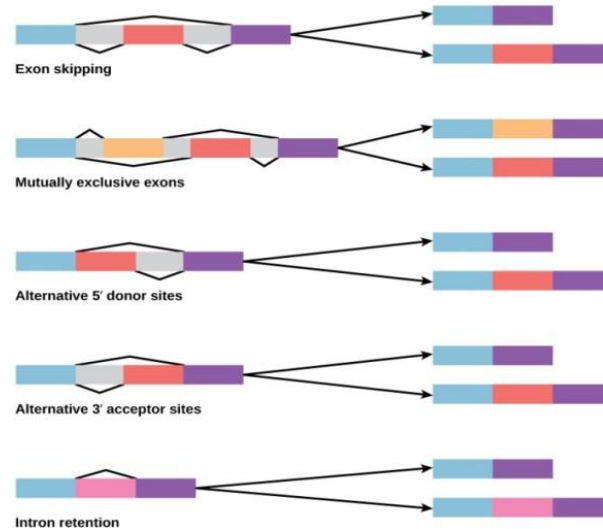


Figura 8: Mecanismes de *splicing* alternatiu

A l'esquerra el pre-mRNA i a la dreta el mRNA resultant després del processament.
[De: Shannon McDermott. General Biology Part I - Mixed Majors 2017]

El processament del pre-mRNA és un pas essencial per la correcta expressió gènica, per tant, qualsevol mutació o alteració que destorbi aquest procés pot derivar a defectes del funcionament cel·lular, donant lloc a una malaltia. Les mutacions de *splicing* són molt importants en malalties hereditàries; ja que algunes mutacions descrites com a silencioses, són de fet, mutacions que tot i no afectar l'inici de la traducció del DNA, poden afectar al processament final de mRNA donant lloc a una proteïna aberrant (Novoyatleva *et al.*, 2006; Ward & Cooper, 2010). Aquestes mutacions poden causar una malaltia de forma directa, o bé poden modificar la severitat o el fenotip d'aquesta.

Hi ha dos tipus de mutacions que afecten al processament d'RNA:

- mutacions en cis: són mutacions que afecten les seqüències de pre-RNA que intervenen en el correcte processament: 5'donador, 3'acceptor, *branch point*, ESEs. ESSs, ISEs i ISSs . Aquestes afecten al gen portador de la mutació donant lloc a: disrupció del *splicing* constitutiu, alteració *splicing* alternatiu donant lloc a una proporció d'isoformes incorrecta, retenció d'introns o salt d'exons que facin aberrant

la proteïna resultant, o fins i tot, donant lloc l'aparició d'un codó de terminació prematur, i conseqüentment la degradació de la proteïna per NMD. També poden haver-hi polimorfismes que es trobin en zones codificants, però que afectin de forma directa a llocs de reconeixement, provocant la disrupció o creació d'ESEs i/o ESSs (Pagani *et al.*, 2004). Un exemple de mutació d'aquest tipus són les trobades als llocs potenciadors de *splicing* exònics dels gens de susceptibilitat al càncer de mama *BRCA1* i *BRCA2* (Fackental *et al.*, 2002). Altre exemple de malaltia provocada per aquest tipus de mutació és l'atròfia muscular espinal provocada per mutacions al gen *SMN1* i *SMN2*, que provoquen un salt de l'exó 7, i això fa variar la unió dels elements potenciadors o silenciadors del *splicing* (Sossi *et al.*, 2001; Cartegni & Krainer 2002; Qu *et al.*, 2016)

La RP també ve causada per mutacions en *cis* d'alguns gens, com *RHO* (Martinez-Gimeno *et al.*, 2000; Tanner *et al.*, 2009)

- mutacions en *trans*: són aquelles mutacions que es troben sobre les seqüències de DNA que donen lloc a les proteïnes i complexes moleculars (snRPNs) que intervenen en el processament de RNA. De manera que aquestes mutacions no únicament afecten al fragment d'ADN que les conté, si no que també afecten al correcte funcionament de la maquinària de *splicing*. És per això, que degut a aquestes mutacions, també es poden veure afectats múltiples gens. Els components del *spliceosoma* són essencials pel correcte desenvolupament cel·lular, per tant, mutacions en els gens que codifiquen per aquests components poden donar lloc a malalties molt greus o ser letals. Dins d'aquest tipus de mutacions, n'hi ha que interrompen el correcte acoblament i unió de les diferents snRPN spliceosomals. Com a exemple de malalties causades per aquest tipus de mutacions hi ha l'atròfia muscular espinal (SMA) i la retinosi pigmentaria (RP) (Faustino & Cooper 2003). La SMA, és una malaltia autosòmica recessiva en la qual el gen que mutat és el *SMN1*. Aquest és un gen que s'expressa de forma

ubiqua, però que únicament afecta de forma específica a les motoneurons. Tot i que la funció específica de la proteïna es desconeix, se sap que intervé en el correcte acoblament de les diferents snRNPs per formar l'spliceosoma (Dujardin *et al.*, 2016)

1.4- PRPFs i retinosi pigmentària autosòmica dominant

En els últims anys, s'han arribat a associar a adRP no sindròmica fins a 26 gens (taula 1), la major part d'ells relacionats amb la bioquímica i estructura de la retina. Però 8 d'ells són causants de la malaltia degut a mutacions en elements trans-*splicing*, ja que són gens que codifiquen pels components del *core* del *spliceosoma* (*PRPF3*, *PRPF4*, *PRPF6*, *PRPF8*, *PRPF31*, *snRNP200/Brr2*), o altres factors de *splicing* (*RP9*, *DHX38*) (Růžičková & Staněk, 2017). Tots ells són gens essencials que s'expressen de forma ubiqua a totes les cèl·lules de l'organisme, però només donen patologia a nivell de retina (Huranova *et al.*, 2009; Tanackovic *et al.*, 2011; Korir *et al.*, 2014; Linder *et al.*, 2014)

Aquests gens relacionats amb el procés de *splicing* codifiquen per proteïnes que formen part del complex U4/U6·U5 tri-snRNP, que és el component principal del procés. No s'han trobat mutacions associades a RP que es trobin a les proteïnes U1 i U2 (Růžičková & Staněk, 2017). Els gens *PRPF3*, *PRPF4* i *PRPF31* codifiquen per proteïnes que són components de U4 snRNP (Maita *et al.*, 2005) i *snRNP200/Brr2*, *PRPF6* i *PRPF8* codifiquen per proteïnes que formen la subunitat U5 snRNP (Liu *et al.*, 2006; Krausová & Stanek, 2017). *RP9* o *PAP-1* és un factor de transcripció, mutacions en el qual, causen adRP per alteració del procés de *splicing* a nivell de retina (Keen *et al.*, 2002; Maita *et al.*, 2004) i *DHX38* o *PRP16* és

un altre factor de transcripció, mutacions en el qual han estat associades a arRP (Ajmal *et al.*, 2014).

El fet que aquests gens siguin altament conservats des del punt de vista evolutiu, explica la importància que té el processament de mRNA pel correcte desenvolupament dels organismes. El mecanisme pel qual les mutacions en aquests gens donen lloc a l'aparició de malaltia a nivell de retina, encara es desconeix.

El gen *PRPF8* és homòleg del factor de processament del pre-mRNA del *prp8* de llevat. Es localitza a la regió cromosòmica 17p13, al locus RP13. És una de les proteïnes nuclears més gran. Consta de 2335 aminoàcids, traduïda de 42 exons. És una proteïna altament conservada que roman al centre del *spliceosoma* formant part del la subunitat U5 (Růžicková & Staněk, 2017). Aquesta subunitat forma a la vegada, el complex tri-snU4/U6-U5, què és el complex més important en el processament de pre-mRNA. Gairebé totes les mutacions en aquest gens que provoquen adRP es troben localitzades a l'exó 42, que és l'extrem C-terminal. (McKie *et al.*, 2001; Martínez-Gimeno *et al.*, 2003). Tot i que també hi ha una descrita a l'exó 38 (Towns *et al.*, 2010).

El per què les mutacions en els PRPFs, que són essencials en totes les cèl·lules de l'organisme causen patologia específica d'òrgan, com és el cas de la retina, és encara desconegut. Les cèl·lules de retina expressen elevades quantitats de components del *spliceosoma*, la qual cosa implica la gran demanda de procés de *splicing* d'aquest tipus cel·lular (Tanackovic *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2011).

En el cas específic del *PRPF8*, hi ha estudis *in vitro* amb mutacions homòlogues en *Saccharomyces cerevisiae* que mostren que, els mutants de Prp8-RP causen defectes en l'acoblament i activació del *spliceosoma* degut a la interrupció del tri-snRNP (Boon *et al.* 2007; Mozaffari Jovin *et al.* 2014). Altres estudis sobre models

de RP en llevats, mostren que la transició entre el primer i segon pas catalític del procés de *splicing* és veu afectada per mutacions en *RP-Prp8* (Mayerle & Guthrie, 2016). També s'han fet estudis *in vitro* sobre línies cel·lulars mutades (procedents de limfoblasts de pacients) en diferents factors de *splicing*, que mostren events de retenció d'introns (Tanackovic *et al.*, 2011). Altres resultats obtinguts en models de ratolí amb mutacions en *PRPF3* i *PRPF8* són defectes en la funció fagocítica de les cèl·lules RPE, i suggereixen que les cèl·lules RPE són les primeres afectades degut a mutacions en factors de *splicing* (Grazzioto *et al.*, 2011). En models de *C.elegans* amb mutacions en *PRPF8* s'han obtingut resultats que donen suport a la hipòtesi que, mutacions en PRPFs que provoquen inestabilitat genòmica en cèl·lules amb elevada activitat transcripcional, contribuint a l'activació de la mort cel·lular programada o apoptosi (Rubio-Peña *et al.*, 2015)

1.5- Reprogramació i diferenciació cel·lular com a model de diferents malalties

La reprogramació de cèl·lules somàtiques humanes cap a un estat pluripotent i la posterior diferenciació a cèl·lules somàtiques específiques, permet la creació de models de malalties específiques per pacient (Ebert *et al.*, 2012). La creació d'aquests models permetrà conèixer els mecanismes patogènics de les malalties, per poder realitzar assajos farmacològics i toxicològics.

El primer pas per disposar d'aquests models de malaltia generats al laboratori, consisteix en re-programar cèl·lules del pacient per obtenir iPSCs (*induced pluripotent stem cells*). Aquestes cèl·lules pluripotents es poden obtenir a partir de fibroblasts humans adults, mitjançant la utilització d'uns factors determinats (Takahashi *et al.*, 2007). Aquests factors de reprogramació, són factors de transcripció que s'introdueixen a les cèl·lules mitjançant la transfecció amb

retrovirus: Oct4/4, Sox2, c-Myc i Klf4 (Takahashi i Yamanaka, 2006). Les iPSCs també poden ser induïdes a partir de limfoblasts de sang perifèrica, la qual cosa, evita la biòpsia del teixit (El Hokayem *et al.*, 2016).

Les iPSCs tenen característiques molt semblants a les ESCs (cèl·lules mare embrioniques): creixen en colònies amb morfologia similar; requereixen medis per créixer sobre *feeders* (font d'alimentació) amb bFGF (factor de creixement de fibroblast); i poden patir diferenciació espontània a les cèl·lules centrals de la colònia. Un cop s'obtenen iPSCs, aquestes s'han de caracteritzar, comprovant els següents aspectes:

- Desaparició dels gens virals de reprogramació
- Expressió de marcadors de pluripotència: marcadors antigènics de superfície característics que es poden detectar per immunocitoquímica. Aquests són: SSEA4, TRA 1-81. Altres marcadors de pluripotència són els factors de transcripció característics de la pluripotència (que no s'expressen en cèl·lules diferenciades o específiques de teixit): NANOG, SOX2, DPPA2, TERT, etc
- Activitat fosfatasa alcalina elevada
- Capacitat de formar teratomes *in vivo* i que aquests teratomes continguin teixits derivats de les 3 capes germinals: endoderma, mesoderma i ectoderma.
- El cariotip i l'empremta genètica han de romandre intactes, idèntics a les cèl·lules somàtiques de procedència.

En funció del tractament que rebin les iPSCs, aquestes es diferenciaran en les cèl·lules específiques d'interès per la malaltia en estudi.

En aquest treball, les cèl·lules a obtenir són cèl·lules de RPE. Amb aquestes cèl·lules específiques obtingudes a partir de pacients que contenen una mutació

determinada, es poden obtenir cèl·lules *in vitro* com a model de la malaltia. Aquests models cel·lulars permeten l'estudi del mecanisme patogènic d'una determinada mutació, els tractaments farmacològics i en última instància, la teràpia gènica a través de l'edició genètica. (Wiley *et al.*, 2015; Ovando-Roche *et al.*, 2017).

Objectius

2.- OBJECTIUS

- Desenvolupament i validació d'un panell de gens associats a distròfies de retina no sindròmiques, per a la detecció de variants genètiques mitjançant NGS. Aplicació del panell en la rutina assistencial del laboratori per al diagnòstic molecular de distròfies de retina hereditàries.
- Obtenció i anàlisi d'exomes complets (WES) en famílies amb retinosi pigmentària autosòmica dominant (adRP), per a la determinació de nous gens associats a la malaltia.
- Obtenció de cèl·lules pluripotents a partir d'una biòpsia de pell d'un pacient d'adRP amb mutació en el factor de processament de pre-mRNA *PRPF8*. Diferenciació de les cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSCs) obtingudes, a cèl·lules de epitel·li pigmentari retinià (RPE).
- Aproximació al mecanisme patogènic de la adRP provocada per la mutació en *PRPF8*. Obtenció i anàlisi de transcriptomes de fibroblasts i cèl·lules RPE, per al posterior estudi d'expressió diferencial entre pacient i control.

Material i mètodes

3.- MATERIAL I MÈTODES

3.1.- Pacients i famílies estudiades

Els pacients que s'estudien al laboratori procedeixen del servei d'oftalmologia amb un diagnòstic de distròfia de retina. L'estudi clínic que es realitza consta d'un examen oftalmològic i un examen electro-fisiològic.

Tots aquells pacients que són diagnosticats de distròfies de retina, ja sigui de forma esporàdica com heretada, són enviats a fer-se una extracció de sang, per al posterior estudi genètic molecular. En el cas de famílies amb diversos membres afectats, es recomana l'extracció de sang tant de sans com afectes, per poder fer l'estudi familiar. Les mostres que s'estudien procedents d'altres centres, venen acompanyades dels informes e històries clíniques corresponents. De tots els pacients estudiats, es va obtenir el corresponent consentiment informat.

Per a la detecció de nous gens candidats, s'estudien un total de 4 famílies, a les quals ja se'ls ha analitzat prèviament els diferents gens candidats per NGS; i no s'ha trobat cap mutació nova ni existent, que pugui causar la malaltia. A més dels casos índex, també s'han estudiat altres individus de la família, per tal d'elaborar arbre genealògic i verificar el tipus d'herència.

3.2- Obtenció i quantificació de mostres

3.2.1- Extracció d'àcids nucleics: DNA i RNA

L'extracció d'DNA es realitza automàticament a partir dels limfòcits que conté la mostra de sang perifèrica. Es realitza amb el Magna Pure Compact Instrument (Roche, Barcelona); segons el protocol del fabricant: Magna Pure Compact Nucleic Isolation Kit I (Roche).

L'extracció de RNA a partir de cultius primaris de fibroblasts i cèl·lules de RPE es realitza amb RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguint les instruccions del fabricant.

3.2.2- Quantificació àcids nucleics

Quantificació espectrofotomètrica UV

La concentració d'àcids nucleics es realitza mitjançant espectroscòpia ultraviolada (UV). Les mesures de densitat òptica UV es realitzen amb Epoch Microplate Spectrophotometer amb el Take3 Multi-Volume Plate (Izasa) d'acord amb les especificacions del fabricant.

Quantificació fluorimètrica

Per la quantificació d'àcids nucleics s'ha fet servir el sistema Quantifluor® dsDNA System (Promega, Madrid) , que utilitza una molècula fluorescent d'unió al DNA de doble cadena, permetent així la quantificació de petites quantitats de DNA en solució. Com que aquesta molècula s'intercala entre la doble cadena, no s'uneix al DNA de cadena senzilla, augmentant l'especificitat per quantificar la doble cadena d'DNA.

Aquest sistema requereix el Quantifluor™-ST Handheld Fluorometer; aparell que permet seleccionar la longitud d'ona òptima d'absorció i emissió del fluorescent, i així mesurar les RFU (unitats de fluorescència relativa) de les mostres i els patrons.

Les mostres d'DNA son sempre quantificades en relació a una corba estàndard feta amb el DNA de referència inclòs al kit.

3.2.3- Control qualitat dels àcids nucleics

Un dels aspectes més crítics per obtenir una seqüenciació òptima, és la qualitat e integritat del DNA que s'ha de seqüenciar. És per això, que abans d'enviar la mostra a seqüenciar, es comprova la seva integritat, corrent 3-4µL de mostra en un gel d'agarosa al 1%. A més, també es mira la qualitat del DNA mesurant l'absorbància a 260/280nm a l'Epoch™Microplate Spectrophotometer (Izasa). Els valors admesos es troben entre 1.6-1.8 per DNA i 2.0 per RNA.

La qualitat del RNA extret tant de fibroblasts com de cèl·lules RPE s'avalua amb Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent technologies), segons instruccions del fabricant.

3.3- Panell de captura per Distròfies de retina

3.3.1- Disseny del panell

Els gens continguts al panell de seqüenciació de distròfies de retina, entre les quals es troba la RP, es seleccionen de la base de dades RetNet (<https://sph.uth.edu/retnet/>). El disseny del panell es realitza mitjançant el sistema SureSelect DNA Design Report (Agilent). Les sondes es basen en la seqüència de referència *H.sapiens*, hg19, GRCh37, febrer2009. El panell consta de 107 gens resolts en 1633 regions (taula 4). El número total de sondes són 10353, que cobreixen 309828 Kpb, amb una densitat 2x. Aquestes sondes cobreixen els exons d'interès i regions flanquejants de 10 parell de bases més, tant a 5' com a 3'. Aquests gens són tant de adRP, arRP, xIRP, com d'alguns tipus de RP sindròmica, com per exemple, el *USH2A*.

Taula 4: gens continguts al panell de captura.

Amb les regions per cada gen i el percentatge de cobertura.

HGNC	Regions	Coverage	HGNC	Regions	Coverage
<i>ABCA4</i>	52	100%	<i>OPA3</i>	3	100%
<i>ADAM9</i>	23	100%	<i>PDE6A</i>	22	100%
<i>AIPL1</i>	7	100%	<i>PDE6B</i>	22	100%
<i>ARL2BP</i>	6	100%	<i>PDE6C</i>	22	100%
<i>ARL3</i>	6	100%	<i>PDE6G</i>	4	100%
<i>ARL6</i>	7	100%	<i>PDE6H</i>	3	100%
<i>ATF6</i>	16	100%	<i>PITPNM3</i>	21	100%
<i>BEST1</i>	10	100%	<i>PRCD</i>	6	100%
<i>C1QTNF5</i>	2	100%	<i>PRDM13</i>	4	100%
<i>C8orf37</i>	6	100%	<i>PROM1</i>	29	97,226%
<i>CA4</i>	8	100%	<i>PRPF3</i>	15	100%
<i>CACNA1F</i>	48	100%	<i>PRPF31</i>	13	100%
<i>CACNA2D4</i>	40	100%	<i>PRPF4</i>	14	100%
<i>CDHR1</i>	18	100%	<i>PRPF6</i>	21	100%
<i>CERKL</i>	16	100%	<i>PRPF8</i>	42	100%
<i>CFH</i>	23	100%	<i>PRPH2</i>	3	100%
<i>CHM</i>	16	98,305%	<i>RAB28</i>	10	100%
<i>CNGA1</i>	9	90,85%	<i>RAX2</i>	2	100%
<i>CNGA3</i>	8	100%	<i>RB1</i>	27	100%
<i>CNGB1</i>	33	100%	<i>RBP3</i>	4	100%
<i>CNGB3</i>	19	97,213%	<i>RDH12</i>	7	100%
<i>CNNM4</i>	7	100%	<i>RDH5</i>	4	100%
<i>CRB1</i>	14	100%	<i>RGR</i>	8	100%
<i>CRX</i>	3	100%	<i>RHO</i>	5	100%
<i>CYP4V2</i>	11	100%	<i>RIMS1</i>	38	100%
<i>DHDDS</i>	10	94,877%	<i>RLBP1</i>	7	100%
<i>DRAM2</i>	8	100%	<i>ROM1</i>	3	100%
<i>EFEMP1</i>	11	100%	<i>RP1</i>	3	100%
<i>ELOVL4</i>	6	100%	<i>RP1L1</i>	3	100%
<i>EYS</i>	44	99,478%	<i>RP2</i>	5	100%
<i>FAM161A</i>	9	93,778%	<i>RP9</i>	7	100%
<i>FSCN2</i>	5	100%	<i>RPE65</i>	14	100%
<i>FZD4</i>	2	100%	<i>RPGR</i>	20	80,84%
<i>GNAT2</i>	8	100%	<i>RPGRIP1</i>	26	97,955%
<i>GUCA1A</i>	4	100%	<i>SAG</i>	16	100%
<i>GUCA1B</i>	4	100%	<i>SEMA4A</i>	14	100%
<i>GUCY2D</i>	18	100%	<i>SLC7A14</i>	7	100%
<i>HK1</i>	23	96,743%	<i>SNRNP200</i>	47	100%
<i>HMCN1</i>	107	100%	<i>SPATA7</i>	18	94,263%
<i>IDH3B</i>	14	100%	<i>SPP2</i>	7	100%

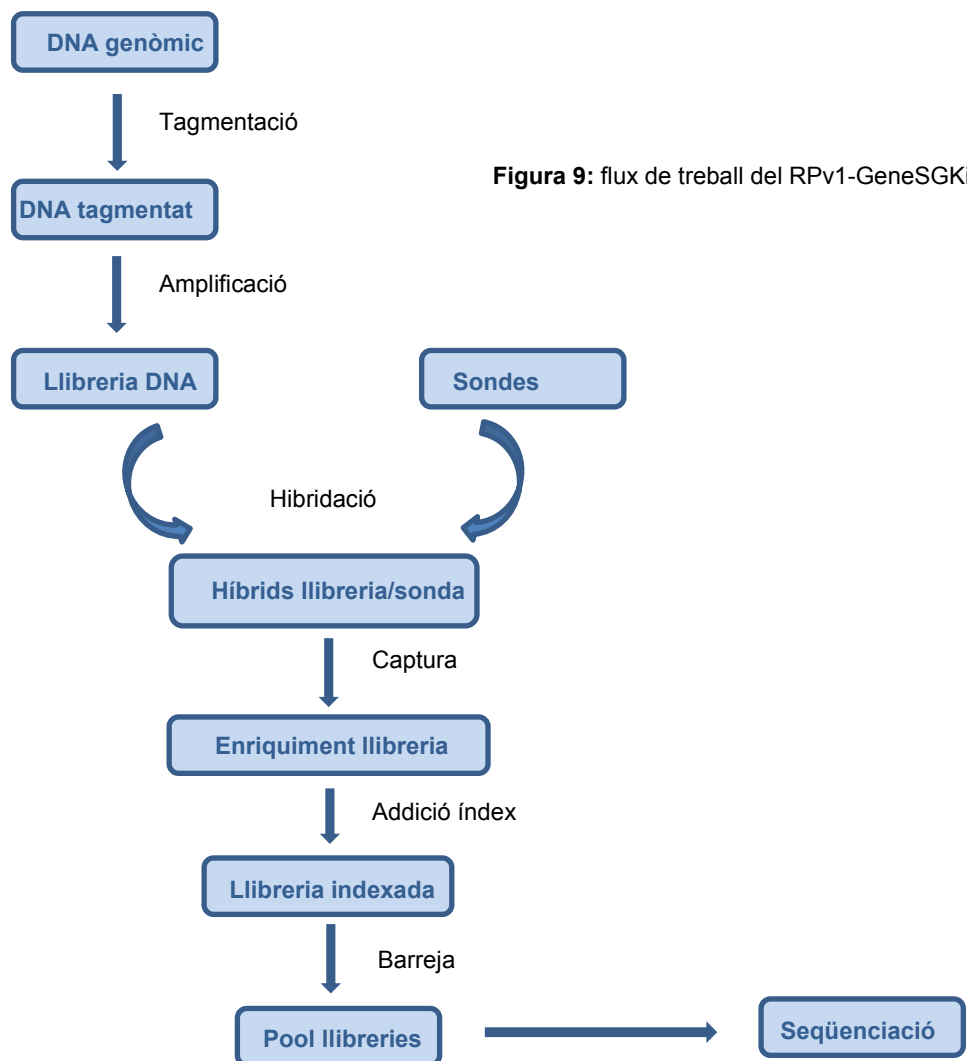
<i>IMPDH1</i>	17	100%	<i>TIMM8A</i>	3	100%
<i>IMPG1</i>	19	98,834%	<i>TIMP3</i>	5	100%
<i>IMPG2</i>	19	100%	<i>TMEM126A</i>	4	100%
<i>KCNV2</i>	2	100%	<i>TOPORS</i>	3	100%
<i>KIZ</i>	13	100%	<i>TSPAN12</i>	8	100%
<i>KLHL7</i>	15	100%	<i>TTC8</i>	18	91,864%
<i>LRAT</i>	2	100%	<i>TTLL5</i>	35	100%
<i>LRP5</i>	25	100%	<i>TULP1</i>	15	100%
<i>MAK</i>	16	100%	<i>UNC119</i>	6	100%
<i>MERTK</i>	20	100%	<i>USH2A</i>	76	100%
<i>NR2E3</i>	8	100%	<i>VCAN</i>	14	100%
<i>NRL</i>	2	100%	<i>ZNF408</i>	5	100%
<i>OFD1</i>	24	100%	<i>ZNF513</i>	4	100%
<i>OPA1</i>	32	100%			

3.3.2- Protocol captura: preparació llibreria i seqüenciació

El protocol de captura es realitza segons les instruccions del fabricant SGKits de Sistemas Genómicos: Rpv1-GeneSGKit[®]. Aquest kit conté reactius per l'anàlisi de 12 mostres.

Es parteix de 25ng/μL de DNA de cada una de les mostres a analitzar; i el procediment s'inicia per la tagmentació, que és una única reacció realitzada per un enzim recombinasa, on es produeix fragmentació i unió d'adaptadors als extrems dels fragments obtinguts. Després es purifiquen els fragments tagmentats amb les boles magnètiques Ampure XP[®] beads; i es segueix amb l'amplificació de la llibreria i posterior purificació. Seguidament es passa a la validació de la llibreria. Per l'avaluació de la quantitat i qualitat del DNA, s'utilitza 1 μL de cada llibreria i per fer electroforesi capil·lar en xip de DNA 1K a la plataforma Experion[™] (Bio Rad), segons instruccions del fabricant. Un cop cada una de les llibreries és validada, es realitza la hibridació amb les sondes de captura de les regions diana del kit del panell; i després es captura amb boles magnètiques cobertes d'estreptavidina. Després s'indexa cada llibreria unint una seqüència de nucleòtids específica (índex)

per mostra; de manera que un cop identificades cada una, ja es poden barrejar. Abans de fer la barreja, cal tornar a validar la llibreria al Experion™. Per últim, es determina la concentració de la llibreria amb el sistema Quantifluor® dsDNA System (Promega, Madrid) i es barregen en igual quantitats per arribar a una concentració final del pool de 4nM. S'envia el pool a Sistemas Genómicos, on realitzaran la seqüenciació a la plataforma MySeq (Illumina). El pool es sotmet a un procés d'amplificació clonal (generació de clústers) i les reaccions per obtenir seqüències de 100ntds x 2 (*Paired-end*) són dutes a terme pel seqüenciador MySeq (Illumina).



3.4- Estudi d'exomes mitjançant Whole Exome Sequence (WES)

3.4.1- Protocol captura: preparació llibreria i seqüenciació

La seqüenciació de l'exoma complert la realitza Sistemas Genómicos. La captura de l'exoma es realitza segons el sistema SureSelect All Human Enrichment Target Exon (Agilent). La llibreria (500ng de DNA) s'hibriditza amb les sondes de captura i s'elimina el material genètic no hibridat. Els fragments capturats s'amplifiquen amb 10 cicles de PCR i es purifiquen mitjançant AMPure XP® beads. La qualitat de la llibreria enriquida s'avalua amb el 2100 Bioanalyzer i High Sensitivity DNA-kit (Agilent). Els fragments lligats amb l'adaptador es quantifiquen per qPCR utilitzant el KAPA SYBR FAST library quantification kit per Illumina Genome Analyzer (KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA). Una solució d'1pM de la llibreria es posa a seqüenciar a la plataforma HiSeq2000, seguint instruccions del fabricant.

Les mostres que s'envien per a l'estudi de l'exoma són DNAs de com a mínim 2 pacients i 1 individu sa, de les famílies de RP no resoltes.

Per al procés de seqüenciació, les llibreries es sotmeten a un procés d'amplificació clonal, i les reaccions per obtenir seqüències de 100ntds x 2 (*Paired-end*) són dutes a terme pel seqüenciador HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA, USA) seguint les instruccions del fabricant. L'estimació de la qualitat de les dades resultants, es basa en els paràmetres obtinguts pel software de seqüenciació.

3.5- Anàlisi de dades

L'anàlisi de dades després de la seqüenciació es realitza a Sistemas Genómicos i és exactament igual, tant en seqüenciació dirigida per panells, com per WES.

3.5.1- Avaluació qualitat de les dades en cru

De manera semblant a la seqüenciació Sanger, les plataformes de NGS generen uns valors de probabilitat d'error per base, que s'anomenen valors de qualitat. Aquests valors venen donats en escala tipus Phred (Ewing *et al.*, 1998a, 1998b), la qual indica que un valor de 20 dóna lloc a una probabilitat que 1 de cada 100 lectures d'aquella base és incorrecta. L'estudi global dels valors de qualitat dóna informació de la qualitat de la seqüenciació en general.

Es creen 3 gràfics diferents per cada grup de lectures de cada mostra:

- 1) Per la qualitat de seqüència de base: qualitat de la distribució de les bases al llarg de totes les bases llegides
- 2) Pel contingut de seqüència de base: nucleòtids continguts al llarg de totes les bases
- 3) Per puntuació de la qualitat de la seqüència: distribució de la puntuació de qualitat a totes les seqüències

3.5.2- Avaluació de l'alineament de lectures i l'enriquiment de dianes

Les lectures s'alineen i es comparen amb la versió de referència humana GRCh37/hg19. Aquest alineament es realitza mitjançant BWA (Burrow-Wheeler Aligner) i scripts personalitzats. Després de mapar les lectures, s'ha de filtrar qualsevol seqüència que pugui introduir alguna variació i/o soroll de fons en els passos següents. Les lectures de baixa qualitat i les seqüències marcades com a duplicats de PCR són eliminades de l'arxiu BAM obtingut després del mapeig.

A més, en aquest punt, també s'avalua la cobertura general de la mostra i la eficiència de la combinació de les dues estratègies (sistema d'enriquiment de la diana + plataforma NGS). Per a aquesta avaluació es calculen 3 paràmetres:

- 1) Distribució de la profunditat al llarg de les regions diana
- 2) Percentatge de les bases diana cobertes amb una profunditat d'1, 10 i 20; per cada cromosoma
- 3) Percentatge de les lectures de regions diana respecte el número total de lectures mapades.

Els processos de filtració es realitzen mitjançant l'ús de Picard-tools (<http://picard.sourceforge.net/>) i SAMtools (Li *et al.*, 2009). Per la mesura de la cobertura i l'avaluació de l'enriquiment de regions diana s'utilitzen scripts propis.

3.5.3- Identificació de variants

El procés d'identificació de variants s'anomena "*variant calling*". Aquesta identificació es realitza a partir de la informació extreta dels alineaments de les lectures. Així, aquells desajusts trobats entre una lectura i el genoma de referència són més profundament estudiats, per tal de poder identificar variants reals.

El *variant calling* es realitza mitjançant la combinació de dos algorismes: VarScan (Koboldt *et al.*, 2009) i GATK (Flicek *et al.*, 2012). Els scripts utilitzats van ser desenvolupats per Sistemes Genòmics per combinar i filtrar variants. Les variants identificades s'anoten utilitzant la base de dades Ensembl (Flicek *et al.*, 2012). Aquesta base de dades (<http://www.ensembl.org/>) conté informació de la major part de variants humanes com: dbSNP, the HapMap project, the 1000genomes project, COSMIC, etc.

Les variants identificades es classifiquen en funció de la seva posició o efecte en els transcripts afectats, de la següent manera:

- **splice_donor_variant:** variant de splicing que varia la regió de 2 bases a l'extrem 5' d'un intró
- **splice_acceptor_variant:** variant de splicing que varia la regió de 2 bases a l'extrem 3' d'un intró
- **stop_gained:** variant en la seqüència que provoca almenys una variació en una de les bases del codó i el resultat del canvi dóna lloc a l'aparició d'un codó stop prematur, i per tant, un transcrit més curt
- **frameshift_variant:** variant en la seqüència que causa una disrupció en marc de lectura degut a que el nombre de nucleòtids inserits o delecionats no és múltiple de tres.
- **stop_lost:** variant en la seqüència en la que almenys una base del codó stop canvia, donant lloc a un transcrit més llarg
- **initiator_codon_variant:** variant en un codó que canvia almenys una de les bases del primer codó del transcrit
- **inframe_insertion:** variant no sinònima que implica una inserció d'un número de bases que és múltiple de tres; mantenint-se el marc de lectura
- **inframe_deletion:** variant no sinònima que implica una delecio d'un número de bases que és múltiple de tres; mantenint-se el marc de lectura
- **missense_variant:** variant de seqüència que resulta un canvi en una o més bases, donant lloc a una seqüència d'aminoàcid diferent, però preservant la longitud del transcrit
- **transcript_amplification:** amplificació d'una regió que conté un transcrit
- **splice_region_variant:** variant de seqüència en la que el canvi ha tingut lloc dins la regió de el lloc de splicing, tant a les bases 1-3 de l'exó, com a les bases 3-8 de l'intró.
- **incomplete_terminal_codon_variant:** variant de seqüència en la que almenys canvia una base del codó final d'un transcrit anotat e incomplet
- **synonymous_variant:** variant en la seqüència que no dóna lloc a cap canvi en l'aminoàcid codificat
- **stop_retained_variant:** variant en la seqüència on almenys una de les bases del codó stop varia, però el codó resultant roman sent stop
- **coding_sequence_variant:** variant de seqüència que fa variar la seqüència codificant
- **mature_miRNA_variant:** variant en el transcrit localitzada dins la seqüència del miRNA madur
- **5prime_UTR_variant:** variant en la regió 5'UTR
- **3prime_UTR_variant:** variant en la regió 3'UTR

- **intron_variant:** variant al transcrit dins de la seqüència d'un intró
- **NMD_transcript_variant:** variant en un transcrit que fa que sigui diana del sistema NMD
- **non_coding_exon_variant:** variant de seqüència que canvia la seqüència d'un exó no codificant
- **nc_transcript_variant:** variant al transcrit d'un RNA no codificant
- **upstream_gene_variant:** variant de seqüència localitzada a l'extrem 5' d'un gen
- **downstream_gene_variant:** variant de seqüència localitzada a l'extrem 3' d'un gen
- **TFBS_ablation:** variant en la qual la regió delecionada inclou el lloc d'unió a un factor de transcripció
- **TFBS_amplification:** variant en la qual la regió amplificada inclou el lloc d'unió a un factor de transcripció
- **TF_binding_site_variant:** variant de seqüència localitzada dins la seqüència del lloc d'unió d'un factor de transcripció
- **regulatory_region_variant:** variant de seqüència localitzada en una regió reguladora
- **regulatory_region_ablation:** variant en la qual la regió delecionada inclou una regió reguladora
- **regulatory_region_amplification:** variant en la qual la regió amplificada inclou una regió reguladora
- **feature_elongation:** variant de seqüència que causa una extensió en la seqüència genòmica respecte la de referència
- **feature_truncation:** variant de seqüència que causa una reducció en la seqüència genòmica respecte la de referència
- **intergenic_variant:** variant de seqüència localitzada en una regió intergènica (entre dos gens)

3.5.4- Predicció conseqüències mutació

Dels diferents programes bioinformàtics desenvolupats per predir la patogenicitat de les variants missense, els tres algoritmes que s'utilitzen són:

- PolyPhen (Polimorphism Phenotyping): eina que prediu el possible impacte d'una substitució d'un aminoàcid, en l'estructura i funció d'una proteïna;

utilitzant la física directa i consideracions comparatives (Adzhubei *et al.*, 2010).

- SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant): algoritme que prediu si un aminoàcid afectarà la funció de la proteïna, basant-se en la homologia de seqüència i les propietats físiques dels aminoàcids (Ng *et al.*, 2001, 2002, 2003, 2006; Kumar *et al.*, 2009). Aquesta eina es basa en el grau de conservació dels residus d'aminoàcids en alineaments de seqüència derivats de seqüències molt properes agafades del PSI-BLAST.
- Condel: mètode per avaluar el resultat d'una SNV no sinònima utilitzant una puntuació consens de patogenicitat. Combina diferents eines com: Mutation assessor (eina que prediu l'impacte funcional d'un canvi d'aminoàcid a la proteïna) i FATHMM (servidor web d'alt rendiment que prediu les conseqüències funcionals de variants no codificants i les codificants no sinònimes)

Totes aquestes dades venen donades a la plataforma GeneSystems (Sistemas Genómicos). La plataforma dona una gran quantitat de dades, i disposa d'una sèrie de filtres que es van utilitzant en funció de la recerca: si és un panell de RP o bé és un exoma per a la recerca de nous gens candidats.

Search Browser Help

2944122 Variants v3.1.5

Stats Genes Variants Report

Summary All Variants

Gene Filter Custom Filters Predefined Filters Sessions Export Help

Gene	Gene ID	Chr	Position	Ref	Var	2944122	Depth	Var/Depth	HGVSc
EMC1	28957	chr1	19240387	C	T	P_Homo_var	161	1.0	
EMC1	28957	chr1	19240387	C	T	P_Homo_var	161	1.0	ENST00000375199.7:c.696G>A
EMC1	28957	chr1	19240387	C	T	P_Homo_var	161	1.0	ENST00000375208.7:c.630G>A
RP1-43E13.2		chr1	19240387	C	T	P_Homo_var	161	1.0	ENST00000437898.1:n.190C>T
EMC1	28957	chr1	19240387	C	T	P_Homo_var	161	1.0	ENST00000467423.1:n.318G>A
EMC1	28957	chr1	19240387	C	T	P_Homo_var	161	1.0	ENST00000477853.5:c.696G>A
EMC1	28957	chr1	19240387	C	T	P_Homo_var	161	1.0	
ABCA4	34	chr1	94005519	A	G	P_Homo_var	143	1.0	ENST00000370225.3:c.6069T>C
ABCA4	34	chr1	94005519	A	G	P_Homo_var	143	1.0	ENST00000465352.1:n.485T>C
ABCA4	34	chr1	94005519	A	G	P_Homo_var	143	1.0	ENST00000484388.1:n.183T>C
ABCA4	34	chr1	94005519	A	G	P_Homo_var	143	1.0	ENST00000536513.5:c.2445T>C
ABCA4	34	chr1	94030427	C	T	P_Hetero	139	0.547	ENST00000370225.3:c.4352+1G>A
ABCA4	34	chr1	94030427	C	T	P_Hetero	139	0.547	

HGVSc	HGVSp	Variant Effect	DBNLVar DB	Existing Va
		downstream_gene_variant	chr1_19240387:C>T	Ra:E Ra:N
ENST00000375199.7:c.696G>A	ENST00000375199.7:c.696G>A(p.=)	synonymous_variant	chr1_19240387:C>T	Ra:E Ra:N
ENST00000375208.7:c.630G>A	ENST00000375208.7:c.630G>A(p.=)	synonymous_variant	chr1_19240387:C>T	Ra:E Ra:N
ENST00000437898.1:n.190C>T		non_coding_transcript_exon_variant non_coding_transcript_variant	chr1_19240387:C>T	Ra:E Ra:N
ENST00000467423.1:n.318G>A		non_coding_transcript_exon_variant non_coding_transcript_variant	chr1_19240387:C>T	Ra:E Ra:N
		downstream_gene_variant	chr1_19240387:C>T	Ra:E Ra:N
ENST00000477853.5:c.696G>A	ENST00000477853.5:c.696G>A(p.=)	synonymous_variant	chr1_19240387:C>T	Ra:E Ra:N
		downstream_gene_variant	chr1_19240387:C>T	Ra:E Ra:N
ENST00000370225.3:c.6069T>C	ENST00000370225.3:c.6069T>C(p.=)	synonymous_variant	chr1_94005519:A>G	Ra:E Ra:N
ENST00000465352.1:n.485T>C		non_coding_transcript_exon_variant non_coding_transcript_variant	chr1_94005519:A>G	Ra:E Ra:N
ENST00000484388.1:n.183T>C		non_coding_transcript_exon_variant non_coding_transcript_variant	chr1_94005519:A>G	Ra:E Ra:N
ENST00000536513.5:c.2445T>C	ENST00000536513.5:c.2445T>C(p.=)	synonymous_variant	chr1_94005519:A>G	Ra:E Ra:N
ENST00000370225.3:c.4352+1G>A		splice_donor_variant	chr1_94030427:C>T	Ra:E Ra:N
		upstream_gene_variant	chr1_94030427:C>T	Ra:E Ra:N

20 rows 1 to 20 of 1261 Next →

sistemas genómicos Copyright © 2017 Sistemas Genómicos, S.L. All rights reserved. Legal Notice (EN)

Figura 10: imatges a mode exemple de la informació continguda en la plataforma GeneSystems amb la que es fan les anàlisis genètiques.

Les fletxes marquen les diferents pestanyes i filtres que es poden anar utilitzant en funció del tipus d'estudi.

3.5.6- Estudi variants panell captura

A partir de la plataforma GeneSystems, on es penjen els resultats obtinguts de tota la seqüenciació, es baixa en format excel, l'arxiu que conté les variants totals trobades. I a partir d'aquest full de càlcul, els primers filtres que es realitzen són:

- Selecció de les formes canòniques dels gens on es troben variants
- Selecció de totes aquelles variants que estiguin en una freqüència en la població inferior a l'1%

3.5.7- Estudi de variants per la detecció de gens candidats (WES)

L'estudi d'exomes es realitza com a mínim a 2 individus afectes i 1 un individu sa de cada família. A partir de totes les dades obtingudes, es filtren totes aquelles variants que son comuns als malalts i que l'individu sa no les conté; ja que aquesta és la condició que s'ha de complir per tal que s'hereti de forma autosòmica dominant.

De les 1500-2000 variants resultants de l'exoma de cada família, s'estudien les diferents variants; i s'apliquen diversos criteris per seleccionar quines d'aquestes podrien ser les variants causants de la malaltia. Aquests criteris propis són els següents:

- Variant que aparegui en els individus malalts i no en el sa
- Variant que provoqui un efecte greu tipus: frameshift, missense, inserció, deleció, regions essencials de splicing
- La variant ha de ser nova, o bé una variant genètica amb una freqüència a la població inferior al 1% (0.01)
- Es revisa la funcionalitat del gen on es troba:
 - *expressió a ull o retina?
 - *funcionalitat específica d'altre tipus cel·lular?
 - *variant descrita i/o associada a altres malalties

3.6- Estudi segregació variants candidates

3.6.1- Disseny oligos/primers

Es selecciona l'exó i les regions flanquejants dels gens d'interès, i es dissenyen oligonucleòtids que permetin l'amplificació d'aquella regió mitjançant PCR.

El disseny dels oligonucleòtids per l'amplificació es realitza mitjançant la utilització del programa Primer Blast que es troba a www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/

3.6.2- Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa, s'amplifiquen totes aquelles regions del genoma seleccionades amb els oligos dissenyats. En funció d'aquests oligos i de la mida d'amplicó, la temperatura d'unió del primer variarà.

La reacció estàndard es realitza en un volum de 50 µL i els reactius utilitzats són:

	Volum	Conc.final
Tampó de reacció (10x)	5 µL	1x
MgCl ₂ (50mM)	1,5 µL	1.5mM
Mescla dNTPs (10mM)	1 µL	0.2mM
Primers F/R (25 µM)	1 µL	0.5 µM
DNA polimerasa (5U/ µL)	0.5 µL	2.5 unitats
DMSO (si cal)	2.5 µL	5 %
DNA motlle	2 µL	10pg-1 µg
Aigua destil·lada	qsp 50 µL	

El programa d'amplificació utilitzat al termociclador és:

1. Pre-incubació "Hot start" a 95°C, 5 minuts
 2. Desnaturalització a 95°C, 30 segons
 3. Anellament primer X°C, 30 segons
 4. Extensió, a 72°C, 30seg/1min
 5. Extensió final 72°C 5minuts
- } 35 cicles

Els primers utilitzats per a l'amplificació dels fragments que contenen les variants a estudiar, la mida de cada un dels fragments i les condicions d'amplificació es troben a l'annex 1 (Annexos)

3.6.3- Electroforesi en gel d'agarosa

L'electroforesi en gel d'agarosa s'utilitza per visualitzar i separar molècules de DNA segons la seva mida. El percentatge d'agarosa dependrà de la resolució necessària; i la dissolució es realitza en tampó TAE 1x (40mM Tris, 20mM àcid acètic i 1mM EDTA)

Taula 5: Resolució de DNA lineal en gel d'agarosa

Quantitat agarosa % (p/v)	Resolució òptima per molècules de DNA lineal (kb)
0.6	1.0-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

Un cop el gel ha solidificat es fica a la cubeta d'electroforesi; i als diferents pous del gel, es carreguen 5-10 µL de mostra barrejada amb tampó de càrrega; i 5 µL de marcador de pes molecular (100bp o 1Kb).

Es connecta la cubeta a una font de voltatge entre 80-100 volts, i un cop s'aconsegueix la separació desitjada de les bandes, es visualitzen amb un transil·luminador UV. La visualització és possible gràcies al SYBR Safe DNA Gel Stain; molècula que s'uneix al DNA i emet a 530nm aproximadament.

3.6.4- Purificació del producte de PCR

Quan s'ha comprovat per electroforesi que el fragment amplificat és el correcte, es purifica el producte de PCR a partir de l'obtingut després de l'amplificació. El procés es realitza amb un sistema de purificació en columna: High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). I es segueixen les recomanacions descrites pel fabricant.

3.6.5- Seqüenciació automàtica dels productes de PCR (Sanger)

Els productes de PCR purificats s'envien a Stabvida (Oeiras, Portugal), per la seva seqüenciació directa amb el seqüenciador 3730XL ABI DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilitzant el Big dye terminator V1.1 DNA sequencing kit, i els primers corresponents.

Els resultats son analitzats amb el software FinchTV V1.4.0 (Geospiza, Seattle, WA, USA)

3.6.6- Seqüenciació directa de l'exó 5 del gen *RHO*

Per l'estudi de la possible deleció de l'exó 5 de la Rodopsina, es realitza una PCR que amplifica els exons 4 i 5 d'aquest gen. El primer forward utilitzat conté una cua M13 per la posterior seqüenciació. La mix de PCR està descrita a l'apartat 1.6; i les condicions de la reacció són: T^a anellament 60°C, 1 minut d'amplificació i sense DMSO. Els primers són:

M13_RHO-4F: 5'-CGACGGCCAGTTCACGGCTCTGAGGGTCCA-3'

RHO-5AS: 5'-CGCCTGTGCAGAATGAACGAACT-3'

3.6.7- Seqüenciació directa de la regió ORF 15 del gen *RPGR*

La regió ORF15 del gen *RPGR* és una seqüència molt repetitiva de purines (adenina i guanina) que per seqüenciació massiva no queda ben coberta. Per poder llegir-la es realitza seqüenciació directa segons el protocol descrit a Ruddle *et al.*, 2009.

Els primers utilitzats per l'amplificació d'un fragment de 1706bp i els primers de seqüenciació més interns estan descrits a la taula 6.

Taula 6: primers d'amplificació ORF15 (F/R) i primers interns per seqüenciació

primer	Seqüència
ORF15-F	5'-GTATGATTTTAAATGTGATCGCTTGTTCAGAG-3'
ORF15-R	5'-AAGGCATTTAAATTGTCTGACTGGCCATAATC-3'
624-F	5'-AGGAGAGGAAGAAGGAGACC-3'
746-F	5'-AAGAGGAAGAGGAGGAGGGT-3'
110-R	5'-TCCTCCTCTTCCCCCTCCA-3'
1326-R	5'-CTTCCACCTCCCCTTCCACTT-3'

Les condicions de PCR per a l'amplificació són les descrites a l'apartat 3.1.6; amb una fase d'extensió d'1,5 minuts i una temperatura d'anellament de 56°C.

3.6.8- Estudi de lligació de marcadors cromosoma 8:

Realització haplotip

Els marcadors utilitzats per fer l'estudi de lligació en el cromosoma 8, s'han escollit a partir de la taula de les variants totals resultants de l'exoma realitzat a la família RPN89. A partir de la variant candidata inicial, s'han escollit una sèrie de SNPs d'elevada freqüència, i algunes variants genètiques de freqüències a la població <1%; que es troben a diferents distàncies: des de 400 megabases fins a 54 kilobases de la variant candidata inicial.

Taula 7: SNPs utilitzats i dades de freqüència en la població.

En verd, variants candidates

GEN	Variant	Freqüència
<i>RIPK2</i>	rs39499	44%
<i>SPAG1</i>	rs16898015	20%
<i>CSMD3</i>	rs10095093	42%
<i>TBC1D31</i>	rs4871346	41%
TG	rs1403487	9%
	rs1403488	9%
<i>COL22A1</i>	rs72727816	6%
<i>AGO..2</i>	no rs	<1%
<i>TOP1MT</i>	rs79138102	<1%
<i>NRBP2</i>	rs112234503	<1%
<i>KIFC2</i>	no rs	<1%
	no rs	<1%
<i>ARHGAP39</i>	rs873884	46%
<i>ARHGAP39</i>	rs2721161	40%
<i>ARHGAP39</i>	rs13275065	40%
<i>ZNF517</i>	rs367866008	1%
<i>ZNF7</i>	rs1735169	46%
<i>ZNF250</i>	rs1209850	48%

Per a cada variant, es dissenyen oligonucleòtids per amplificar un fragment d'entre 200-500 parells de bases que les continguin. El disseny dels primers per l'amplificació es realitza mitjançant la utilització del programa Primer Blast que es troba a www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/. Després s'amplifica per PCR, es purifica i s'envia a seqüenciar (segons apartats 3.1.5 fins a 3.1.9) Cada un d'aquests polimorfismes es mira a tots els individus de la família, tan sans com afectes i així elaborar l'haplotip.

3.7- Anàlisi de la variant c.307G>A en gen COL6A6 mitjançant FRET

Al trobar una variant genètica possible candidata a ser causant de la malaltia en una determinada família, s'estudia aquesta variant en una mostra de població més gran. S'agafen 120 individus afectes de la malaltia sense diagnosticar i 200 individus sans. Aquest estudi es realitza mitjançant PCR a temps real basant-nos en la transferència d'energia per ressonància de fluorescència (FRET).

Els primers i sondes utilitzades per a l'estudi la variant c307G>A (p.Gly103Arg) en el gen COL6A6 són: forward, 5'-CCT GGC CCA GTA CAG TGA TAA A-3'; reverse 5'-GGG GAA ACT GTT TCT TGT CTC TC-3'; mut sensor probe, 5'-TGG ATT CAT TGG CAG GTC CC-FL-3'; i anchor probe, LC640-GCA GAT AGG AAA GGC TCT TCA GGA GGC T-p (sintetitzades per Tib Molbiol, Berlin, Germany). L'assaig de PCR a temps real es realitza al LightCycler 480 II (Roche), segons les instruccions del fabricant.

3.8- Assaig MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

L'assaig MLPA permet la quantificació simultània i relativa del nombre de còpies de DNA, facilitant la detecció de delecions o duplicacions en les mostres de DNA.

Els kits per a la realització d'aquests assajos són específics per determinats gens, o regions cromosòmiques. El kits utilitzats són: SALSA[®] MLPA[®] Probemix P235-B2 Retinitis Pigmentosa (MRC-Holland) i SALSA[®] MLPA[®] Probemix P-014 B1 Chromosome 8 (MRC-Holland). El procediment per a la realització de la tècnica s'ha seguit segons les instruccions del fabricant:

- 1) Selecció de mostra problema i de referència (amb número de còpies normal) i preparació solucions a 20ng/μL
- 2) Desnaturalització del DNA 5min a 98°C

- 3) Refredar a 25°C i afegir *hybridisation master mix* (segons protocol)
- 4) Incubar 1min a 95°C i hibridació 16-20h a 60°C
- 5) Reacció lligació a 54°C 15 minuts; seguida d'inactivació lligasa i tornada a 20°C
- 6) Reacció de PCR amb una única parella de primers que amplificarà totes les sondes de diferent longitud.
- 7) Els productes s'analitzen per electroforesi capil·lar, i les pèrdues o guanys de material genètic s'identifiquen per anàlisi de fragments, comparant la quantitat relativa de cada sonda (àrea del pic) amb una mostra de referència. Per aquest anàlisi de fragments s'utilitza el programa Coffalyser.net.

La probemix de MLPA de RP únicament analitza les duplicacions/deleccions en 4 gens causants de retinosi: *PRPF31*, *RHO*, *IMPDH1* i *RP1*.

3.9- Obtenció d'induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)

3.9.1- Cultiu primari de fibroblasts

Es realitza una biòpsia de pell a la pacient i a un individu control. Per l'obtenció de la mostra, van ser necessaris els consentiments informats d'ambdós individus. La biòpsia de pell obtinguda en condicions estèrils, tant de la pacient com de l'individu control, es col·loquen en un tub cònic de 15ml amb medi de cultiu de fibroblasts, per transportar-los a temperatura ambient. Un cop al laboratori es canvia el medi sota campana per PBS amb 10x penicil·lina/estreptomicina (500U/ml penicil·lina i 500µg/ml estreptomicina) i 10x Fungizone (25µg/ml amfotericina B) i es deixa a T^a ambient durant 15 minuts. Aquest procediment es repeteix 2 cops, i per últim es neteja amb PBS durant 15 minuts. Després, les biòpsies són tallades en petites peces i cultivades en plaques de petri de 60mm (8-10 peces/placa) amb DMEM

(Invitrogen) que conté 10% FBS (Gibco), 2mM GlutaMAX (Invitrogen), 1x Penicilina-Streptomicina (Invitrogen). Es cultiven a 37°C i 5% CO₂. Quan després de 3-4 setmanes els fibroblasts cobreixen la major part de superfície de la placa; es passen i es cultiven en flascons de 75cm². Després es van fent passes per obtenir més quantitat i per guardar mostres criopreservades en nitrogen líquid.

3.9.2- Reprogramació de fibroblasts per obtenció d'iPSCs

El protocol d'experimentació present en aquest estudi va ser aprovat pel Comitè ètic d'investigació i Comissió de seguretat, segons ho pauta el marc legal espanyol.

La generació de hiPSCs (Lukovic *et al.*, 2017) s'ha fet a Sevilla, al Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER); en col·laboració amb la Dra. Dunja Lukovic, utilitzant un virus Sendai no integratiu (Cyto Tune- iPS 2.0 reprogramming Kit, Life Technologies), segons instruccions del fabricant. Aquest kit conté els factors de reprogramació humans: Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4; els quals són factors de transcripció capaços de re-programar cèl·lules somàtiques cap a iPSCs.

La cèl·lules obtingudes a partir dels fibroblasts de la pacient (línia cel·lular RP2-FIPS4F1) es van fer créixer sobre superfície de fibroblasts de prepuci humà (ATCC CRL 2429) irradiat (45Gy): *feeder*. El medi de creixement conté KO DMEM, KSR 20%, Glutamax 2mM, aminoàcids no essencials 0.1mM, β-mercaptoetanol 0.23mM, basic FGF 10ng/mL, penicil·lina/estreptomicina. Es van fent passatges cada 6-8 dies.

Després de 30 dies se'n comencen a formar colònies amb un creixement i morfologia semblant a les cèl·lules embrionàries (forma poligonal, eixos refractaris, elevat ratio nucli/citoplasma). La seqüenciació del DNA d'aquestes colònies permet

confirmar el manteniment de la mutació en un dels al·lels de *PRPF8*, per assegurar-nos que no hi ha hagut canvis durant la seva replicació.

3.9.3- Caracterització iPSCs i avaluació de la pluripotència

A) Eliminació gens virals

La eliminació dels transgens del Sendai virus es comprova per RT-PCR als passatges 8-10. Per aquesta detecció, l'RNA s'extreu amb RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguint les instruccions del fabricant. Després és tractat amb DNase I, per tal d'eliminar qualsevol fragment d'DNA genòmic que pugui contaminar. Les cèl·lules que s'estan re-programant (dia 7) s'utilitzen com a control positiu; i una reacció sense RNA, com a control negatiu. La PCR es realitza utilitzant 500ng de cDNA en presència de MyTaq DNA Polymerase (Bioline), amb els paràmetres descrits pel manual. Els primers per la RT-PCR estan descrits a la taula 7 (apartat G). Els productes de PCR s'analitzen en un gel d'agarosa al 2%.

B) Immunocitoquímica

Les cèl·lules són rentades amb PBS fred i fixades amb PFA 4% durant 15 minuts. Un cop les cèl·lules estan fixades, es renten 2 cops amb PBS i es submergeixen a la solució bloquejant (sèrum de cabra o ruc al 3% + Triton-X100 0.5% en PBS) durant 1h. Després són incubades tota la nit a 4°C amb un dels següents anticossos: anti-NANOG de conill (1:400, Cell Signaling), anti-OCT4 (1:400, Cell Signaling), anti-SOX2 de conill (1:400, Cell Signaling) i anti-SSEA4 de ratolí (1:400, BD Pharmingen).

Al següent dia, les cèl·lules son rentades 3 cops amb PBS i incubades amb un segon anticòs (1:500, Invitrogen). Després de la incubació amb l'anticòs secundari,

les cèl·lules són tenyides amb DAPI (Life Technologies, 1:1000), i rentades 3 cops més amb PBS. Les mostres tenyides sobre plaques de petri són visualitzades al microscopi de fluorescència LM600.

Per la tinció de cèl·lules vives amb TRA-1-81 (StainAlive, Stemgent) es van utilitzar cultius sense fixació, segons les instruccions del fabricant.

C) Assaig teratoma

Per aquest assaig, es tallen de forma mecànica les colònies d'una placa de 6 pous que estigui molt confluent, i són re-suspeses en medi hiPSCs i Matrigel (BD). La suspensió s'injecta de forma subcutània a la part dorsal d'un ratolí SCID nude (Severe Combined Immuno Deficiency i sense pèl) de 5 setmanes. Després de 8 setmanes, es formen teratomes d'1cm de diàmetre i són extirpats. Es fixen en PFA al 4% durant 3 dies, i es renten 3 cops amb PBS. Es seccionen per la meitat per observar de forma macroscòpica la presència de quists. Després les mostres són deshidratades utilitzant 70-80-95% etanol i xilol; es tracten amb parafina, i es fan talls continus de 6 μ . Es fan les preparacions i es visualitzen al microscopi òptic.

D) Anàlisi cariotip

Per analitzar la integritat del genoma de les hiPSCs, es fan créixer sobre medis de cultiu feeder-free com el mTeSR1 medium. Després de 2 passatges, les cèl·lules són analitzades per G-banding amb 400-550 band resolution (Biobanco de Sistema Sanitario Público, Granada)

E) Fingerprinting

El DNA microsatèl·lit, també anomenat SSR o STR (Simple Sequence Repeat y Short Tandem Repeat), són seqüències de DNA en les quals un fragment; la mida del qual pot variar entre 2 i 6 parells de bases; es repeteix de forma consecutiva.

Aquesta variació en el nombre de repeticions, i no en la seqüència, crea diferents al·lels. Poden crear una empremta o perfil genètic; i gràcies a aquesta capacitat, s'utilitzen com a marcadors moleculars per estudi de poblacions o herència.

Per realitzar aquest estudi, s'extreu DNA genòmic tant de fibroblasts com de hiPSCs amb el QIAamp DNA Blood mini kit (Quiagen) en presència de RNase (Roche). Aquest anàlisi el realitza Biobanco de Sistema Sanitario Público; amb el kit de Promega de 10 marcadors de microsatèl·lits: TH01, TPOX, vWA, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818 i D21S11; Amelogenin); i l'aparell Abi PRISM 3130 utilitzant GeneMapper (Thermo Fisher)

F) Seqüenciació mutació

S'extreu DNA genòmic tant de fibroblasts com de hiPSCs amb el QIAamp DNA Blood mini kit (Quiagen); segons instruccions del fabricant. Els primers utilitzats per l'amplificació i la seqüenciació directa de la mutació en *PRPF8* (c.6974_6994del21bp) són:

Forward: 5'-GATAGCAGTAGGGATAAGGTGAG-3'

Reverse: 5'-GCTGAAGCAGGAGGCAGGGAAAC -3'

G) Detecció marcadors de pluripotència per RT-PCR

Es tallen de forma mecànica les colònies d'hiPSCs i es seleccionen per centrifugació. L'RNA total és extret amb el RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany) seguint el protocol del fabricant; i tractat amb DNaseI per eliminar qualsevol contaminació d'DNA genòmic. S'utilitza el QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) per portar a terme la síntesi cDNA a partir d'1 µg d'RNA, segons protocol del fabricant. La PCR es realitza utilitzant 500ng de cDNA en presència de MyTaq DNA Polymerase (Bioline), amb els paràmetres descrits pel

manual. El nivell d'expressió dels marcadors de pluripotència s'analitza amb els primers descrits a la taula 8.

Taula 8: primers per RT-PCR utilitzats per detectar el genoma i transgens del SeV (ombrejats en gris) i els marcadors de pluripotència

Primer	Forward 5'3'	Reverse 5'3'	Annealing (°C)	Size (bp)
SeV	GGATCACTAGGTGATATCGAGC	ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC	55	181
KOS	ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC	ACCTTGACAATCCTGATGTGG	55	528
Klf4	TTCCTGCATGCCAGAGGAGCCC	AATGTATCGAAGGTGCTCAA	55	410
c-Myc	TAACTGACTAGCAGGCTTGTCTG	TCCACATACAGTCCTGGATGATGATG	55	532
NANOG	CCAAATTCTCTGCCAGTGAC	CACGTGGTTTCCAAACAAGAAA	60	260
OCT4	AAGCCCTCATTTACCAGG	CTTGGAAGCTTAGCCAGGTC	60	165
SOX2	TCACATGTCCCAGCACTACC	CCCATTTCCCTCGTTTTTCT	60	137
TERT	TGGCTGCGTGGTGAACCTG	CCAGTCTCACCTTCAACCGC	60	205
FGF4	CTACAACGCCTACGAGTCCTACA	CAACTCTGACTTTTCTGGTGCAAC	60	371
REX1	CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT	TCTGGACTTTAATTTGCGTACGC	60	306
GDF3	CTTATGCTACGTAAGGAGCTGGG	AACTTCCGGGACCTGGGTTGGCAC	65	631
DPPA2	CCGTCCCCGCAATCTCCTTCCATC	CACCGGGAGCCATGTTGGCATCAT	65	606
GAPDH	ATCGTGGAAGGACTCATGACCACA	CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT	60	463

H) Tinció alcalina fosfatasa

L'activitat de l'enzim alcalina fosfatasa és molt més elevada cèl·lules mare o pluripotents, que en cèl·lules diferenciades. La seva detecció es realitza mitjançant un assaig colorimètric i la tinció es duu a terme amb el Alkaline Phosphatase Staining Kit II (Stemgent, MA)

3.9.4- Diferenciació i caracterització de cèl·lules RPE

El procés de diferenciació des de iPSCs a cèl·lules específiques de RPE, es realitza *in vitro* segons Lukovic *et al.*, 2015. Les colònies d'iPSCs, tant de control com de pacient, es desfan de forma mecànica i es cultiven en plaques amb inclinació, per afavorir la formació d'agregats flotants en un medi de cultiu amb 15% KSR, i sense bFGF. Quan es formen taques fosques sobre els agregats, aquestes s'extirpen, es tracten amb tripsina i es cultiven sobre plaques de cultiu cobertes de Matrigel (BD).

Depenent de la confluència, entre 3-5 setmanes més tard, monocapes de cèl·lules amb característiques de RPE (forma poligonal i pigmentació) comencen a aparèixer. Les cèl·lules RPE es van cultivant durant 30-60 dies més, fins que adquireixen una elevada pigmentació.

Per comprovar que la diferenciació s'ha donat de forma correcta i caracteritzar les cèl·lules, s'analitzen una sèrie de marcadors específics de cèl·lules RPE: *BEST1*, *CRALBP*, *RPE65* i *MERTK*. Aquest anàlisi es realitza mitjançant qRT-PCR i immunocitoquímica, sobre cèl·lules iPSCs i cèl·lules RPE derivades d'iPSCs.

3.9.5- Anàlisi transcriptoma i expressió diferencial: RNAseq

Qualitat de la seqüenciació RNA

L'experiment es realitza sobre el RNA extret de 12 mostres: 6 del pacient amb RP (3 procedents de fibroblasts, i 3 procedents de cèl·lules RPE obtingudes per diferenciació d'iPSCs) i 6 de control sa (3 de fibroblasts i 3 de cèl·lules RPE). Aquest anàlisi es realitza al Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC BioIT Unit), a Madrid en col·laboració amb el grup de genòmica de la Dra. Ana Dopazo.

La obtenció de les dades de la seqüenciació de RNA s'obtenen pel protocol de seqüenciació massiva *single-end* (plataforma Illumina de HiSeq 2500). Les lectures de de seqüència es pre-processen mitjançant un programa que utilitza FastQC, per poder avaluar la qualitat; i el Cutadapt, per eliminar els adaptadors de Illumina i poder descartar totes les seqüències inferiors a 30bp.

Les lectures resultants són mapejades contra el transcriptoma humà (GRCh38, release 76, agost 2014) i mitjançant RSEM v3.2.3, s'estima el nivell d'expressió de gens e isoformes. Aquest programa computa la probabilitat que un determinat

fragment seqüenciat, correspongui a un transcrit concret, mitjançant l'algoritme EM (Expectation Maximization).

Anàlisi expressió diferencial

Les dades es processen amb uns filtres d'anàlisi d'expressió diferencial que utilitza el paquet Bioconductor Limma 3.32.15 per la normalització i el test d'expressió diferencial.

Els resultats arriben en forma d'arxius excel; tant les dades en cru, com els gens diferencialment expressats (amb valor estadístic p-value ajustat <0.05). La feina a realitzar al laboratori consisteix en filtrar aquesta informació quantitativa per poder associar les diferències observades, a la mutació en estudi que provoca la Retinosi pigmentària en el pacient.

Davant la possibilitat d'obtenir milers de gens diferencialment expressats, es procedeix a la realització d'una llista RP, per estudiar el procés d'expressió de forma més específica. Aquesta llista de gens (*gene sets*) o "**llista RP**" es construeix a partir de les eines de text-mining (*Génie web server*), amb gens d'interès en retinitis pigmentosa. Aquesta llista consta de 296 gens (annex 2). Els filtres seleccionats al servidor Génie per a l'elaboració de la llista es basen en l'evidència bibliogràfica dels articles científics relacionats amb el terme Retinitis pigmentosa (MeSH browser) en l'espècie *Homo sapiens* i han de ser gens que donin lloc a proteïnes codificants. A més dels obtinguts per text-mining, s'afegeixen a la llista gens relacionats amb altres distròfies de retina, com els continguts al panell propi de NGS. Els gens d'aquesta llista s'estudiaran tant a nivell d'expressió diferencial, com a nivell d'isoformes.

Anàlisi funcional

Del total de gens diferencialment expressats, es realitza un **anàlisi funcional** mitjançant un estudi de sobre-representació (ORA) i GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*). Aquest anàlisi funcional va orientat a l'agrupació de gens en funció de:

- *processos biològics de Gene Ontology*: agrupa els gens diferencialment expressats en funció del procés biològic i funció molecular en el que intervé. Per aquesta anàlisi de sobre-representació per als processos biològics, es tenen en compte els gens diferencialment expressats entre cèl·lules RPE de pacient i de control amb valors $FDR < 0.01$.

- *rutes metabòliques KEGG*: agrupa els gens diferencialment expressats en funció de la ruta metabòlica a la qual pertanyen a través de la base de dades KEGG. Aquest anàlisi de sobre-representació es realitza a partir dels gens diferencialment expressats entre cèl·lules RPE de pacient i de control amb un p-value ajustat < 0.05 .

3.9.6- Anàlisi d'esdeveniments de *splicing*

Aquest anàlisi bioinformàtic també es realitza al Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC BioIT Unit), a Madrid, en col·laboració amb el grup de genòmica de la Dra. Ana Dopazo.

Per a la detecció d'esdeveniments de *splicing* alternatiu entre mostres de pacient i control s'utilitzen 3 eines bioinformàtiques diferents: SwitchSeq i DEXSeq, que són dues eines ja validades; i ASapp, una bioinformàtica pròpia del laboratori de genòmica del CNIC, que es troba en procés de desenvolupament i validació.

SwitchSeq permet estudiar la utilització diferencial d'isoformes entre dues condicions; i les seqüències de les que parteix són les dades obtingudes per RSEM.

Ens proporciona informació de dos tipus: en primer lloc identifica les isoformes majoritàries per a cada gen i condició; i en segon lloc, detecta com a *switching* (o variació), aquells casos en que hi ha variació d'isoforma majoritària entre les dues condicions.

Per l'estudi d'esdeveniments de *splicing*, es tenen en compte totes les seqüències obtingudes al transcriptoma; és a dir, es tenen en compte el total de transcrits en cada tipus i condició cel·lular; independentment de si aquests estan diferencialment expressats o no entre ells. Amb el total de transcrits, la eina SwitchSeq permet distribuir les diferents isoformes en funció de si són RNAs:

- codificants per proteïnes
- amb retenció d'intró
- no codificants
- van a NMD
- desconeguts

Un cop obtingut el perfil de transcrits de cada població, es comparen entre ells: mateix tipus cel·lular i diferent condició; i mateixa condició i diferent tipus cel·lular.

DEXSeq és una eina bioinformàtica basada en la utilització diferencial d'exons entre dues condicions. Les seqüències de les que parteix són les dades obtingudes dels arxius *bam*; i mapejant les seqüències amb el genoma de referència, quantifica les lectures alineades amb exons. Els resultats de la utilització diferencial d'exons e introns dins el mateix tipus cel·lular en diferents condicions (control i pacient), es pot visualitzar de forma gràfica, permetent l'associació amb les diferents isoformes o transcrits.

ASapp és una eina bioinformàtica que identifica els esdeveniments de *splicing* alternatiu a partir de *constrasts pairwise* (comparació de dues condicions), i a partir de la informació obtinguda de APPRIS (<http://appris.bioinfo.cnio.es>), realitza una

interpretació biològica dels esdeveniments identificats, classificant-los de forma similar com ho fa la eina SwitchSeq.

L'estudi d'isoformes es realitza sobre els gens de la llista RP, utilitzant les eines bioinformàtiques citades. Aquesta anàlisi permet quantificar de forma relativa el nombre de cada una de les isoformes seqüenciades de cada gen i comparar-les entre pacient i control.

Resultats

4.- RESULTATS

4.1- Estudi seqüenciació massiva per captura en panells dirigits:

Preparació i validació de la llibreria de DNA genòmic

La preparació de la llibreria s'inicia amb el fraccionament del DNA genòmic mitjançant tagmentació (processament amb un enzim recombinasa) i posterior unió d'adaptadors als extrems dels fragments (3.3.2 de material i mètodes). Després de la purificació i amplificació de la llibreria, es procedeix a una primera validació per electroforesi capil·lar (figura 11), per confirmar que els fragments de la llibreria entren dins el rang de mides desitjat.

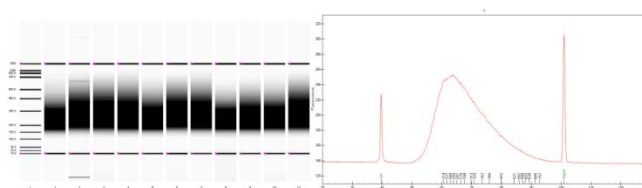


Figura 11: Electroforesi capil·lar de 11 mostres. Experion™ (Bio Rad)

A la dreta, imatge gràfica de l'electroforesi d'una mostra individual (7).

Un cop validada la llibreria de cada mostra, es realitza la hibridació amb les sondes del panel i s'indexa cada mostra per poder ser identificades al seqüenciador. Abans de barrejar per fer el pool final, cal una segona validació (figura 12) per electroforesi capilar.

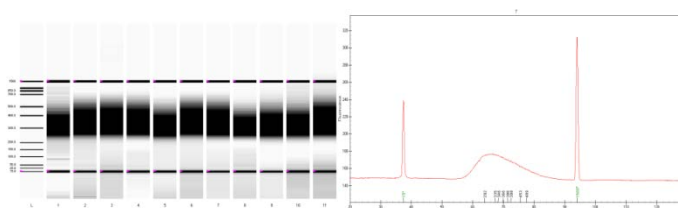


Figura 12: Electroforesi capil·lar de 11 mostres. Experion™ (Bio Rad).

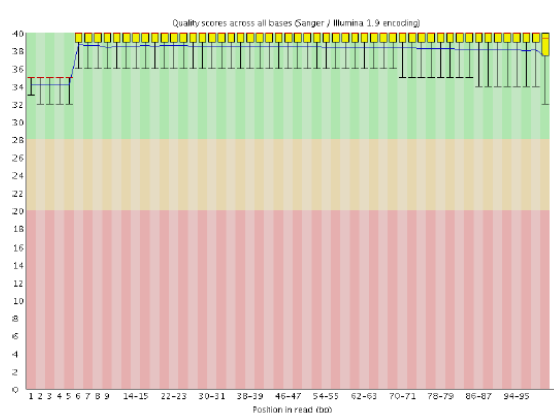
A la dreta, imatge gràfica de l'electroforesi d'una mostra individual (7).

Anàlisi de dades i seqüenciació

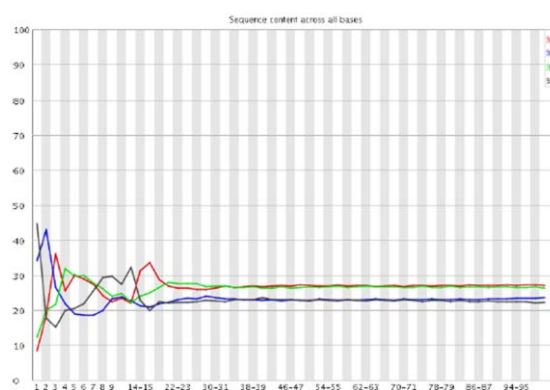
Un cop validades les llibreries, es quantifiquen i es barregen de forma equimolecular. El pool final és enviat a Sistemes Genòmics, on es realitza tot el procés de seqüenciació, i els resultats de l'anàlisi bioinformàtic ens arriben a través de la plataforma GeneSystems. Per a cada tanda de seqüenciació, es genera un informe on es troba tota la informació sobre el procés de seqüenciació.

Avaluació qualitat de les dades

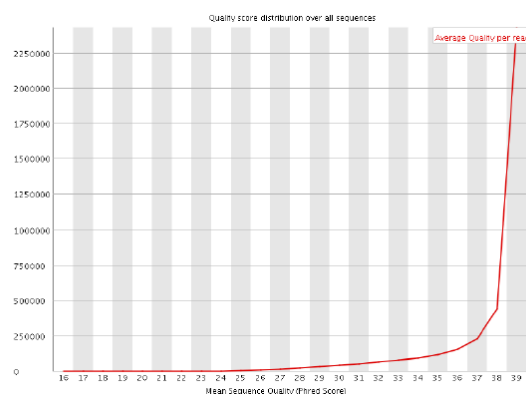
Per a cada mostra analitzada es generen 3 tipus de gràfics diferents que mostren els valors de qualitat segons l'escala tipus Phred: Valors de Phred quality score de 40 significa que la probabilitat de tenir una base incorrecta és d'1 entre 10000; la qual cosa vol dir que té una precisió de 99.99.



A



B



C

Figura 13: Qualitat individual (per una única mostra) de l'assaig representada gràficament:

- A) qualitat de seqüència de base
- B) contingut de seqüència de base
- C) puntuació qualitat de la seqüència

Avaluació de l'alineament de lectures i l'enriquiment de dianes

Després de la lectura i el mapeig, és important filtrar aquelles seqüències que puguin introduir més biaix i soroll de fons en els següents passos. Per això, des de l'arxiu BAM obtingut després del mapeig, les lectures i seqüències de baixa qualitat marcades com a duplicats, són eliminades. Llavors, la cobertura general de la mostra i l'eficiència de seqüenciació són avaluades.

Les dades estadístiques de l'alineament de lectura venen donats en forma de taula.

A la taula 9 es poden observar els valors estadístics de les 21 mostres analitzades.

Taula 9: Mètrica de la qualitat d'alineació.

Les mostres 1-5 seqüenciades en plataforma HiSeq; mostres 6-21 a MiSeq

Sample	%Mapped	%High quality mapped reads	%High quality mapped reads without PCR duplicates	Mean coverage
1	99.16	92.66	62.63	400.66
2	99.19	93.10	64.21	406,9
3	96,67	91,67	44.74	420.17
4	97,42	94,2	40.74	354.12
5	99,4	94,25	50.13	475.77
6	98.24	92.90	78.53	117.41
7	98.53	93.09	80.99	93.33
8	99.00	97.50	74.50	174.33
9	98.99	96.82	75.71	188.09
10	98.27	95.52	83.80	110.75
11	98.49	93.46	79.55	178.03
12	96.82	96.09	76.20	228.59
13	97.84	95.68	86.22	173.41
14	97.69	96.60	77.48	252.47
15	97.96	96.84	69.60	332.64
16	97.06	95.76	82.11	216.19
17	98.00	96.36	82.14	191.52
18	96.04	95.06	85.44	149.25
19	97.83	97.14	71.58	276.1
20	97.63	96.77	70.56	272.79
21	97.30	96.46	67.42	264.36

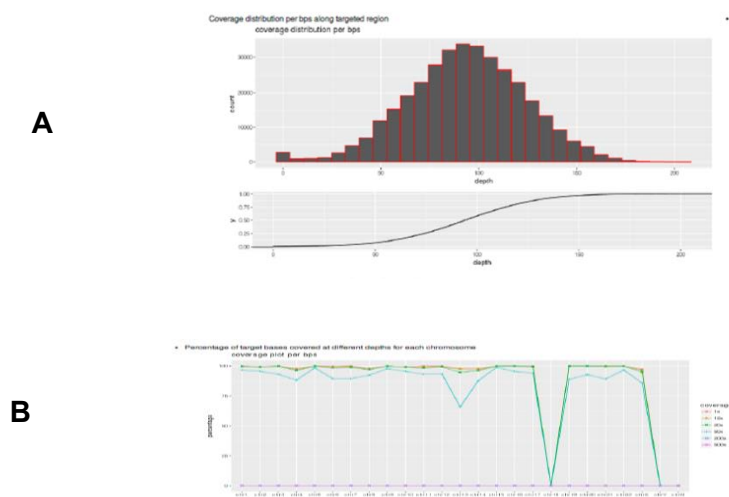


Figura14: A) Percentatge de les bases diana cobertes a diferents profunditats, i per a cada cromosoma B) Percentatge de les lectures de regions diana respecte el número total de lectures mapejades

Identificació de variants

El sistema bioinformàtic permet identificar i anotar les variants trobades a partir de tota la informació extreta dels alineaments de les lectures, i de la combinació de diferents algorismes (desenvolupats per Sistemes Genòmics). Les variants identificades s'anoten i es classifiquen segons l'apartat 3.5.3 de material i mètodes.

Predicció conseqüències mutació

La seqüenciació d'última generació genera gran quantitat d'informació, donant lloc a milers de variants de seqüència. Les eines per la predicció de l'efecte de la mutació serveixen per poder diferenciar els diferents impactes que provocaria la variant estudiada, quan aquesta no és coneguda. Per això, hi ha diversos programes bioinformàtics *in silico* que s'han desenvolupat per predir la patogenicitat dels diferents tipus de variants. Un cop s'apliquen els diferents algorismes (3.5.4 material i mètodes), les dades de la predicció venen donades en forma de taula; i si la variant ja està prèviament descrita, es classifica com a: deletèria, probable o possible patogènica, i benigna.

Estudi possibles variants

En el període d'un any, es van realitzar estudis genètics de seqüenciació per captura en vint-i-un pacient. Un cop rebut l'informe i els resultats en forma de taula (en arxiu excel), es van aplicar els filtres de l'apartat 3.5.6 de material i mètodes, la qual cosa va permetre la reducció del nombre de variants a estudiar a una desena part. De totes aquestes variants filtrades, n'hi havia ja descrites amb tota la informació sobre el tipus de variant i les referències corresponents. Això va permetre establir el diagnòstic de 9 dels 21 pacients de forma directa (taula 10)

Taula 10: mutacions responsables de la distròfia de retina trobades en 9 dels 21 pacients als quals se'ls ha realitzat seqüenciació amb panell dirigit RPv1-GeneSGKit®.

La freqüència d'aquestes variants en la població és <1%

Mostra	Gen	Variant	Canvi a nivell de proteïna	Diagnòstic
2	ABCA4	c.5819T>C	p.(Leu1940Pro)	Malaltia Stargardt
	ABCA4	c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)	
9	PDE6A	c.1705C>A	p.Gln569Lys	arRP
	PDE6A	c.1407G>C	p.Leu469Phe	
6	ABCA4	c.4352+1G>A	splice donor variant	Malaltia Stargardt
	ABCA4	c.3386G>T	p.Arg1129Leu	
7	CNGB1	c.2957A>T	p.Asn986Ile	arRP
	CNGB1	c.2893-7G>A	splice region variant	
12	ABCA4	c.5819 T>C	p.(Leu1940Pro)	Malaltia Stargardt
	ABCA4	c.2481delT	p.Thr829ArgfsTer14	
18	USH2A	c.2276G>T	p.Cys759Phe	arRP
	USH2A	c.6956delT	p.Leu2319ArgfsTer7	
19	EYS	c.5757dupT	p.Leu1920SerfsTer21 (HM)	arRP
20	PRCD	c.70C>T	p.Gln24Ter (HM)	arRP
21	CNGA1	c.859C>T	p.Arg287Ter (HM)	arRP

Dels 21 pacients, a 7 d'ells no es va trobar cap mutació patogènica que es pogués associar a la retinopatia que presentaven; i als 5 restants es van trobar possibles variants candidates a ser la causa de la distròfia de retina. Aquestes variants candidates (taula 11) es van obtenir després de: l'aplicació dels filtres, la valoració del tipus de variant i la predicció de les conseqüències de la mutació.

Taula 11: variants trobades a 5 dels pacients analitzats amb panell dirigit RPv1-GeneSGKit® que podrien ser responsables de la distròfia de retina.

Les marcades amb * són de significat incert. Les subratllades en rosa són mutacions descrites. La freqüència d'aquestes variants en la població és <1%

Mostra	Gen	Variant	Canvi a nivell de proteïna	Possible diagnòstic
1	<i>TOPORS</i>	c.1238A>C*	p.Gln413Pro	adRP
	<i>PROM1</i>	c.303+2T>C	splice donor variant	Distròfia cons i bastons
5	<i>RP1L1</i>	c.6229G>A *	p.(Arg56Cys)	Distròfia macular oculta
	<i>RP1L1</i>	c.3956C>G *	p.(Glu2077Lys)	Distròfia macular oculta
	<i>VCAN</i>	c.6238G>T *	p.(Val2080Phe)	Vitreoretinopatia
	<i>LRP5</i>	c.610C>G *	p.(Leu204Val)	Vitreoretinopatia
8	<i>ABCA4</i>	c.1356+4A>G *	--	Malaltia Stargardt
	<i>ABCA4</i>	c.2744-5C>T *	--	
	<i>ABCA4</i>	c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)	adRP
	<i>RHO</i>	c.128A>G	p.(Tyr43Cys)	adRP
10	<i>ABCA4</i>	c.1820G>T	p.Gly607Val	Malaltia Stargardt
	<i>PROM1</i>	c.1354dupT	p.Tyr452LeufsTer13	adRP o distròfia de cons autosòmica
17	<i>IMPDH1</i>	c.588A>C	p.Glu196Asp	adRP
	<i>RP1</i>	c.4452T>A	p.Asn1484Lys	

4.2- Caracterització de variants genètiques per a la detecció de possibles gens candidats: seqüenciació de l'exoma complert (WES)

Es van escollir 4 famílies per l'estudi de l'exoma complert, prèviament diagnosticades d'adRP, a les quals ja se'ls havia fet el cribratge per NGS, mitjançant panells dirigits de tots els gens coneguts causants d'adRP. A cap d'elles se li havia trobat la mutació causant de la malaltia.

De cadascuna de les famílies es van rebre els resultats de l'estudi de l'exoma comparatiu entre dos membres afectes i un sa. Les variants anotades són aquelles que es trobaven en heterozigosi en els individus afectes i no apareixien a l'individu sa. Totes aquestes variants es van estudiar aplicant una sèrie de criteris i filtres propis tal i com es descriu a l'apartat 3.5.7 de material i mètodes. De totes aquelles variants que poguessin semblar candidates, se'ls realitzà un estudi específic (amplificació i posterior seqüenciació Sanger: 3.6 de material i mètodes) a la resta de membres de la família. Un cop seleccionades, aquest estudi directe es realitzà

sobre la regió de DNA genòmic on es troba la variant: generalment a exons o regions de *splicing*. En funció de si segregaven o no a la resta de membres, quedaven seleccionades o descartades (taules 12,14,15 i 16).

A les figures 15, 18, 20 i 21 es mostren els arbres genealògics de les 4 famílies estudiades. Els individus encerclats en vermell són aquells als quals se'ls va realitzar l'exoma i posterior estudi comparatiu; i els individus amb fletxes blaves, són aquells sobre els quals es realitzà seqüenciació directa de la variant seleccionada. Si la variant segregava, es realitzava seqüenciació directa a la resta d'individus de la família.

Família RP 65

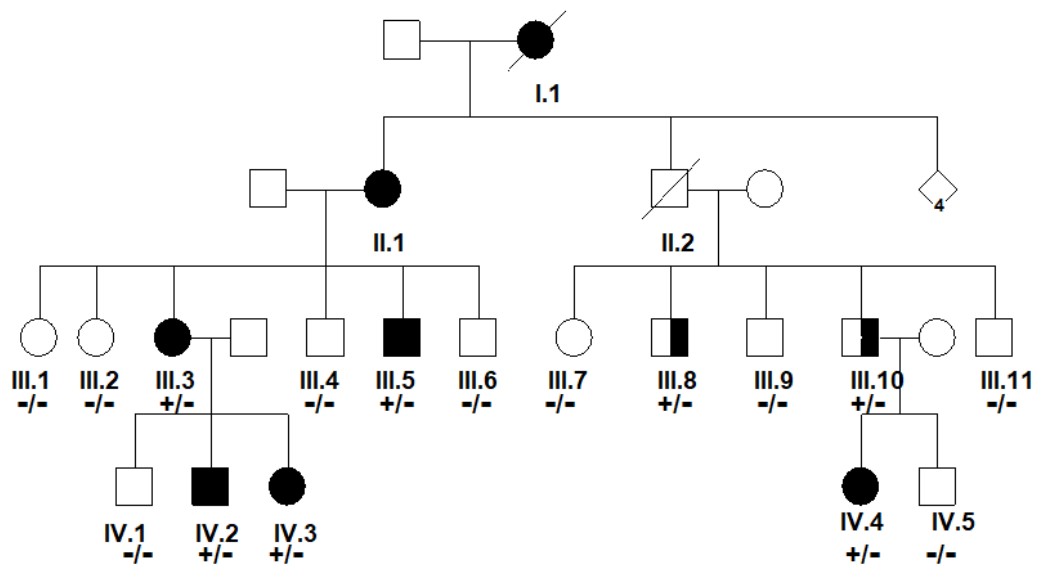


Figura 15: arbre genealògic família RP65.

Els membres III-8 i III-10 no estaven diagnosticats clínicament de RP abans de l'anàlisi molecular

Taula 12: variants estudiades en família RP65

Indel/Frameshift coding Non-Synonymus Splice site Stop-Gained

<i>C11orf40</i>	chromosome 11 open reading frame 40	c.599-600dupGT	p.Met201ValfsX211
<i>CCR3</i>	chemokine (C-C motif) receptor 3	c.415G>A	p.Val160Met
<i>COL9A2</i>	collagen, type IX, alpha 2	c.185C>T	p.Pro51Leu
<i>GPR156</i>	G protein-coupled receptor 156	c.2426T>C	p.Leu809Ser
<i>MAST2</i>	microtubule associated serine/threonine kinase 2	c.3186G>A	p.Ser1062Ser
<i>POLR1B</i>	polymerase (RNA) I polypeptide B, 128kDa	c.1865C>G	p.Pro622Arg
<i>RRH</i>	retinal pigment epithelium-derived rhodopsin homolog	C.900-4G>A	-
<i>ABCA7</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 7	c.3653G>A	p.Arg37His
<i>ANKDD1B</i>	ankyrin repeat and death domain containing 1B	c.567-571delCAGTG	p.Ala190fsX201
<i>C1orf112</i>	chromosome 1 open reading frame 112	c.171A>G	p.Gln57Gln
<i>COL6A6</i>	collagen, type VI, alpha 6	c.307G>A	p.Gly103Arg
<i>CTSA</i>	cathepsin A	c.510C>A	p.Asn153Lys
<i>GCC2</i>	GRIP and coiled-coil domain containing 2	c.3793A>G	p.Ile1265Val
<i>MAP4</i>	microtubule-associated protein 4	c.547C>T	p.Leu1593Phe
<i>PIGG</i>	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class G	c.661delC	p.Pro221GlnfsX222
<i>PPP1R15A</i>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	c.484A>T	p.Lys162X
<i>PTPMT1</i>	protein tyrosine phosphatase, mitochondrial 1	c.361A>C	p.Thr121Pro
<i>RNLS</i>	renalase, FAD-dependent amine oxidase	c.871T>A	p.Ser291Thr
<i>RPAP1</i>	RNA polymerase II associated protein 1	c.1877G>A	p.Arg626His
<i>TP53AIP1</i>	tumor protein p53 regulated apoptosis inducing protein 1	c.169G>A	p.Gly57Ser
<i>ZNF143</i>	zinc finger protein 143	c.710G>A	p.Arg264Gln

De totes les variants estudiades, cap d'elles segregava amb la resta de membres de la família excepte el *COL6A6*. Aquesta és una nova variant que no apareix a les bases de dades. Per comprovar la presència d'aquesta variant en pacients i controls de la nostra població, es realitzà l'estudi d'aquesta variant mitjançant FRET segons l'apartat 3.7.1 de material i mètodes.

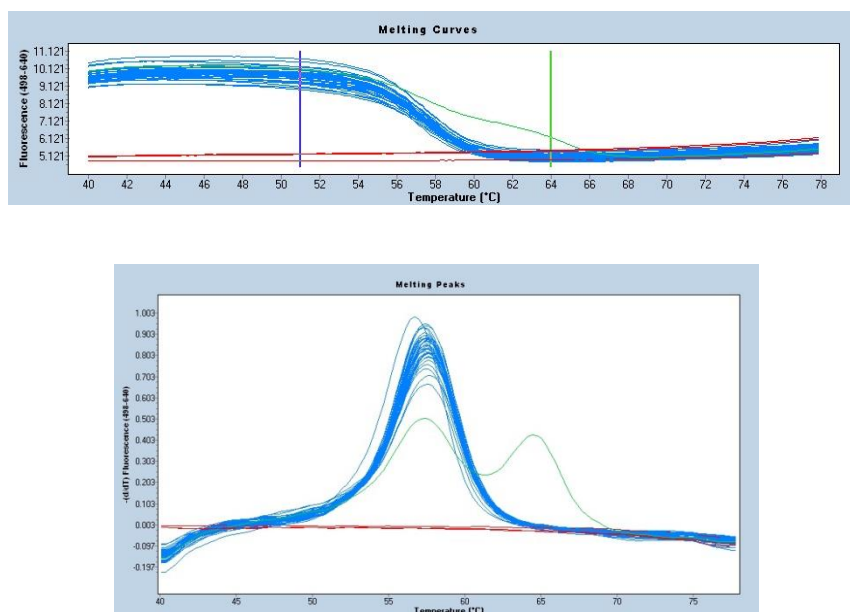


Figura 16: Corbes de fusió (a dalt) i els pics de fusió (a baix) obtinguts després del FRET.

Les línies blaves mostren el perfil de pacients adRP i individus sans sense la variant COL6A6, enfront el perfil verd d'un pacient de família RP65 amb variant en heterozigosi.

Aquesta variant es troba a tots els membres afectes i diagnosticats clínicament de RP. També es va detectar als individus III-8 i III-10, que no havien estat diagnosticats inicialment de RP. La posterior revisió oftalmològica d'aquests membres, mostrà la presència de RP. No es va trobar a cap dels 120 individus índex afectes, ni als 200 controls sans. Tot i que aquests resultats compleixen amb la condició necessària per la hipòtesi que la variant p.Gly103Arg del gen *COL6A6* es pugui considerar causant de la malaltia en aquesta família, no és condició suficient.

El gen *COL6A6* es troba al cromosoma 3, a una distància d'una megabase del gen *RHO*. Això implica un important lligament entre ambdós gens, amb una distància genètica inferior a 1cMorgan. Tot i que les anàlisis anteriors realitzades per NGS al cas índex familiar no van detectar alteracions al gen *RHO*, es va procedir a l'anàlisi genòmic complet del gen mitjançant seqüenciació genòmica directa i MLPA (3.7.2

de material i mètodes). Els resultats de l'anàlisi per MLPA es presenten a la taula 13.

Taula 13: resultats MLPA després de l'anàlisi de fragments

		Probe target info	All samples						References samples	
			III.5	III.8	IV.4	IV.5	III.3	IV.3	C-294	C-400
03q (n=5)	RHO-1	03-130,730476	1	0,94	1,03	1,07	0,99	1,04	0,98	1,02
	RHO-2	03-130,730476	0,96	0,99	1,05	1,1	1,03	0,96	0,98	1,02
	RHO-3	03-130,733822	1,02	1,03	1,08	1,07	1	1,03	1	1
	RHO-4	03-130,734078	1,03	1,09	1,1	1,07	1,1	1,07	1,01	0,99
	RHO-5	03-130,735144	0,52	0,51	0,54	1,05	0,53	0,53	0,98	1,02

A partir de l'anàlisi de fragments dels diferents individus de la família comparats amb les mostres de referència, s'observà una deleció en la regió 5' de *RHO*, en heterozigosi, que implica el seu exó 5. La caracterització d'aquesta deleció es va obtenir mitjançant seqüenciació genòmica directa. Es tracta d'una deleció de 828 bp (g.9281_10108del) que compren part de l'intró 4, exó 5 i part de la regió 3' UTR del gen *RHO*. Es va dissenyar una prova de PCR específica (3.7.3 de material i mètodes) que pogués detectar la deleció; i es va estendre l'anàlisi a tots els individus de la família. Els resultats que s'observen a la figura 17 van mostrar la presència de la deleció a tots els afectes i l'absència a la resta de membres sans.

La deleció en *RHO* co-segregava amb la nova variant detectada en *COL6A6* als membres afectes de la família; la qual cosa demostrà el lligament entre els al·lels de *RHO* i *COL6A6*; portadors tant de la deleció, com de la nova variant.

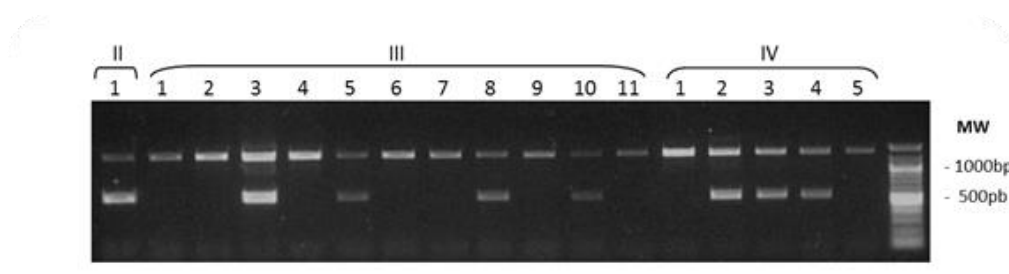


Figura 17: Gel agarosa 1,5%. Amplificació amb primers M13_RHO-4F i M13_RHO-5R.

Individus sans: fragment 1386bp
Malalts: 2 fragments 1386 i 558bp

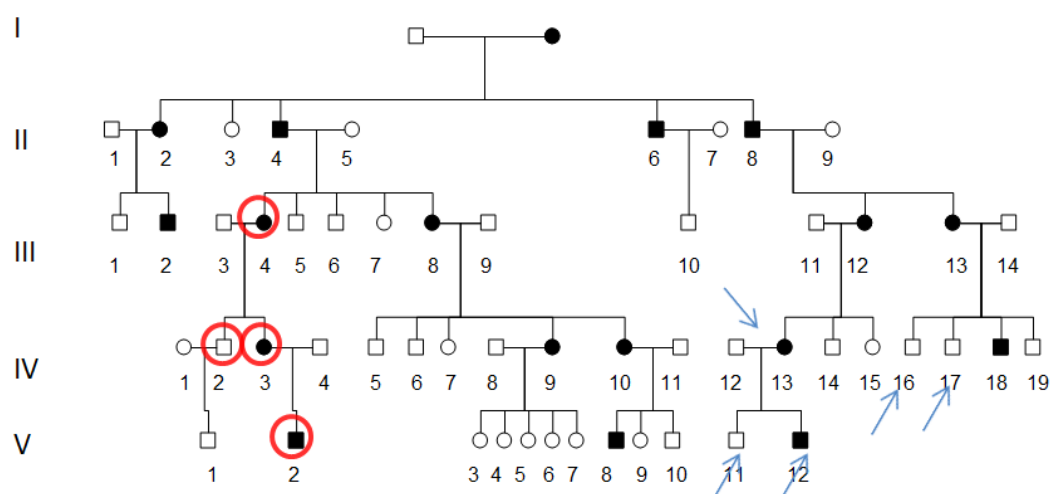
Família RP83

Figura 18: arbre genealògic família RP83

Taula 14: variants estudiades en família RP83

Indel/Frameshift coding Non-Synonymus Splice site Stop-Gained

<i>KAZN</i>	kazrin&_periplakin_interacting_protein	c.647G>C	p.Ser216Thr
<i>CDH10</i>	cadherin_10&_type_2_(T2-cadherin)	c.329A>T	p.Asp110Val
<i>ADAMTS6</i>	ADAM_metallopeptidase_with_thrombospondin_type_1_motif&_6	c.461T>G	p.Leu154Trp
<i>CDHR2</i>	cadherin-related_family_member_2	c.1445A>G	p.Gln482Arg
<i>POU6F2</i>	POU_class_6_homeobox_2	c.1739G>A	p.Arg580Gln
<i>DGKZ</i>	diacylglycerol_kinase&_zeta	c.220C>T	p.Arg74Cys
<i>MAGED1</i>	melanoma_antigen_family_D&_1	c.748C>T	p.Arg250Cys
<i>LYZL2</i>	lysozyme-like_2	c.86C>G	p.Ala29Gly
<i>VCL</i>	vinculin	c.590C>T	p.Thr197Ile
<i>OPALIN</i>	oligodendrocytic_myelin_paranodal_and_inner_loop_protein	c.32C>T	p.Ala11Val
<i>PITPNM1</i>	phosphatidylinositol_transfer_protein&_membrane-associated_1	c.1726T>C	p.Cys576Arg
<i>MFRP</i>	membrane_frizzled-related_protein	c.1374G>T	p.Leu458Phe
<i>TBC1D25</i>	TBC1_domain_family&_member_25	c.1904G>A	p.Arg635His
<i>PJA1</i>	praja_ring_finger_1&_E3_ubiquitin_protein_ligase	c.1120G>A	p.Ala374Thr
<i>RBMX</i>	RNA_binding_motif_protein&_X-linked	c.559_561delTAT	p.Tyr187del
<i>FBLN5</i>	fibulin_5	c.211T>G	p.Tyr71Asp

Cap de les variants estudiades en aquesta família (taula 14) es va seguir estudiant com a candidata, perquè cap d'elles segregava amb la resta d'individus.

La re-avaluació dels informes de les visites a oftalmologia dels diferents pacients, va mostrar l'aparició primerenca de la malaltia en homes, i un fenotip variable de simptomatologia de RP en les pacients femenines. Aquests fets, més l'absència de transmissió home-home van dur a terme la valoració d'una possible herència lligada al cromosoma X. Per això es va realitzar l'estudi de la regió ORF15 del gen *RPGR*, que és la única regió dels gens coneguts que no queda ben coberta per NGS. Mutacions en el gen *RPGR* causen un 20% de la retinosi pigmentària associada al cromosoma X. I dins d'aquestes mutacions, el 75% es troben a una regió determinada, que és la ORF 15. Aquesta regió és rica en purines i és un hotspot d'acumulació de mutacions. Al ser una regió de seqüència molt repetitiva, la ORF 15 no queda ben coberta quan es realitza la seqüenciació massiva, de manera que per estudiar-la, es va realitzar seqüenciació directa seguint el protocol descrit a Ruddle *et al.*, 2009. (3.8.1 de material i mètodes).

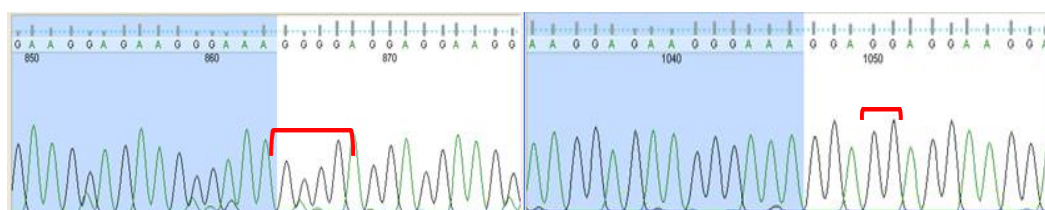


Figura 19: cromatograma que mostra seqüència de la regió ORF15.

A l'esquerre, individu sa (V.1) A la dreta individu afecte amb deleció (V.2)

Els resultats obtinguts de les seqüenciacions directes per Sanger van permetre la detecció de la mutació causant de la malaltia. Aquesta mutació és una deleció d'un parell de bases que provoca un canvi en el marc de lectura i aparició d'un nou codó stop: c.2763_2764delGG (p.Glu922GlyfsTer156). Aquesta mutació es va comprovar a tots els individus de la família. Els resultats obtinguts van demostrar que la deleció hi era present a tots els home afectes, i les dones portadores de la mutació en heterozigosi, eren aquelles que presentaven fenotips variables de la malaltia.

Família RPF3

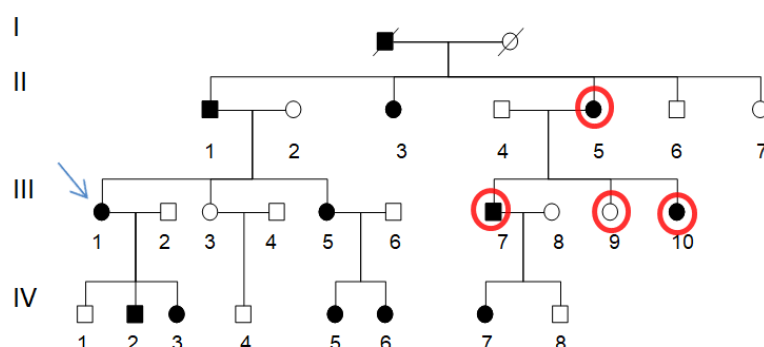


Figura 20: arbre genealògic família RPF3

Taula 15: variants estudiades en família RPF3

Indel/Frameshift coding Non-Synonymus Splice site Stop-Gained

<i>MPP5</i>	membrane protein& palmitoylated 5	c.692T>C	p.Ile231Thr
<i>RDH5</i>	retinol dehydrogenase 5 (11-cis/9-cis)	c.682C>T	p.Arg228Trp
<i>PTPN23</i>	protein tyrosine phosphatase& non-receptor type 23	c.3010G>A	p.Gly1004Ser
<i>RALGAP2</i>	Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 2	c.236C>T	p.His80Tyr
<i>HMCN1</i>	hemicentin_1	c.8821T>G	p.Tyr2941Asp
<i>ARHGAP15</i>	Rho GTPase activating protein 15	n.423-3C>T	
<i>BASP1</i>	brain abundant& membrane attached signal protein 1	c.611C>G	p.Ala204Gly
<i>PCDHGB4</i>	protocadherin gamma subfamily B& 4	c.767A>G	p.Tyr256Cys
<i>PCDH1</i>	protocadherin 1	c.2068G>A	p.Ala690Thr
<i>RING1</i>	ring finger protein 1	c.1004A>G	p.Glu335Gly
<i>DSCAM</i>	Down syndrome cell adhesion molecule	c.2525A>C	p.Tyr842Ser
<i>GZF1</i>	GDNF-inducible zinc finger protein 1	c.824A>C	p.Gln275Pro
<i>LTBR</i>	lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily& member 3)	c.1060T>G	p.Ser354Ala
<i>MAP1S</i>	microtubule-associated protein 1S	c.2458G>A	p.Glu820Lys
<i>PHYHIPL</i>	phytanoyl-CoA 2-hydroxylase interacting protein-like	c.880C>G	p.Leu294Val
<i>PSMF1</i>	proteasome (prosome& macropain) inhibitor subunit 1	c.17T>G	p.Val6Gly
<i>RARS</i>	arginyl-tRNA synthetase	c.318G>C	p.Gln106His
<i>RDH5</i>	retinol dehydrogenase 5 (11-cis/9-cis)	c.682C>T	p.Arg228Trp
<i>RP1L1</i>	retinitis pigmentosa 1-like 1	c.3955G>A	p.Ala1319Thr
<i>SHISA7</i>	shisa family member 7	c.325A>C	p.Thr109Pro
<i>ZFX3</i>	zinc finger homeobox 3	c.1226-1G>A	
<i>WBSCR17</i>	Williams-Beuren syndrome chromosome region 17	c.800G>A	p.Arg267Gln
<i>TDRD7</i>	tudor domain containing 7	c.126+7C>T	
<i>INVS</i>	inversin	c.725C>T	p.Ser242Leu
<i>HMX3</i>	H6 family homeobox 3	c.644G>A	p.Gly215Asp
<i>HMX2</i>	H6 family homeobox 2	c.644C>T	p.Ala215Val
<i>HOXC12</i>	homeobox C12	c.679G>A	p.Ala227Thr
<i>NUPL1</i>	nucleoporin like 1	c.213A>C	p.Lys71Asn
<i>MPP5</i>	membrane protein& palmitoylated 5 (MAGUK p55 subfamily member 5)	c.692T>C	p.Ile231Thr
<i>PDCD2L</i>	programmed cell death 2-like	n.917+6A>G	
<i>PSMF1</i>	proteasome (prosome& macropain) inhibitor subunit 1 (PI31)	c.569C>T	p.Pro190Leu

De totes aquestes variants estudiades a la família RPF3, cap d'elles va complir la segregació a la resta d'individus afectes. Tot i afegir-se a l'estudi de l'exoma un nou individu afecte (IV.5), per intentar filtrar més les variants, no es va obtenir cap variant candidata a ser causant de la malaltia.

Família RPN89

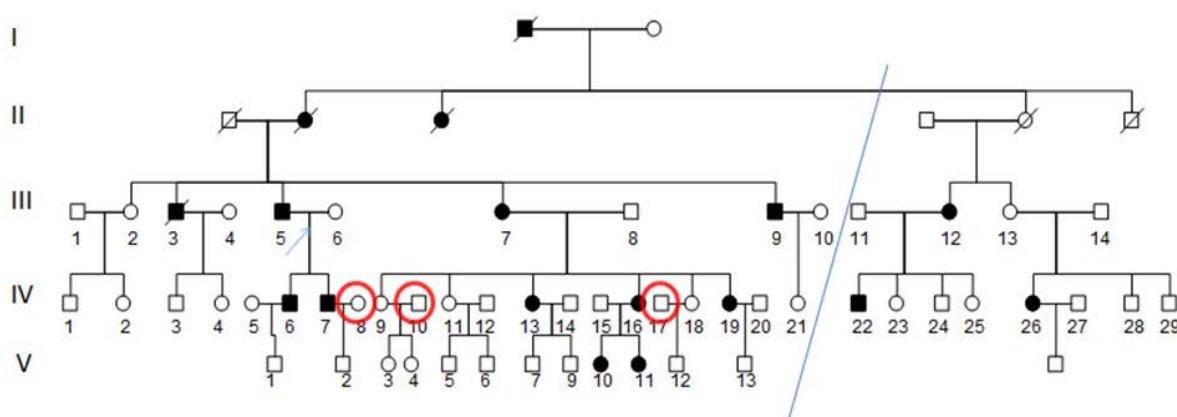


Figura 21: arbre genealògic família RPN89.

La línia blava divideix la família en dues parts. A la part dreta de la família es detectà la presència d'una duplicació al gen *PRPF31* en la pacient IV.26 i als individus III.14 i IV.29. Aquesta duplicació es trobà present també al pacient IV.6 i absent a III.7 i IV.13.

De totes les variants estudiades en aquesta família cap d'elles segregava amb la resta de membres afectes. Però les dues variants missense corresponents al gen *KIFC2* segregaven perfectament en tots els individus de la part esquerra de la família, excepte en un d'ells (III.9).

Taula 16: variants estudiades en família RPN89

Indel/Frameshift coding Non-Synonymus Splice site Stop-Gained

<i>GRIK3</i>	glutamate_receptor&_ionotropic&_kainate_3	c.1158G>T	p.Leu386Phe
<i>DNAH14</i>	dynein&_axonemal&_heavy_chain_14	c.359C>G	p.Ser120Cys
<i>NCOA1</i>	nuclear_receptor_coactivator_1	c.1316G>A	p.Gly439Glu
<i>WDR43</i>	WD_repeat_domain_43	c.238A>G	p.Ser80Gly
<i>TNS1</i>	tensin_1	c.1438G>A	p.Val480Ile
<i>ARPC2</i>	actin_related_protein_2/3_complex&_subunit_2&_34kDa	c.57C>A	p.Phe19Leu
<i>RPL14</i>	ribosomal_protein_L14	c.445_446insCTG CTG	p.Thr149_Ala150insAla Ala
<i>OTOP1</i>	otopetrin_1	c.1793G>C	p.Arg598Pro
<i>OTOP1</i>	otopetrin_1	c.1774C>G	p.Pro592Ala
<i>PRIMPOL</i>	primase_and_polymerase_(DNA-directed)	c.662A>G	p.Gln221Arg
<i>CAPN5</i>	calpain_5	c.179A>C	p.Asp60Ala
<i>MYO7A</i>	myosin_VIIA	c.3514_3535delG GAGGCGGGGAC ACCAGGGCCT	p.Gly1172Glu
<i>CEP164</i>	centrosomal_protein_164kDa	c.2333G>A	p.Cys778Tyr
<i>DGKH</i>	diacylglycerol_kinase&_eta	c.215-2A>T	
<i>NUDT16L1</i>	nudix_(nucleoside_diphosphate_linked_moiety_X)- type_motif_16-like_1	c.598T>G	p.Trp200Gly
<i>DHX34</i>	DEAH_(Asp-Glu-Ala-His)_box_polypeptide_34	c.1986_1987delC T	p.Arg664GlnfsTer87
<i>NRBP1</i>	nuclear_receptor_binding_protein_1	c.436-3C>T	
<i>ARL13B</i>	ADP-ribosylation_factor-like_13B	c.831C>A	p.Asn277Lys
<i>KALRN</i>	kalirin&_RhoGEF_kinase	c.6082T>G	p.Ser2028Ala
<i>CYP4V2</i>	cytochrome_P450&_family_4&_subfamily_V&_polypeptide_2	c.332T>C	p.Ile111Thr
<i>SPAG1</i>	sperm_associated_antigen_1	c.1059_1060insG AC	p.Lys353_Ser354insAsp
<i>AGO2</i>	argonaute_RISC_catalytic_component_2	c.1516C>T	p.Arg506Trp
<i>TOP1MT</i>	topoisomerase_(DNA)_I&_mitochondrial	c.218A>G	p.Gln73Arg
<i>NRBP2</i>	nuclear_receptor_binding_protein_2	c.453C>T	p.Pro152Leu
<i>KIFC2</i>	kinesin_family_member_C2	c.600G>T	p.Gln200His
<i>KIFC2</i>	kinesin_family_member_C2	c.604A>T	p.Ile202Phe

Per comprovar si aquestes variants podrien ser marcadors que prediuen que la mutació es trobava en aquest cromosoma; i que en l'individu III.9 havia patit alguna recombinació, es van estudiar marcadors que es trobaven a diferents distàncies del lloc on es eren aquestes dues variants. Es realitzà l'estudi de l'haplotip als diferents membres, segons el descrit a l'apartat 3.9.1 material i mètodes. Els resultats es troben a la taula 17.

Taula 17: estudi de l'haplotip als diferents individus afectes de la família RPN89.

A la taula es descriuen els gens, la posició al cromosoma i les bases seqüenciades als dos al·lells.
En blau, la regió d'homozigotitat de l'individu III.9

GEN	Posició cromosoma 8	Variant	Haplotip afecte	RP80	RP81	RP75	RP72	RP78	89-I	89-III	89-IV	76	82
<i>RIPK2</i>	89758381 44%	A/G		AA		AG			AG			AG	AA
<i>SPAG1</i>	100194231 20%	A/GAC		A/GAC	AA	AA	A/GAC	AA	AA	AA	A/GAC	A/GAC	A/GAC
<i>CSMD3</i>	112231766 42%	C/A		GG		GT			GG			GT	GG
<i>TBC1D31</i>	123084075 41%	C/G		CG		CG			CC				
<i>TG</i>	132972774 9%	GA		GA	GG	AA	GG	AA	GG	GG	GG	GA	GG
	132972814 9%	AG		AG	AG	GG	AG	GG	AA	AG	AA	AG	AG
<i>COL22A1</i>	138596832 6%	TC	T	TT	TT	TC	TT	TC	TT	TT	TT	TC	TC
<i>AGO..2</i>	140549186	CT	C	CC	CC	CT	CC	CT	CC	CC		CT	CT
<i>TOP1MT</i>	143325505 <1%	AG	A	AA	AA	AG	AA	AG	AA	AA		AG	AG
<i>NRBF2</i>	143835490 <1%	GA	T	CT	CT	CT	CT	CT	CC	CT		CT	CT
<i>KIFC2</i>	144467615 <1%	GT	T	GT	GT	GT	GT	GT	GG	GT	GT	GT	GT
	144467619 <1%	AT	T	AT	AT	AT	AT	AT	AA	AT	AT	AT	AT
<i>ARGH-065</i>	144700520 46%	AG	A	AG	AA	AG	AA	AG	AG	AA	AA	AG	AG
<i>ARGH-161</i>	144700520 40%	CG	C	CG	CC	CG	CC	CG	CG	CC	CC	CG	CG
<i>ARGH-884</i>	144700520 40%	CT	C	CT	CC	CT	CC	CT	CT	CC	CC	CT	CT
<i>ZNF517</i>	144807960 1%	CT	C	CC	CC	CT	CC	CT	CC	CC	CC	CT	CT
<i>ZNF7</i>	144841669 46%	GA	A	GA	AA	GA	GA	GA	GG	AA	AA	GA	GA
<i>ZNF250</i>	144880532 48%	AT	AT	AT	AA	AT	AT	AT	TT	AA	AA	AT	AT

L'estudi d'haplotips va mostrar una regió clarament homozigota en el pacient III.9, de manera que es va procedir a la realització de la tècnica MLPA amb la Probenmix P-014 segons l'apartat 3.9.2 de material i mètodes, per comprovar que aquest pacient no presentés una regió del cromosoma 8 delecionada. Es va escollir aquesta mix perquè contenia 13 sondes en la regió suposadament homozigota per l'individu III.9.

Taula18: resultats MLPA procedents de l'anàlisi de fragments.

Les sondes de la mix que corresponen a la regió delecionada són les encerclades

	Probe target info	All samples			Reference samples			
		III.7	III.9	IV.6	6	596	996	
08q(n=29)	PRKDC-6	08-049,028942	1,07	1,05	0,97	0,94	1,01	1,06
	MOS-1	08-057,188797	1,08	1,05	0,99	1,05	0,92	1,04
	CHD7-26	08-061,925685	1,17	0,98	1	1,08	0,93	1
	MYBL1-14	08-067,641447	0,98	1,02	0,98	1,03	0,94	1,04
	PRDM14-7	08-071,130073	0,99	1,01	1,02	1,04	0,97	0,99
	NCOA2-8	08-071,238280	1,16	0,97	1	1,05	0,96	1
	TCEB1-6	08-075,030774	0,89	0,98	1,04	1	0,94	1,06
	TPD52-9	08-081,112844	0,92	0,98	0,91	1,06	0,93	1,02
	E2F5-6	08-086,306925	0,73	0,99	0,91	1,03	0,92	1,06
	RIPK2-3	08-090,846711	1,16	1	1,08	1,04	0,92	1,05
	RAD54B-6	08-095,492631	1,19	1,1	0,84	1,02	0,97	1,01
	MTDH-2	08-098,742494	0,87	1,06	0,99	1,01	0,92	1,08
	RRM2B-4	08-103,306313	0,97	1,03	0,97	1,01	0,95	1,04
	KLF10-3	08-103,733686	1,13	1,03	1,29	1,07	0,94	1
	EBAG9-3	08-110,632204	0,87	0,97	0,95	1,06	0,95	1
	EIF3H-8	08-117,726436	0,96	1,01	1,09	1,03	0,94	1,03
	EXT1-11	08-118,881023	0,8	0,97	0,86	1,02	0,95	1,03
	RNF139-1	08-125,556615	0,72	0,92	1,22	0,99	0,96	1,04
	MYC-3	08-128,822055	0,87	0,98	0,97	1,02	0,97	1,01
	MYC-3	08-128,822147	1,12	0,96	0,98	1,04	0,95	1,01
	ASAP1-30	08-131,136182	0,74	0,93	0,9	1,03	0,96	1,01
	KCNQ3-14	08-133,213616	0,92	0,97	0,88	1,02	0,97	1,01
	SLA-9	08-134,120065	0,9	0,99	1	1,04	0,95	1,02
	WISP1-5	08-134,309404	1,03	0,93	1,01	0,99	1,02	0,99
	NDRG1-6	08-134,340582	1,16	1,07	1,19	1,03	0,97	1
	KHDRBS3-4	08-136,630197	0,9	0,95	0,86	1,04	0,93	1,04
	PTK2-26	08-141,781923	0,95	1,01	0,91	1,01	0,96	1,03
	PTP4A3-4	08-142,506802	0,8	0,89	0,9	1,01	0,99	1,01
	RECQL4-13	08-145,709832	0,82	0,94	1,17	0,98	1,01	1

Les dades resultants després de la realització de la tècnica van mostrar que no hi havia cap delecíó en el pacient III.9, de manera que es va descartar la hipòtesi de la delecíó.

Al pacient IV.26, i als individus III.13 i IV.29 (no afectes) de la part dreta de la família, se'ls detectà mitjançant MLPA una duplicació en els exons 9,10,11, i 12 del gen *PRPF31*. El mateix assaig es realitzà a altres membres de la família afectes de RP (IV.6, III.7 i IV.13), dels quals només un contenia la duplicació, i els altres dos eren salvatges. Al haver-hi dos afectes sense duplicació, es descartà aquesta variant com a única responsable de la RP en la família. Els resultats obtinguts obren

la possibilitat que dues mutacions diferents siguin les causants de la RP en aquesta família. Desafortunadament, alguns individus afectes de la branca dreta (III.12 i IV.22) es van negar a participar a l'estudi.

4.3- Caracterització iPSCs i avaluació de la pluripotència

Obtenció iPSCs

A partir del cultiu primari de fibroblasts, es van obtenir iPSCs aplicant el descrit a l'apartat 3.9.2 de material i mètodes. La primera comprovació sobre la correcta obtenció de iPSCs, es realitzà mitjançant la visualització de la morfologia al microscopi electrònic.

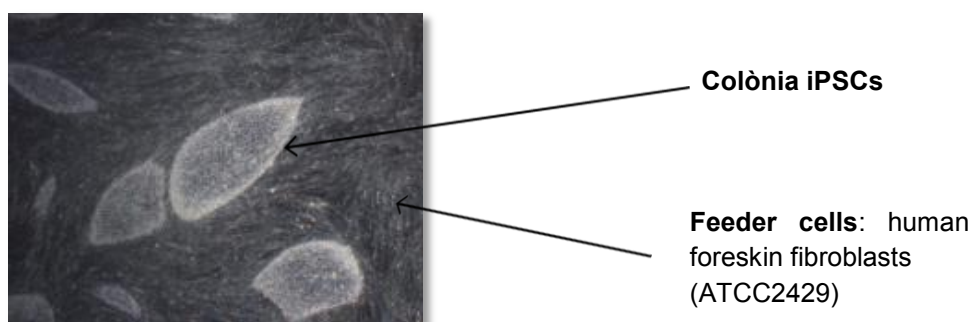


Figura 22: visualització colònies hiPSCs al microscopi electrònic.

La imatge mostra el creixement en colònies i la forma poligonal característica de les cèl·lules pluripotents

Eliminació gens virals

Un cop obtingudes les cèl·lules pluripotents, s'ha de comprovar que no contenen restes de gens ni factors de reprogramació exògens procedents del virus Sendai utilitzat per la inducció de la pluripotència. La confirmació de l'absència de gens virals es va dur a terme segons el descrit a l'apartat 3.9.3 (A) de material i mètodes.

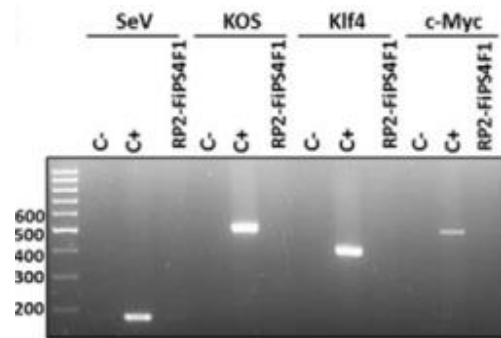


Figura 23: Gel agarosa 2% on es mostren les bandes procedents de la RT-PCR dels factors de reprogramació exògens i DNA viral.

RP2-FiPS4F1: colònia d'iPSCs procedent del passatge 8. C+: colònia d'iPSCs procedent passatge 1.

Expressió mutació *PRPF8*

Un cop les colònies de iPSCs s'han format i diferenciat, s'ha de confirmar que durant la seva replicació, no han patit cap variació genètica. Per això es va realitzar l'amplificació de l'exó 42 del *PRPF8* (que és el que conté la mutació) segons l'apartat 3.9.3 (F) de material i mètodes.

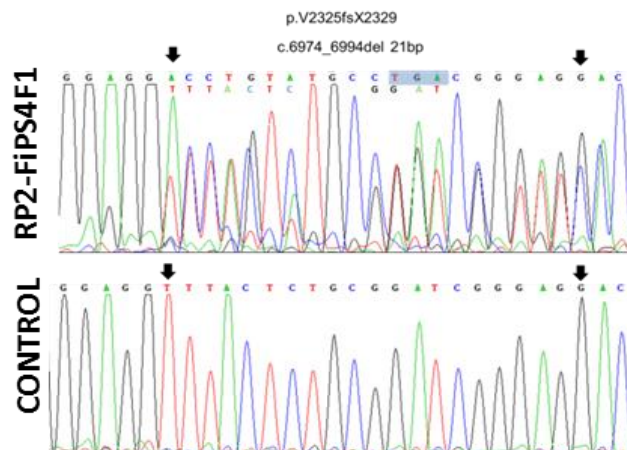


Figura 24: Cromatogrames que mostren la seqüència al voltant de la mutació (*PRPF8*, c.6974_6994del21bp) en hiPSCs de pacient i del control sa.

La seqüència delecionada està marcada entre fletxes, i el codó stop prematur que es forma quan hi ha mutació està subratllat en blau.

Expressió marcadors pluripotència

Altre requisit que han de complir les cèl·lules pluripotents per ser caracteritzades com a tals, és l'expressió de marcadors de pluripotència. Es va realitzar l'assaig de RT-PCR segons l'apartat 3.9.3 (G) de material i mètodes.

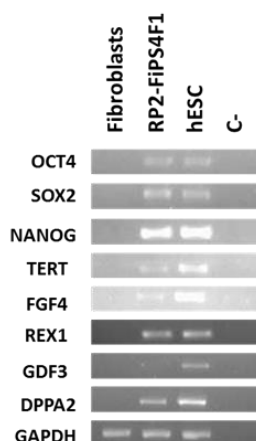


Figura 25: RT_PCR Semiquantitativa.

Mostra l'expressió dels marcadors associats a pluripotència: *OCT-4*, *SOX2*, *NANOG*, *TERT*, *FGF4*, *REX1*, *GDF3*, *DPPA2*.

Les cèl·lules embrionaries són control positiu dels marcadors, ja que són cèl·lules pluripotents. Contràriament al fibroblast (control negatiu de pluripotència), que únicament expressa la *GAPDH* (*housekeeping gene*). El control negatiu es una reacció sense RNA.

Inmunocitoquímica i fosfatasa alcalina

Els assajos d'inmunocitoquímica i de fosfatasa alcalina es van realitzar segons els apartats 3.9.3 (B i H) de material i mètodes. Els factors de transcripció *OCT-4*, *NANOG* i *SOX2* només s'expressen en cèl·lules pluripotents (no diferenciades), igual que el marcador de superfície SSEA-4. El TRA-1-81 és un anticòs muri que reconeix determinats epítops de proteïnes humanes que únicament s'expressen en cèl·lules pluripotents, i que deixen d'expressar-se quan la cèl·lula entra en procés

de diferenciació. Igual que l'activitat de la fosfatasa alcalina, que és molt més elevada en cèl·lules mare o pluripotents.

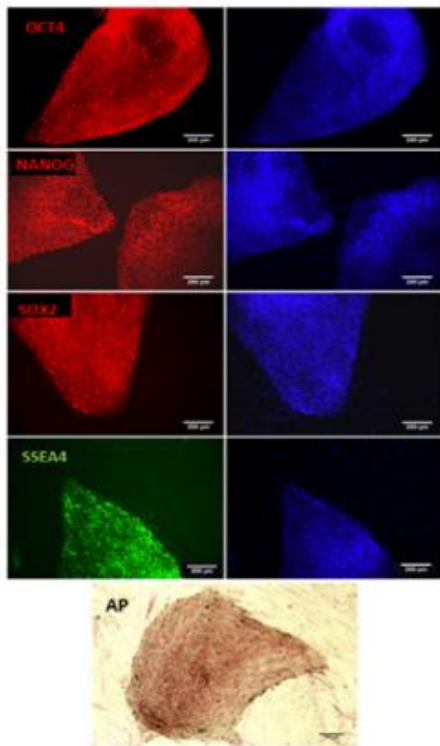


Figura 26: Immunofluorescència que mostra l'expressió de marcadors de pluripotència: factors de transcripció *OCT-4*, *NANOG*, *SOX2*, i marcadors de superfície *SSEA-4*

Tinció blava: DAPI

AP: tinció positiva de l'activitat fosfatasa alcalina

(Scale bars 500µm)

Assaig teratoma

La capacitat que tenen les cèl·lules pluripotents de formar teratoma és una altra de les característiques que s'han de comprovar quan es treballa amb aquest tipus cel·lular. El procediment que es va seguir per aquest assaig està descrit a l'apartat 3.9.3 (C) de material i mètodes.



Figura 27: Imatge del teratoma 5 setmanes post-injecció

Es va extreure el teratoma i es comprovà que el tumor contenia cèl·lules derivades de les tres capes germinals: endoderma (teixit que dóna lloc a la major part d'òrgans interns tous); ectoderma (teixit que dóna cèl·lules neuronals i retina) i mesoderma (teixit que dóna lloc a cèl·lules de múscul estriat, ossos, cartílag i teixit adipós).

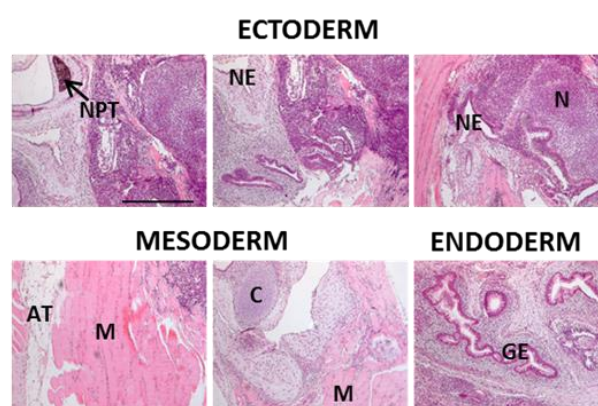


Figura 28: Imatges obtingudes amb microscopi òptic de les 3 capes germinals: ectoderma, mesoderma i endoderma

NPT: teixit neural pigmentat NE: neuroepitelial N: neural AT: teixit adipós
C: cartílag M: múscul GE: epitelí intestinal
(Scale bar: 500 µm)

Anàlisi cariotip

L'anàlisi del cariotip es va realitzar per comprovar la integritat del genoma de les iPSCs. Es va dur a terme segons les instruccions descrites a l'apartat 3.9.3 (D). És important comprovar que durant tot el procés de reprogramació, les cèl·lules no hagin patit cap tipus d'alteració cromosòmica, i així confirmar que el cariotip és idèntic a les cèl·lules originals de les quals provenen.

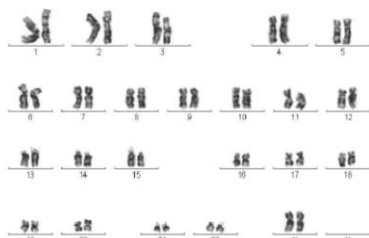
Código de Biobanco: 32140130008
 Código de Origen: *HdFs Clon1 P8*
 Petición de servicio: 32140022PC01

Fecha de entrada: 08/05/2014
 Tipo de muestra: LÍNEA CELULAR
 Técnica: Bandas G

Idioma de Biobanco: 32140126008
 Idioma de Origen: *HdFs Clon4 P8*
 Petición de servicio: 32140022pc01

Fecha de entrada: 08/05/2014
 Tipo de muestra: LINEA CELULAR
 Técnica: Bandas G

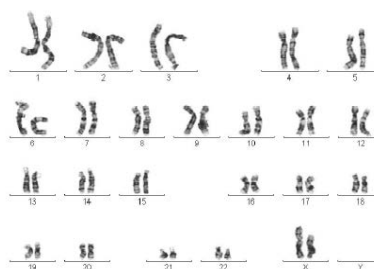
RESULTADOS ANÁLISIS CITOGENÉTICO



Cariotipo: 46,XX

Diagnóstico citogenético: Cariotipo femenino normal

RESULTADOS ANÁLISIS CITOGENÉTICO



iotipo: 46,XX

agnóstico citogenético: Cariotipo femenino normal

Figura 29: Anàlisi cariotip. Imatges de 2 clons diferents de les iPSCs (RP2-FiPS4F1) procedents de fibroblasts de la pacient.

RP2-FiPS4F1: cariotip normal femení (46, XX)

Fingerprinting

Per confirmar la identitat genètica entre fibroblasts d'origen i la línia d'iPSCs obtinguda a partir d'aquests, s'estudien uns determinats marcadors microsatèl·lits; els quals donen el percentatge d'identitat entre els dos tipus de cèl·lules. L'anàlisi d'aquests marcadors es realitzà seguint el procediment descrit a l'apartat 3.9.3 (E) de material i mètodes.

Taula 19: anàlisi fingerprinting on es mostra la igualtat de marcadors microsatèl·lits en ambdós tipus cel·lulars

STR	Fibroblasts	RP2-FiPS4F1
AMEL	X	X
CSF1PO	11, 13	11, 13
D13S317	11,14	11, 14
D16S539	13	13
D21S11	29,31	29, 31
D5S818	11, 12	11, 12
D7S820	9, 10	9, 10
TH01	9,3	9,3
TPOX	8, 12	8, 12
vWA	16, 17	16, 17

4.4- Diferenciació i caracterització de cèl·lules específiques RPE

Les cèl·lules d'epiteli pigmentari retinià es van obtenir a partir de iPSCs mitjançant el procediment de diferenciació descrit a l'apartat 3.9.4 de material i mètodes. Per microscòpia electrònica es comprovà la morfologia i la pigmentació característica d'aquest tipus cel·lular. La caracterització es realitzà a partir de l'expressió de marcadors específics de cèl·lules RPE, tal i com es descriu a l'apartat 3.9.4 de material i mètodes. Aquestes cèl·lules també van quedar caracteritzades posteriorment, amb els resultats obtinguts a partir del transcriptoma, mostrant expressió característica de gens específics de retina, com: *NRL*, *RP1*, *ROM1*, *PRPH2*, etc.

(resultats no publicats)

4.5- Anàlisi expressió diferencial

4.5.1- Anàlisi RNA total extret

S'avalua la qualitat del RNA extret, tant de cèl·lules RPE diferenciades com dels fibroblasts originaris, segons l'apartat 3.2.3 de material i mètodes.

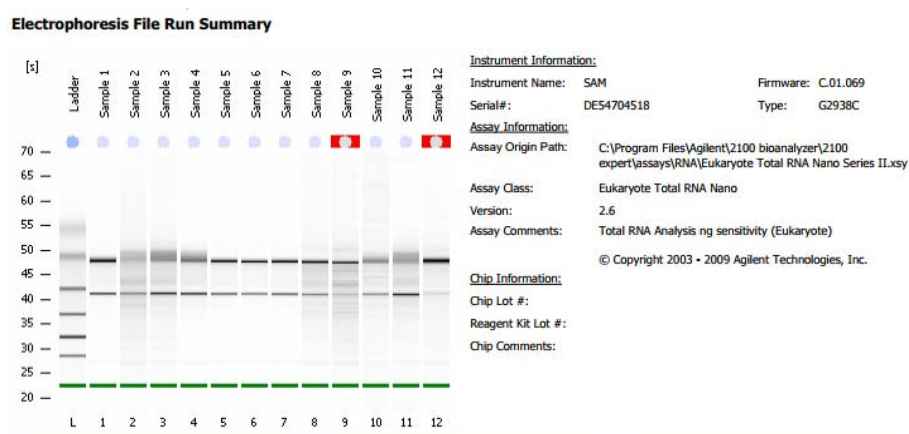


Figura 30: quantificació RNA total de les 12 mostres de RNA.

Als carrils electroforètics es poden observar dues bandes a cada mostra, corresponents a les subunitats 28S i 18S del rRNA. (Agilent 2100 bioanalyzer)

4.5.2- Control de qualitat RNAseq

La seqüenciació de RNA es va realitzar segons el descrit a l'apartat 3.9.5 de material i mètodes. L'experiment es realitzà sobre 3 rèpliques de cada condició. El nombre de lectures abans i després de la quantificació i normalització es mostra a la taula 20.

Taula 20: Nombre de lectures de seqüència.

Per cada mostra es presenta la condició (Cond), el nombre de lectures sense filtrar (Raw Cts), el nombre de comptes després del pre-processament (After.PP), el percentatge de lectures duplicades (P.Dup), el nombre de lectures alineades (Aligned), el percentatge de lectures alineades (P.Al), mida de llibreria utilitzada per la normalització (Lib.Sz) i els factors de normalització (Norm.F)

Sample	Cond	Raw.Cts	After.PP	P.Dup	Aligned	P.Al	Lib.Sz	Norm.F
FibroLPaciente1	FibroPaciente	12170413	12131734	59.9	11226083	92.5	11213291	0.84991
FibroLPaciente2	FibroPaciente	20756110	20665015	64.7	18888150	91.4	18863116	0.82923
FibroPaciente	FibroPaciente	114186450	111176460	82.7	100001815	89.9	99873892	0.86065
FibroLSano3	FibroSano	20972604	20923190	64.8	19455481	93.0	19433992	0.83934
FibroLSano4	FibroSano	14833268	14800329	60.6	13710987	92.6	13695962	0.81958
FibroSano	FibroSano	96704540	95609961	90.7	83433968	87.3	83306552	0.99811
RPEPaciente	RPEPaciente	103766579	98160986	86.9	84530367	86.1	83843475	1.17766
RPE_Paciente5	RPEPaciente	23382992	23350836	61.2	20515557	87.9	20451966	1.09197
RPE_Paciente6	RPEPaciente	23344768	23303759	60.5	20772952	89.1	20729671	1.05850
RPE_Sano	RPE_Sano	131160522	127671673	76.9	100073160	78.4	99738712	1.24777
RPE_Sano7	RPE_Sano	28829147	28767062	59.2	23916828	83.1	23842443	1.22079
RPE_Sano8	RPE_Sano	32146709	32077996	66.3	27479121	85.7	27403336	1.15807

L'anàlisi final dels resultats de l'expressió diferencial es realitzà amb les dades de les 3 rèpliques, ja que el percentatge de lectures alineades en els protocols dels experiments estàndards entraven dins el rang esperat: 85-90%.

Agrupació de mostres

Les figures 31 i 32 mostren com s'agrupen les diferents poblacions cel·lulars en funció de la condició o fenotip (sa o malalt) i el tipus cel·lular (fibroblast o cèl·lula RPE). Aquest és un anàlisi que presenta la variació biològica entre les mostres, basant-se en l'expressió dels gens més característics de cada població cel·lular.

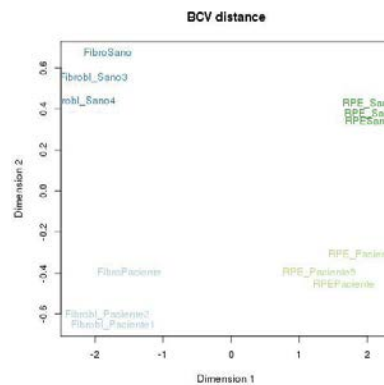


Figura 31: Agrupació de mostres.

L'agrupació de mostres es realitza comparant el nivell d'expressió dels 500 gens que presenten les desviacions estàndards més elevades entre mostres. Les distàncies es poden interpretar com el coeficient de variació biològica (BCV)

La següent figura és un gràfic de correlació o "Heatmap", la qual ens dóna informació de la correlació dels gens expressats entre cada rèplica. Compara tots els gens expressats a cada un dels tipus cel·lulars, contra tots els altres. D'aquesta manera s'elaboren els dendrogrames. Els CPM són els "counts per milions"

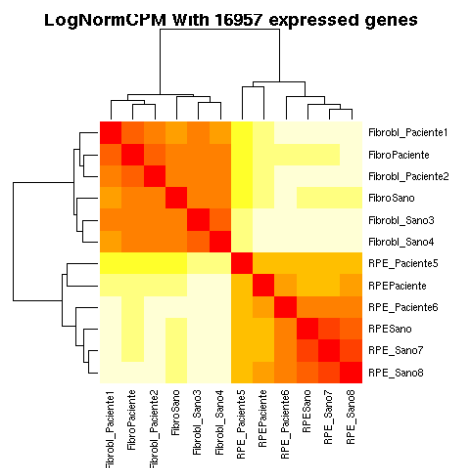


Figura 32: Gràfic de correlació

Distància per parells entre les mostres; calculada per comparació del nivell d'expressió [$\log_2(\text{normalized CPM})$] de tots els gens seleccionats coma expressats. Les distàncies creixents estan representades per colors que varien des del vermell al blanc.

4.5.3- Resultats expressió diferencial

Per la realització d'aquest anàlisi estadístic, amb el paquet Limma 3.32.15 només es van considerar aquells gens que almenys tenien un compte/milió en com a mínim 3 mostres.

Expressió diferencial general

El nombre de gens diferencialment expressats (amb ajust p-value <0.05) obtinguts segons el fenotip, va ser de 193 pels fibroblasts i de 5212 per cèl·lules RPE.

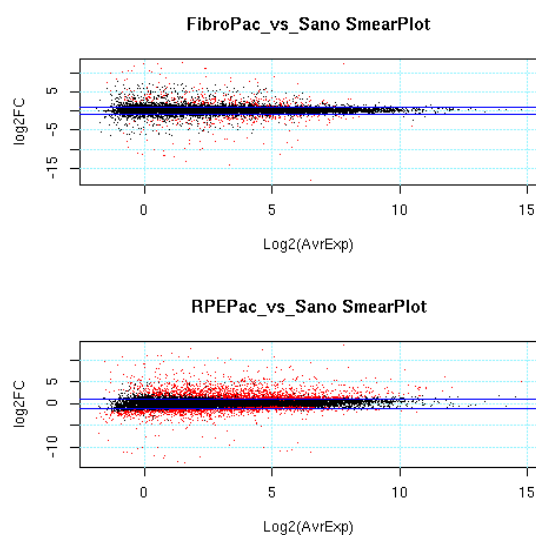


Figura 33: Diferències de nivell d'expressió (\log_2FC) versus la mitjana d'expressió ($\log_2(AvgExp)$) de totes les mostres, per a cada gen individual.

Els gens diferencialment expressats (p-value ajustat <0.05) es mostren com a punts vermells. Les línies blaves corresponen al \log_2FC entre 1 i -1; que són els canvis entre 2 i -2.

Expressió diferencial de gens específics (llista RP)

Els gens diferencialment expressats entre cèl·lules RPE de pacient i de sa era tan elevat (5212), que s'inicià l'estudi d'expressió diferencial dels gens continguts a la llista RP, elaborada segons apartat 3.9.6 de material i mètodes. D'aquesta manera només s'estudia la variació l'expressió de gens específics de retina, ja que la patologia es dona en aquest òrgan. Al observar el comportament d'aquests gens en

cèl·lules RPE, es van trobar 46 gens de la llista RP diferencialment expressats: 29 gens sobre-expressats en cèl·lules RPE de pacient i 17 infra-expressats (o sobre-expressats en RPE control). En canvi, en fibroblasts, únicament es trobà el gen *RIMS1* diferencialment expressat (sobre-expressat en pacient).

A les taules 21 i 22 es mostren amb detall els gens de la llista RP que estan activats o reprimits en cèl·lules RPE, de forma significativa: amb un p-valor ajustat inferior a 0.05

Taula21: gens específics RP sobre-expressats en cèl·lules RPE de pacient vs sa

ENSEMBL	Symbol	Adj. p.value	Fold change
ENSG00000166278	<i>C2</i>	0.003808518	6,544
ENSG00000100997	<i>ABHD12</i>	0.003994548	2,250
ENSG00000119681	<i>LTBP2</i>	0.004001815	8,534
ENSG00000243649	<i>CFB</i>	0.004301115	4,674
ENSG00000156973	<i>PDE6D</i>	0.005901446	2,048
ENSG00000108370	<i>RGS9</i>	0.006856765	3,086
ENSG00000198513	<i>ATL1</i>	0.006891962	3,672
ENSG00000136425	<i>CIB2</i>	0.00888479	3,059
ENSG00000065154	<i>OAT</i>	0.00968424	1,615
ENSG00000118217	<i>ATF6</i>	0.01062804	1,431
ENSG00000197579	<i>TOPORS</i>	0.01169506	1,429
ENSG00000127838	<i>PNKD</i>	0.01216932	0,012
ENSG00000125741	<i>OPA3</i>	0.01312338	1,366
ENSG00000122550	<i>KLHL7</i>	0.01509543	1,352
ENSG00000172071	<i>EIF2AK3</i>	0.01727047	1,533
ENSG00000124659	<i>TBCC</i>	0.01735226	1,766
ENSG00000091482	<i>SMPX</i>	0.02544323	2,462
ENSG00000171202	<i>TMEM126A</i>	0.02687646	1,608
ENSG00000186868	<i>MAPT</i>	0.02851929	5,171
ENSG00000163359	<i>COL6A3</i>	0.02954519	15,238
ENSG00000123240	<i>OPTN</i>	0.03068763	1,665
ENSG00000135338	<i>LCA5</i>	0.03118708	1,570
ENSG00000102119	<i>EMD</i>	0.03611101	1,389
ENSG00000122507	<i>BBS9</i>	0.03902125	1,343
ENSG00000118402	<i>ELOVL4</i>	0.04019646	1,915
ENSG00000215612	<i>HMX1</i>	0.04633148	18,513
ENSG00000138175	<i>ARL3</i>	0.01409435	1,961
ENSG00000102931	<i>ARL2BP</i>	0.009002576	1,742
ENSG00000176842	<i>IRX5</i>	0.03428439	2,725

Taula22: gens específics RP reprimits en cèl·lules RPE de pacient vs sa

ENSEMBL	Symbol	Adj. p.value	Fold change
ENSG00000162769	<i>FLVCR1</i>	0.002168256	-2,216
ENSG00000144061	<i>NPHP1</i>	0.008660831	-2,149
ENSG00000113971	<i>NPHP3</i>	0.01004924	-1,987
ENSG00000177082	<i>WDR73</i>	0.01004924	-1,728
ENSG00000157796	<i>WDR19</i>	0.01090329	-1,900
ENSG00000095397	<i>WHRN</i>	0.01372455	-1,615
ENSG00000042317	<i>SPATA7</i>	0.01372455	-1,615
ENSG00000079841	<i>RIMS1</i>	0.01488952	-2,157
ENSG00000096093	<i>EFHC1</i>	0.02750142	-2,053
ENSG00000164073	<i>MFSD8</i>	0.02831847	-1,558
ENSG00000117360	<i>PRPF3</i>	0.02914364	-1,409
ENSG00000138002	<i>IFT172</i>	0.03127648	-1,581
ENSG00000131697	<i>NPHP4</i>	0.0397236	-1,426
ENSG00000198707	<i>CEP290</i>	0.04828991	-1,580
ENSG00000046651	<i>OFD1</i>	0.004687297	-1,739
ENSG00000167434	<i>CA4</i>	0.04370844	-16,563
ENSG00000112232	<i>KHDRBS2</i>	0.0006483311	-174,723

En fibroblasts, només el gen *RIMS1* (ENSG00000079841) dels específics de la llista RP va presentar expressió diferencial entre pacient i control (Adj p-value=0.00292; fold-change=13.5)

Anàlisi funcional dels gens diferencialment expressats en cèl·lules RPE

L'anàlisi de sobre-representació dels gens diferencialment expressats orientat als processos biològics GO va mostrar 30 *gene sets* estadísticament significatius per a un punt de tall de p-value 0.001. A la figura 34 es troben representats només els 20 *gene sets* més significatius per aquest estudi; dels quals els que cal remarcar són tots aquells relacionats amb el processament de mRNA i *splicing*, i la regulació dels processos de catabolisme proteic.

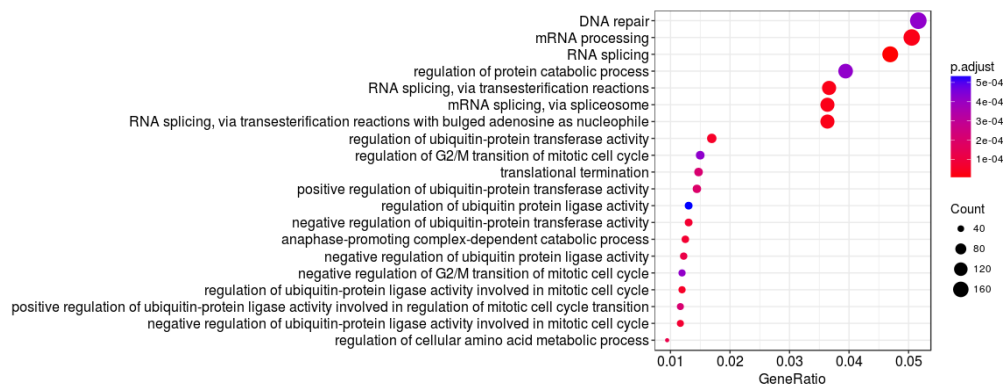


Figura 34: Dotplot for 20 most significant GO biological processes gene-sets in retina.

L'anàlisi de sobre-representació dels gens diferencialment expressats que integren les rutes metabòliques KEGG, està representat a la figura 35. Els que són rellevants en aquest estudi són les famílies de gens que intervenen en: la formació del spliceosoma, el processament proteic al reticle endoplasmàtic, l'exportació de proteïnes, la fosforilació oxidativa i la formació del proteasoma. La major part dels gens diferencialment expressats que formen part del proteasoma, del sistema UPR (Unfolded protein response), i de la fosforilació oxidativa; es troben sobre-expressats en RPE de pacient.

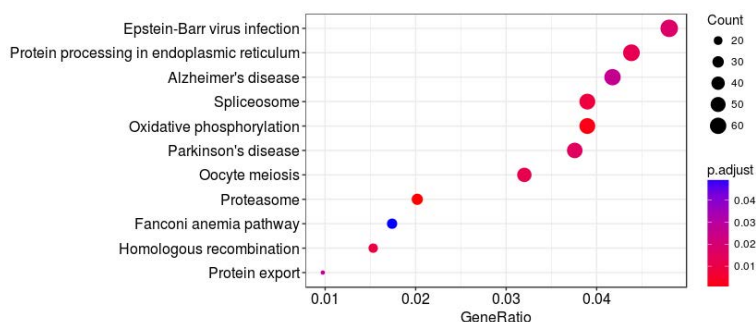


Figura 35: Results of KEGG pathways gene-sets over-representation analysis (FDR < 0.01) in retina (Patient Vs Control).

Segons aquestes dues aproximacions, entre els processos biològics més significatius, destaquen aquells relacionats amb el *splicing* i la degradació/processament de proteïnes per ubiquitinació. Entre els gens diferencialment expressats (activats en RPE de pacient) relacionats amb la ubiquitinació es troben: *NEDD4*, *TOPORS*, *SIAH1*, *KLHL7*, *RanBP2*, *PIAS3*, *UCH-L3*, *UCH-L1/PGP9.5*, *USP11*, *UBE2B*, *UBE2K* i *UBE2E3*.

4.5.4- Anàlisi d'esdeveniments de *splicing* i estudi d'isoformes

Estudi *splicing* alternatiu

Cèl·lules RPE: comparació pacient Vs control

SwitchSeq va identificar 1795 isoformes subjectes a variació o *switching*. A la figura 36 es mostra la distribució d'isoformes que presenten variació de transcrits en comparar cèl·lules de RPE entre pacient i control.

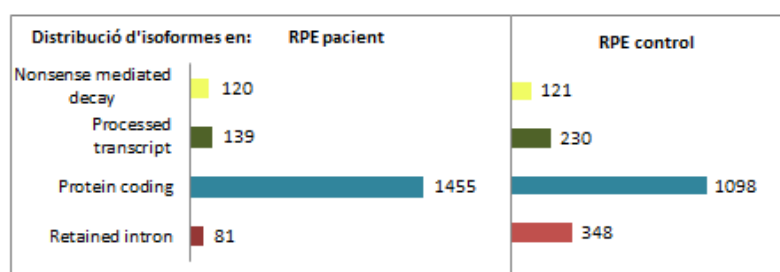


Figura 36: Distribució d'isoformes en cèl·lules RPE de pacient i control.

En aquest contrast, que permet veure la distribució del nombre d'isoformes en el mateix tipus cel·lular, però diferent condició patològica, s'observa una disminució del nombre d'isoformes amb retenció d'introns al cas de les cèl·lules pacient (4.5%) respecte del control (19%); i un augment d'isoformes potencialment codificants (81% en pacient i 61% en control).

Amb la eina DEXSeq s'analitzà la utilització diferencial d'introns. En cèl·lules RPE va mostrar 16802 esdeveniments d'utilització diferencial d'introns. La distribució d'aquests esdeveniments entre pacient i control es troba representada a la figura 37.

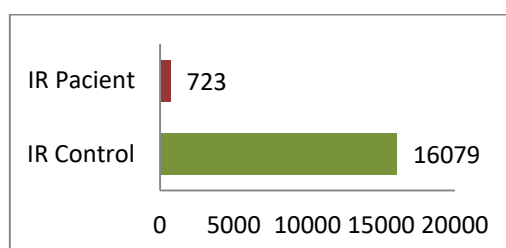


Figura 37: Utilització diferencial d'introns en cèl·lules RPE.

IR: intron retention

Aquest contrast mostra com les cèl·lules RPE de pacient presenten molt menys fenòmens de retenció d'introns que les del control (22 vegades menys).

Fibroblasts: comparació pacient Vs control

En fibroblasts, SwitchSeq va identificar 1339 esdeveniments de *switching*. El perfil de les isoformes en funció del biotip (figura 38), van resultar pràcticament idèntics entre fibroblasts de pacient i control.

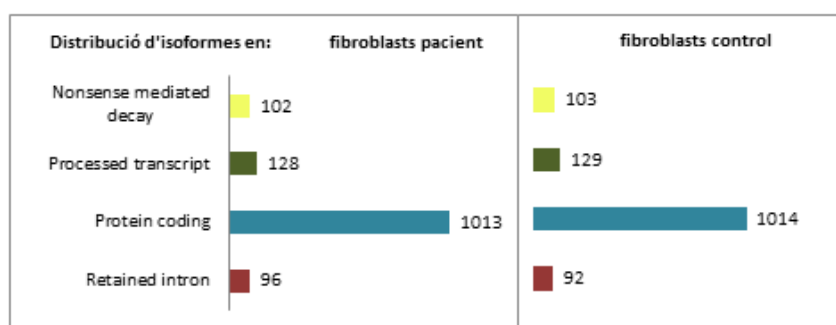


Figura 38: Distribució d'isoformes en fibroblasts de pacient i control

Aquest contrast mostra una distribució molt similar entre els diferents tipus de transcrits en fibroblasts de pacient i de control.

La eina DEXSeq va mostrar només 42 esdeveniments de retenció d'introns en fibroblasts. La distribució d'aquests esdeveniments entre pacient i control es troba representada a la figura 39.

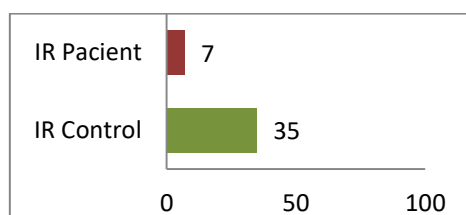


Figura 39: Utilització diferencial d'introns en fibroblasts.

IR: intron retention

En fibroblasts, el procés de retenció d'introns suposa 5 vegades més en control que en pacient.

Pacient: comparació cèl·lules RPE Vs fibroblasts

En mostres de pacient, SwitchSeq va mostrar 2078 gens amb *switching* d'isoformes. La distribució per biotips a cada tipus cel·lular es mostra a la figura 40.

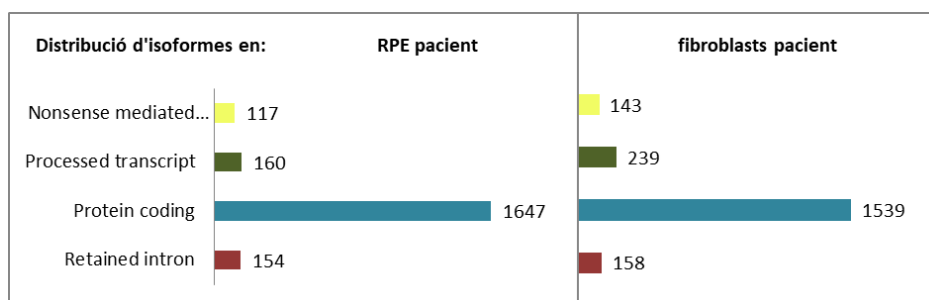


Figura 40: Distribució d'isoformes entre cèl·lules RPE i fibroblasts de pacient.

En pacients, tal i com es pot veure a la figura 42, el perfil d'isoformes que mostren *splicing* alternatiu és similar entre fibroblasts i cèl·lules RPE. El percentatge de transcrits potencialment codificants és del 79% en cèl·lules RPE i del 74% en fibroblasts; i el percentatge de transcrits amb retenció d'introns és del 7.4% en cèl·lules RPE i del 7.7% fibroblasts.

DEXSeq en pacient va detectar 7104 esdeveniments de retenció d'introns. La distribució entre els tipus cel·lulars es troba representada a la figura 41.

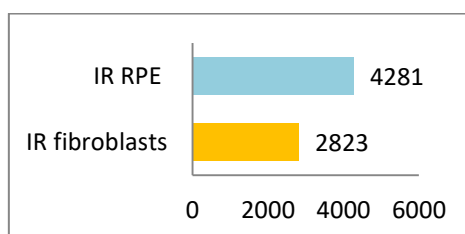


Figura 41: Utilització diferencial d'introns en pacient

. IR: intron retention

Control: comparació cèl·lules RPE Vs fibroblasts

En mostres control, al comparar la utilització d'isoformes entre fibroblasts i cèl·lules RPE, es va detectar variació en 2600 variants transcripcionals.

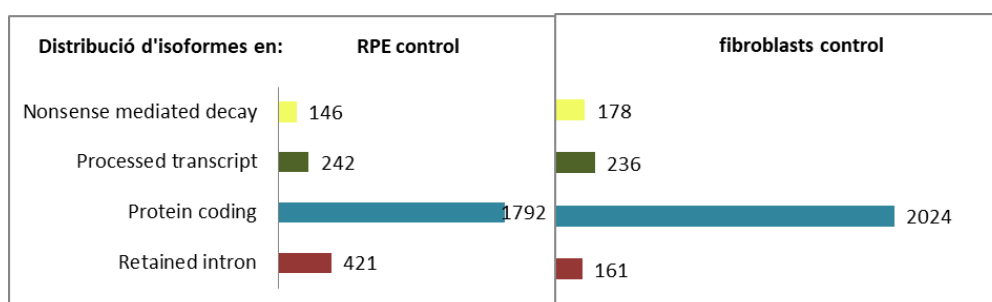


Figura 42: Distribució d'isoformes entre cèl·lules RPE i fibroblasts en control.

A la figura 42, es representa la distribució de les variants transcripcionals per biotips en els diferents tipus cel·lular (RPE i fibroblasts) del control. Es pot observar com les variants transcripcionals varien a cada tipus cel·lular, essent els transcrits amb més diferència els que donen retenció d'introns amb un 16% en cèl·lules RPE i un 6% en fibroblasts.

En mostres control; a diferència de les mostres de pacient on el perfil de transcrits entre tipus cel·lular era molt similar; el perfil d'isoformes relatiu varia molt més, sobre tot en aquells que donen lloc a la retenció d'introns, essent molt més elevat al tipus cel·lular RPE.

DEXSeq en control va trobar 28260 esdeveniments de retenció d'introns. La distribució d'aquests esdeveniments entre fibroblasts i cèl·lules RPE de control es troba representada a la figura 43.

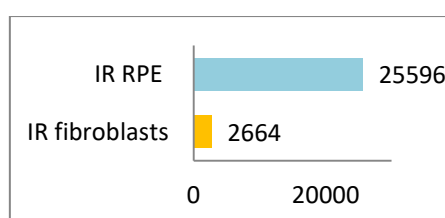


Figura 43: Utilització diferencial d'introns en control.

IR: intron retention

En mostres de pacient, el fenomen de retenció d'introns és molt superior en cèl·lules RPE que en fibroblasts. Però si es compara aquesta diferència de retenció d'introns entre cèl·lules RPE i fibroblasts; en pacient i en control; la diferència és molt superior entre cèl·lules de control (9,6 vegades més), que entre cèl·lules de pacient (1,5).

Estudi isoformes

Dins les possibles funcions cel·lulars que semblen diferenciar-se en cèl·lules RPE mutades en *PRPF8*, que es relacionen amb la RP, destaca la funció ciliar. Dels gens de la llista RP, hi ha un exemple on es pot visualitzar la variació d'isoformes transcrits i la utilització diferencial d'introns i exons en funció de si la cèl·lula RPE en estudi és salvatge (control) o mutada (pacient). Per aquest estudi es van utilitzar les eines bioinformàtiques anteriors.

El gen *UNC119* va mostrar variació d'isoformes i utilització diferencial d'exons i introns al comparar cèl·lules RPE. La mateixa comparativa en fibroblasts no va donar diferències significatives entre isoformes. A la taula 23 venen representades les proporcions de les diferents isoformes obtingudes per ASapp en cèl·lules RPE. Es pot observar com al control, la isoforma majoritària és la ENST00000301032; i en canvi, al pacient, la isoforma predominant és ENST00000335765. ASapp no va mostrar cap fenomen de variació al comparar els transcrits dels fibroblasts, on tant a pacient com a control, la isoforma majoritària és la ENST00000335765 amb un 69% i un 67%, respectivament. Entre fibroblasts, el perfil dels transcrits entre pacient i control són molt similars, al contrari que el que es pot observar entre els transcrits de les cèl·lules RPE.

Taula 23: proporció de les diferents isoformes seqüenciades del gen *UNC119* en cèl·lules RPE

TRANSCRIPTS	Iso% CONTROL	Iso% PATIENT	Biotype	Description
ENST00000301032	40.65*	29.98	Prot cod (B)	CCDS11234
ENST00000335765	15.56	46.08*	Prot cod (A)	CCDS11233
ENST00000470125	5,7	1,46	Prot cod	
ENST00000484980	17.05	8.78	Prot cod (C)	CCDS82094
ENST00000487844	10,64	5,64	Retained intron	
ENST00000578434	10,3	7,2	Retained intron	

* Major isoform in that condition.

A la figura 44 es veu representada la utilització diferencial d'exons per al gen *UNC119*, la qual confirma la diferent proporció de transcrits que es mostra a la taula 23 per a cada condició. E13 està més expressat en control, i està associat exclusivament a la isoforma ENST00000484980. E4 s'associa a ENST00000301032, que també es troba més expressada en control. Els exons E8, E9, i E17, que es troben més expressats en pacient, s'associen també a la isoforma ENST00000335765, que també és més abundant en pacient. E10 està associat exclusivament a la isoforma ENST00000487844, que presenta retenció d'intró i estaria més expressada en RPE control.

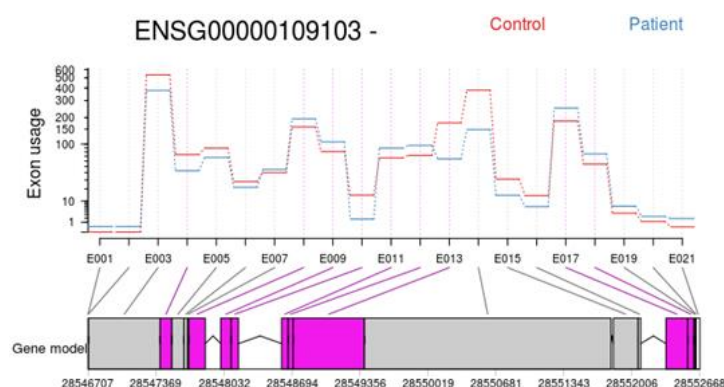


Figura 44: Utilització diferencial d'exons de *UNC119* en cèl·lules RPE

Els exons color lila presenten diferències estadísticament significatives.

La isoforma A consta de 240 aminoàcids. És la forma canònica i la que es troba de forma majoritària i en igual proporció, entre fibroblasts de pacient i control. En RPE de pacient segueix sent la majoritària amb un 46%. En canvi a RPE control, aquesta isoforma disminueix fins a un 15 %, en augment d'altres isoformes com la B, la C i d'altres no codificants amb retenció d'intró. De fet, la isoforma B (majoritària en control amb un 40%), consta de 220 aminoàcids degut a que en el procés de *splicing*, es reté un intró que provoca un canvi en el marc de lectura i l'aparició d'un codó stop; essent el seu extrem C-terminal completament diferent al de la forma

canònica. La isoforma C, de 145 aminoàids, també augmenta considerablement en RPE control respecte del pacient, la qual és idèntica a la isoforma A, des de la metionina 96 fins a l'aminoàcid 240; essent la part N-terminal la que les diferencia.

Discussió

5.- DISCUSSIÓ

Seqüenciació massiva per captura en panells dirigits

Donada la trajectòria de la Unitat de Genètica Molecular (UGM) de l'Hospital de Terrassa en la detecció de mutacions causants de la retinosi pigmentària autosòmica dominant (adRP), es va dissenyar un panell dirigit de seqüenciació massiva, que pogués permetre el diagnòstic de no només la adRP, si no també les formes recessives, lligades al cromosoma X, i també d'altres tipus de distròfies de retina.

Es van analitzar 21 pacients, que presentaven una clínica de patologia retiniana, amb el panell dirigit dissenyat a la UGM: Rpv1-GeneSGKit[®]. Nou d'aquests pacients (43%) van poder ser diagnosticats, ja que es van trobar les mutacions causants de la malaltia. Tres d'ells presentaven la malaltia de Stargardt, que s'hereta de forma recessiva, als quals se'ls va trobar dues mutacions prèviament descrites, al gen *ABCA4*. Els altres 6 pacients presentaven una RP autosòmica recessiva, trobant-se les 2 mutacions als següents gens: *PDE6A*, *CNGB1*, *USH2A*, *EYS*, *PRCD* i *CNGA1*.

A 5 pacients dels pacients analitzats (24%), se'ls va trobar possibles variants candidates a ser la causa de la distròfia de retina que presentaven. Es parla de possibles variants, ja que no estan descrites a la bibliografia, però tot i així, es van filtrar degut a la seva freqüència en la població inferior al 1%; i a més, complien amb el tipus de variant i amb la predicció de conseqüències de mutació que podria donar lloc a la patogenicitat.

El pacient 1 (taula 11 de resultats), venia amb diagnòstic oftalmològic de Stargardt. Tenia una germana afectada i pares sans, la qual cosa coincideix amb l'herència recessiva d'aquest síndrome. No es va trobar cap mutació al gen *ABCA4*, que és el

que es troba més freqüentment mutat en aquests casos. Però se'l trobà una variant no descrita en una regió de *splicing* al gen *PROM1* (c.303+2T>C), el qual està associat a distròfia de cons i bastons, arRP i Stargardt. Al no tenir mostres de més individus de la família, no s'ha pogut ampliar l'estudi familiar. A més, caldria trobar una segona mutació per poder arribar al diagnòstic definitiu. En aquest pacient també se'n trobà una nova variant missense (c.1238A>C) al gen *TOPORS*. Aquest gen està associat a RP autosòmica dominant, i com que el fenotip és Stargardt, seria poc probable que aquesta variant sigui la causant.

Al pacient 5 (taula 11 de resultats), que es va presentar com a cas aïllat, es van trobar 4 variants missense als gens *RP1L1*, *VCAN* i *LRP5*; totes elles descrites amb significat incert. El gen *RP1L1* està associat a distròfia macular oculta, que s'hereta de forma dominant (Akahori *et al.*, 2010). El gen *VCAN* està associat a vitroretinopatia de Wagner, que també s'hereta de forma autosòmica dominant (Miyamoto *et al.*, 2005; Kloeckener-Gruissem *et al.*, 2013). El gen *LRP5* està associat a vitroretinopatia exsudativa, que s'hereta tant de forma dominant (Toomes *et al.*, 2004) com recessiva (Jiao *et al.*, 2004). Cap d'aquestes 4 variants es va poder associar amb certesa a la malaltia del pacient. Els pares, al no ser afectes, descartarien una mutació d'herència dominant, com és el *RP1L1* i *VCAN*; a no ser que fos una mutació *de novo*. En el cas que l'herència fos recessiva, faltaria la segona mutació al gen *LRP5*.

El pacient 8 (taula 11 de resultats), amb possible distròfia de cons o Stargardt, també va arribar de forma aïllada. Se'l van trobar 3 variants al gen *ABCA4*, de les quals dues d'elles, es troben en llocs de *splicing* (c.1356+4A>G i c.2744-5C>T) i són de significat incert. La tercera variant (p.Gly961Glu) està descrita com a patogènica. També se li va trobar una altra variant de significat incert (p.Tyr43Cys) al gen *RHO*. Cap de les quatre variants trobades es va poder associar de forma

clara a la malaltia de Stargardt o distròfia de cons que presentava el pacient, per manca de mostres d'altres individus de família; ja que el cas va arribar de forma aïllada. El gen *ABCA4* està associat a la malaltia de Stargardt (herència recessiva). Com que només va sortir una mutació patogènica, no es va poder completar el diagnòstic perquè faltava la segona mutació al mateix gen. De les dues trobades amb significat incert que es troben en llocs de *splicing*, no se'n coneix si podrien alterar el processament del gen donant lloc a una proteïna anòmala; tot i que els predictors *in silico* no prediuen un possible efecte patogènic. El fet de no tenir mostres d'altres individus de la família, tant afectes com sans, no va permetre saber amb certesa si alguna d'aquestes dues variants era causant de la malaltia juntament amb la descrita com a patogènica.

La mutació c.128A>G (p.Tyr43Cys) al gen *RHO* està descrita en pacients amb RP (Stone 2003). Fins ara, totes les mutacions descrites al gen *RHO* s'han associat a retinosi pigmentària, o a ceguesa nocturna congènita; però mai al fenotip de Stargardt o distròfia de cons, que és el que presentava el pacient. Es recomanaria la revisió del examen oftalmològic, tenint en compte que el pacient té un fenotip Stargardt, que podria emascarar el fenotip de RP provocat per la mutació en *RHO*.

Al pacient 10 (taula 11 de resultats), amb fenotip de Stargardt, es van trobar dues variants no descrites. Una d'elles és una variant *missense* (p.Gly607Val) al gen *ABCA4*, associat a malaltia de Stargardt; que per diagnosticar-lo, faria falta trobar una segona mutació, ja que és d'herència recessiva. El fet que manqui aquesta segona mutació no permet el diagnòstic definitiu, que concordaria amb el fenotip del pacient. La segona variant trobada és una *frameshift* (p.Tyr452LeufsTer13) que es troba al gen *PROM1*. Aquest gen està associat a la malaltia de Stargardt, però amb un patró d'herència autosòmica dominant. La variant c.1354dupT en heterozigosi d'aquest gen, podria ser la causa de la malaltia, però s'ha descrit a la bibliografia

com a causant de distròfia de cons (Pras *et al.*, 2009); no de Stargardt; i amb patró d'herència recessiva.

Al pacient 17 (taula 11 de resultats), que venia amb fenotip de RP, es van trobar dues variants no descrites, a gens associats a RP autosòmica dominant: *IMPDH1* i *RP1*. Es van analitzar les dues variants a la mare, que era afectada, i també les tenia; la qual cosa coincideix amb herència dominant. De les dues variants, segons la predicció de l'efecte, la p.Glu196Asp del gen *IMPDH1* dona lloc a un efecte deletori, mentre que la variant p.Asn1484Lys del *RP1* la predicció de l'efecte és benigne. Tot i així, no es va poder confirmar si alguna d'elles era causant directa de la malaltia, ja que no es van poder analitzar més individus de la família.

Als 7 pacients restants analitzats amb el panell (33%), no se'ls va trobar cap mutació, ni cap variant candidata a ser la responsable de la retinopatia que presentaven. Podria ser que les mutacions causants estiguessin en alguna regió no coberta pel panell, o bé que es trobessin en alguna regió intrònica.

Seqüenciació de l'exoma complet (WES) per a la detecció de gens candidats

Les seqüències codificants del genoma constitueixen un 1% (30Mb) del genoma. Més del 95% dels exons poden ser coberts per WES; i com que el 85% de les malalties genètiques d'herència mendeliana cauen en regions codificants i flanquejants; la seqüenciació de l'exoma, pot cobrir les mutacions que cauen en aquestes regions (Mahdie 2013). Per aquest motiu, el WES és una eina potencial per detectar noves mutacions en malalties hereditàries. En aquest treball, es va aplicar la seqüenciació de l'exoma complet per a la detecció de noves variants candidates a ser les causants de la retinosi pigmentària autosòmica dominant en quatre famílies prèviament diagnosticades d'adRP, però que no s'havien pogut resoldre per panell NGS. El fet de no haver-se trobat la mutació responsable de la

malaltia en els gens coneguts, va portar a pensar que possiblement les mutacions podrien estar en gens nous. Es va realitzar l'estudi de l'exoma comparatiu entre dos o més individus afectes i un sa de cada una de les quatre famílies.

A partir de l'anàlisi de 21 possibles variants procedents de l'exoma de la família RP65 (taula 12) es va arribar a una variant candidata a ser la causant de la malaltia situada al gen *COL6A6* (p.Gly103Arg), que segregava perfectament en tots els individus de la família. Al ser un gen nou que mai havia estat associat a retinosi pigmentària; es realitzà un estudi directe de la variant mitjançant FRET, a pacients de RP i també a individus sans, amb l'objectiu de comprovar si aquesta variant podria ser detectada en algun altre pacient amb RP o en la població control. El *COL6A6* és un gen que està a una distància d'una megabase del gen de la rodopsina (on es troben la major part de mutacions que provoquen adRP), la qual cosa implica un important lligament entre els dos gens, ja que la distància genètica és inferior a un centiMorgan. Aquest fet va portar a pensar que la mutació responsable de la malaltia estigués al gen *RHO*, i que la variant trobada al *COL6A6* no fos la causa de la malaltia, si no un marcador que s'heretaria lligat amb la mutació responsable. Com les anàlisis anteriors fetes per NGS al cas índex de la família, no van detectar cap tipus d'alteració en la seqüència de *RHO*, es va realitzar un anàlisi genòmic per MLPA, per descartar alguna deleció o duplicació no detectada per seqüenciació. L'anàlisi per MLPA es realitzà a 5 individus afectes i a un sa de la mateixa família; i els resultats van mostrar una deleció en l'exó 5 de *RHO* en tots els afectes, en comparació amb les mostres de referència. Aquesta deleció es confirmà a la resta d'individus de la família mitjançant seqüenciació directa per Sanger d'aquesta regió, trobant-se la deleció present en tots els individus afectes, i absent en els sans. Tot i que no es pot descartar completament que la variant en el gen *COL6A6* sigui la responsable de la RP en aquesta família, és més probable que sigui un marcador que s'hereta de forma lligada amb la

deleció trobada en el gen *RHO* (g.9281_10108del); essent aquesta última la mutació causant de la retinosi.

De l'estudi de l'exoma de la família RP83, es van estudiar 16 variants com a possibles candidates (taula 14), però cap d'elles es trobà en un altre individu afecte que no fos els seqüenciats per WES. Es van revisar els informes del diagnòstic oftalmològic dels diferents pacients, i l'aparició primerenca de la simptomatologia de RP en homes, i el fenotip variable en les pacients femenines va fer pensar que podria ser que l'herència no fos dominant. Com que a la família no hi havia transmissió home-home, es va dur a terme la valoració d'una possible herència lligada al cromosoma X. En primer lloc, es van estudiar per seqüenciació directa totes les variants filtrades procedent de l'exoma que es trobaven al cromosoma X. Totes van ser descartades perquè cap d'elles segregava amb la resta d'individus de la malaltia. Com que les anàlisis fetes anteriorment per seqüenciació massiva, no van detectar cap tipus de mutació en aquesta família, es va procedir a l'estudi de la regió ORF15 del gen *RPGR*, que és un gen associat a xLRP. La regió ORF15 (últim exó del gen) és una zona d'aquest gen que no queda ben coberta per seqüenciació massiva (Ruddle *et al.*, 2009) ja que és una regió de seqüència molt repetitiva, i un *hotspot* d'acumulació de mutacions. Mutacions al gen *RPGR* causen un 20% de la retinosi pigmentària lligada al cromosoma X; i el 75% d'aquestes mutacions cauen a la regió ORF 15 d'aquest. La seqüenciació directa d'aquesta regió va permetre detectar la mutació causant de la malaltia en aquesta família: una deleció d'un parell de bases que provocava un canvi en el marc de lectura, i l'aparició d'un nou codó de terminació. La mutació c.2763_2764delGG (p.Glu922GlyfsTer156) es va comprovar a tots els individus de la família, estant present a tots els individus afectes: els homes en hemizigosi amb un fenotip de RP més primerenc i sever; i les dones portadores de la mutació en heterozigosi, amb fenotips variables de la

malaltia, sent la miopia un dels primers símptomes en aparèixer, molt abans que la retinosi.

A la família RPF3, es van estudiar fins a 31 variants, la major part d'elles *missense* i també alguna a la regió de *splicing* (taula15). Cap d'elles va arribar a ser candidata a ser la causant de la malaltia, ja que no segregaven amb la resta d'individus de la família. Tot i afegir-se un nou membre afecte per la realització de l'exoma, i així poder acotar més les variants, no es va poder trobar la mutació. Podria ser que la mutació causant estigués en alguna regió exònica no coberta, o que s'hagués seqüenciat amb tan poca profunditat que no hagi passat els controls de qualitat de la seqüenciació. Altra hipòtesi podria ser que les mutacions estiguessin situades a parts més centrals dels introns, de manera que per WES no es seqüencien.

L'última família estudiada per WES va ser la RPN89. De 22 variants analitzades, dues d'elles van ser les candidates a ser les responsables de la RP. Aquestes variants es troben al mateix gen (*KIFC2*) i van lligades, ja que estan només a 3 nucleòtids de distància: c.600G>T (p.Gln200His) i c.604A>T (p.Ile202Phe). Les dues variants segregaven perfectament a tots els individus de la branca esquerra de la família (figura 22), excepte en un dels afectes (III.9), que no les presentava. El fet que aquestes variants apareguessin a 9 dels 10 individus afectes analitzats, i en cap dels 7 membres sans, va portar a pensar que si aquestes variants no eren la causa de la RP, la mutació responsable hauria d'estar en aquest cromosoma, donant lloc a una herència lligada entre aquestes variants i la mutació real. D'aquesta manera, l'absència de les variants en l'individu III.9, s'explicaria per pèrdua d'heterozigositat en aquesta regió. S'obrí la possibilitat que aquest individu tingués una deleció en aquesta regió. Per comprovar si la teoria de la homozigositat de l'individu III.9 es complia, es va fer un anàlisi d'haplotips. La seqüenciació de marcadors en heterozigosi (SNPs de freqüències en la població d'aproximadament

el 50%), a diferents distàncies de les variants de *KIFC2*, va mostrar que l'individu III.9 tenia una regió de 44Mb en homozigosi en comparació a la resta d'afectes (taula 17). Aquests resultats de l'haplotip implicaven, o una homozigosi al·lèlica, o bé, una homozigosi deguda a una deleció. La teoria de la deleció en aquesta regió va ser descartada a partir dels resultats obtinguts per anàlisi de MLPA; el qual va demostrar que no hi havia cap deleció en aquest individu; de manera que, es descartà que el gen *KIFC2* fos un nou gen candidat a la RP.

Les variants del gen *KIFC2* tampoc segregaven en la part dreta d'aquesta família. Però en aquesta branca de la família es detectà per MLPA una duplicació dels exons 9,10,11 i 12 de *PRPF31* en un individu afecte de RP i en 2 sans. Com que aquest gen té penetrància incompleta (Martinez-Gimeno *et al.*, 2003; Rose & Bhattacharya, 2016; Martin-Merida *et al.*, 2017) no es va poder descartar la hipòtesi que aquesta duplicació no fos la causa de la retinosi en la família. Es realitzà assaig de MLPA a 3 individus afectes de la branca esquerra de la família. El fet que dos d'ells (III.7 i IV.13) no presentessin la duplicació, va fer que es descartés aquesta duplicació com a única causa de RP en aquests individus. Els resultats obtinguts podrien ser compatibles amb el fet que hi haguessin dues mutacions diferents en la família causants de la RP (Jones *et al.*, 2017). Això podria explicar la dificultat en la resolució d'aquesta família.

En aquest cas, de les quatre famílies analitzades, només una d'elles (la RP65) va poder ser resolta per WES, i no de forma directa, si no per la variant marcador al gen *COL6A6*, que va a portar a pensar en alguna mutació al gen de la rodopsina. De les tres famílies restants, una es va resoldre per gràcies a la re-avaluació dels informes oftalmològics, que van desviar l'estudi cap a una RP lligada al cromosoma X; i les altres dues encara romanen sense resoldre. Aquests estudis mostren que l'exoma comparatiu d'individus sans i afectes d'una família, permet la detecció de variants que podrien ser causants de la malaltia genètica, com en aquest cas la

variant trobada al gen *COL6A6*. És, per tant, un bon mètode per la recerca nous gens candidats en malalties hereditàries. Tot i així, en aquest estudi s'han trobat certes limitacions de la tècnica, com poden ser:

- la consideració d'una variant com a causant, quan realment és un marcador que s'hereta de forma conjunta amb la mutació responsable. Aquest és el cas de la variant en *COL6A6* de la família RP65.
- mutacions que es troben en seqüències molt repetitives que no queden ben cobertes per seqüenciació massiva, com és el cas de la regió ORF15 del gen *RPGR* (família RP83).
- la presència de més d'una mutació en la família, causant de RP. Això fa que l'anàlisi per parells d'individus no sigui evident, de manera, que es complica la resolució de la família. Aquests fets són els que podrien tenir lloc a la família RPN89, on s'observa un patró d'herència diferent en dues branques.
- mutacions degudes a mitjanes o grans delecions i inversions, que no són detectades per seqüenciació massiva. Aquest seria el cas de la deleción en l'exó 5 de la *RHO* (família RP65), que no va ser detectada per NGS. La utilització d'algoritmes específics com Exome Hidden Markov Model (XHMM) pot pal·liar, en alguns casos, aquesta limitació (Almoguera *et al.*, 2015; Martin-Merida *et al.*, 2017).
- mutacions que es trobin en alguna regió codificant que no quedi detectada per seqüenciació, degut a la impossibilitat del WES de cobrir al 100% totes les regions exòniques.
- mutacions regions no codificants, com regions intròniques o reguladores.

Obtenció iPSCs i diferenciació a cèl·lules RPE

A la Unitat de genètica molecular (UGM) de l'Hospital de Terrassa es va resoldre una família amb adRP; on la mutació causant de la malaltia és una deleció de 21 parell de bases en l'exó 42 del gen *PRPF8* (pre-mRNA *splicing* factor 8) (Martinez Gimeno *et al.*, 2003). Aquesta mutació, trobada en heterozigosi, és: c.6974_6994del21bp (p.V2325fsX2329). Tot i que aquesta deleció es troba de forma ubiqua a totes les cèl·lules de l'organisme, únicament és patogènica a nivell de retina. Aquest gen és un dels factors de processament de pre mRNA que causen adRP (Martinez Gimeno *et al.*, 2003; Tanackovic *et al.*, 2011). El mecanisme pel qual les mutacions en aquest gen provoquen la malaltia encara es desconeix. Les mutacions associades a RP estan situades la secció C-terminal de *PRPF8* (Daiger *et al.*, 2013), igual que la mutació en estudi: una deleció de 21 parell de bases en l'exó 42 (últim exó que es troba en aquesta regió). Aquestes mutacions es troben en aminoàcids altament conservats en *PRPF8*; que donen lloc a un domini de la proteïna que és essencial per la unió i desunió dels diferents elements que formen el *spliceosoma*. Assajos *in vivo* e *in vitro* en llevat, mostren com els mutants *Prp8-RP*, afecten de forma directa a la unitat U5snRNP, i a la maduració del tri-snRNP (Boon *et al.* 2007 Mozaffari Jovin *et al.* 2014), la qual cosa dóna lloc a defectes en el processament de mRNA. Aquest domini C-terminal també és important per a la transició entre el primer i el segon pas del procés de *splicing*; de manera que mutacions en aquesta regió contribueixen a un incorrecte processament del mRNA (Mayerle *et al.*, 2016). També hi ha mutacions en PRPFs que s'han associat a defectes en la funció fagocítica de les cèl·lules RPE (Grazzioto *et al.*, 2011), i d'altres que s'associen a la inestabilitat genòmica que deriva a la mort cel·lular o apoptosi (Rubio-Peña *et al.*, 2015).

Anteriorment, a la UGM ja s'havien fet estudis per determinar el mecanisme patogènic específic d'aquesta mutació. Es va investigar en línies cel·lulars obtingudes per transformació amb el virus Epstein-Bar (EBV), procedents de limfòcits de pacients portadors de mutacions en gens PRPF relacionats amb el *spliceosoma* (Gamundi *et al.*, 2008). Es van analitzar mitjançant arrays a prop de 150000 exons, però els resultats obtinguts no van ser concloents per poder afirmar que aquests mutants exercien un mecanisme diferencial que pogués associar-se a la patogenicitat en aquestes cèl·lules (resultats no publicats). Altres grups que han investigat sobre el mateix tema han arribat a conclusions similars (Ivings *et al.*, 2008; Tanackovic *et al.*, 2011). Els resultats obtinguts pel nostre grup i d'altres, suggerien que els mecanismes patogènics d'aquests mutants són específics de cèl·lules de retina, la qual cosa explicaria que a partir de línies cel·lulars procedents de limfòcits, no s'obtingueren resultats concloents. Consegüentment, les cèl·lules de retina són l'únic material que permet l'estudi i la investigació dels possibles mecanismes patogènics que provoquen la RP.

Davant la impossibilitat de treballar amb cèl·lules específiques de retina procedents de l'individu afectat (caldrien biòpsies de retina), s'obre la possibilitat de treballar amb cèl·lules de RPE obtingudes per diferenciació a partir de iPSCs obtingudes del pacient. De manera que, a partir d'un *punch* (biòpsia de pell) del braç del pacient índex, i també d'un individu sa (control), es van realitzar cultius primaris de fibroblasts. A partir dels fibroblasts, mitjançant un procés de desdiferenciació (Lukovic *et al.*, 2017), es van obtenir cèl·lules pluripotents (iPSCs) mitjançant la utilització de factors de reprogramació (Takahashi i Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007). Degut a que la UGM no disposa de les instal·lacions ni el material necessari per a aquests tipus d'experiments; el procediment d'obtenció d'iPSCs a partir de fibroblasts, la posterior caracterització, i finalment, la diferenciació a cèl·lules de RPE; es van realitzar a Sevilla, al Centro Andaluz de Biología Molecular

y Medicina Regenerativa (CABIMER); en col·laboració amb la Dra. Dunja Lukovik. A l'apartat 4.3 de resultats es pot observar el procés de caracterització de les iPSCs pas a pas.

Estudi transcriptoma

Un cop obtingudes les cèl·lules RPE de control i de pacient correctament caracteritzades; es va realitzar l'anàlisi d'expressió diferencial sobre aquestes cèl·lules i sobre els fibroblasts del cultiu primari de les quals procedien. La seqüenciació del transcriptoma i la comparació entre l'expressió de determinats gens en cadascuna de les condicions (sa i malalt), i en cada tipus cel·lular (fibroblast i cèl·lula RPE); va permetre observar quines vies es veuen afectades per aquesta mutació, i com es poden relacionar amb la retinosi pigmentària del pacient. Això permet la investigació sobre el possible mecanisme patogènic d'aquesta mutació en concret.

Per a la realització d'un estudi complert de transcriptoma, com el que s'ha fet en aquest treball, es necessiten seqüenciadors de gran capacitat, com el Illumina HiSeq2500, del qual la UGM no disposa. És per aquest motiu, que l'estudi del transcriptoma es realitzà al Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC BioIT Unit) a Madrid, en col·laboració amb el grup de la Dra. Ana Dopazo.

La investigació del transcriptoma de cèl·lules pacient i control es va orientar en dues direccions d'acord a les hipòtesis de treball. D'una banda, s'investiga si hi ha algun gen o gens que s'expressen diferencialment i de forma significativa, entre les dues condicions, que es pugui relacionar amb el fenotip de RP del pacient. Per una altra banda, s'estudia si la mutació en el gen *PRPF8* del pacient, pot donar lloc a una diferència en l'expressió d'isoformes específiques, que es puguin associar a la RP. Així doncs, es van realitzar dos tipus d'estudis (apartats 4.5.3 i 4.5.4 de resultats), a partir dels transcriptomes obtinguts en les cèl·lules de pacient i de control. El primer

és l'estudi de l'expressió diferencial de gens i el segon és un estudi dels esdeveniments de *splicing* i distribució d'isoformes. L'expressió diferencial de gens es va dividir en dues parts: anàlisi de tots els gens diferencialment expressats i l'anàlisi de l'expressió diferencial específica d'uns gens determinats, procedents d'una llista específica de gens relacionats amb la RP. Posteriorment es realitzà un estudi de funcionalitat del total de gens diferencialment expressats.

Abans de començar a analitzar l'expressió diferencial es comprovà la qualitat de les lectures de seqüències de RNA tenint en compte el nombre de lectures per mostra, el percentatge de duplicats i el percentatge de bases alineades amb en transcriptoma de referència humana (GRCh38, release 76, agost 2014). Per tal d'obtenir resultats estadísticament significatius, es van llegir 3 rèpliques per mostra; i totes elles s'agruparen en funció de la seva expressió, en quatre grups diferenciats: fibroblasts sans, fibroblasts pacient, cèl·lules RPE sanes i cèl·lules RPE pacient. Això es pot observar a les figures 33 i 34 de resultats, on es veu la distribució les poblacions cel·lulars en funció dels 500 gens amb més expressió diferencial. Aquesta distribució concorda perfectament amb el tipus cel·lular i la condició patològica en estudi.

Anàlisi expressió diferencial

Per a aquest anàlisi, no només es van comparar cèl·lules específiques (RPE) on es detecta la patologia; si no, que també es van comparar cèl·lules de la pell (fibroblasts), que són cèl·lules procedents d'un òrgan diferent a l'afectat, i que per tant, no presenten patologia. D'aquesta manera, s'estableix una nova condició específica d'anàlisi: comparació de l'expressió gènica de cèl·lules amb mutació i cèl·lules salvatges, però sense patologia.

L'expressió diferencial del total de gens entre pacient i control, va mostrar 113 gens diferencialment expressats en fibroblasts, i 5212 en cèl·lules RPE. Una part

d'aquestes diferències en l'expressió gènica és inherent al fet que les mostres procedeixen d'individus diferents. Tot i així, el nombre de gens diferencialment expressats dins el mateix tipus cel·lular, és molt superior entre cèl·lules RPE que entre fibroblasts (46 vegades més); la qual cosa posa de manifest que la mutació en estudi afecta molt més l'expressió genètica de cèl·lules RPE, que no pas de fibroblasts. Això concorda amb que la mutació, tot i ser d'expressió ubíqua, les cèl·lules on l'expressió gènica es veu molt més alterada són les cèl·lules específiques de retina, que són les que manifesten la patologia.

Es realitzà un segon anàlisi on l'estudi es centrà en l'expressió diferencial dels gens relacionats amb la retinosi, comparant l'expressió diferencial d'uns determinats gens procedents d'una llista específica de 296 gens. Aquesta llista RP es va obtenir mitjançant la utilització de tècniques de *text mining*, les quals permeten fer una selecció tots els gens que hagin estat relacionats amb la RP, a partir d'evidències bibliogràfiques, tal i com s'explica al l'apartat 3.9.6 de material i mètodes.

De la llista RP de 296 gens, es trobaren 46 gens diferencialment expressats en cèl·lules RPE, essent 29 sobre-expressats en pacient versus sa (taula 21) i 17 infra-expressats (taula 22). En canvi, a fibroblasts, només es trobà diferencialment expressat el gen *RIMS1*. El fet que a fibroblasts només hi hagi un gen de la llista amb expressió diferencial, s'explica degut a que la llista està formada per tots aquells gens relacionats amb la RP, i que per tant, s'expressen de forma majoritària en cèl·lules de retina. De fet, 28 d'aquests 296 gens s'expressen de forma específica en retina, motiu pel qual seria impossible trobar-los expressats en un altre tipus cel·lular.

Alguns dels gens continguts a la llista RP i sobre-expressats en RPE de pacient, intervenen en certes funcions biològiques, destacades per l'anàlisi funcional dels gens diferencialment expressats (figures 37 i 38 de resultats). Entre aquests

processos biològics destaquen: la fosforilació oxidativa, el sistema UPR (unfolded protein response) de plegament de proteïnes, i la via UPS (Ubiquitin/Proteasome System).

Una possible explicació de la relació entre la mutació en *PRPF8* i l'activació de les vies de degradació de proteïnes (per UPR o UPS) seria que, l'incorrecte processament del mRNA degut a la mutació en aquest component del *spliceosoma*, dona lloc a proteïnes no funcionals o aberrants, que requereixen de la seva degradació. Com a exemple de gens sobre-expressats en RPE de pacient que intervenen en aquest procés de degradació de proteïnes, es troben els gens *KLHL7* i *TOPORS*. S'han descrit mutacions en aquests gens que causen formes dominants de RP (Bowne et al., 2008; Wen et al., 2011).

Altra relació entre la mutació en estudi i l'augment de degradació cel·lular es pot explicar degut a que, els defectes en el procés de *splicing*, donen lloc a un balanç proteic inadequat per la funcionalitat de la cèl·lula, la qual cosa provoca l'acumulació de proteïnes intracel·lulars que promouen la degradació mitjançant l'apoptosi i autofàgia. Entre aquests tipus de proteïnes sobre-expressades en pacient es troben *OPTN* i *MAPT*, l'excés de les quals es relaciona amb una degradació de l'aparell de Golgi (Liazoghli et al., 2005; Parj et al., 2006), que finalment deriva en apoptosi i autofàgia. Aquests resultats concorden amb les investigacions realitzades pel grup del Dr. Cerón on s'estudien *C.elegans* mutants en *PRPF8*. Aquests estudis mostren com el procés d'apoptosi, és activat per mutacions en *PRPF8* en un organisme viu (Rubio-Peña et al., 2015).

La major part dels gens de la llista RP que es troben reprimits en cèl·lules RPE de pacient, són gens amb una importància estructural i funcional específica d'aquest tipus cel·lular, com és el manteniment de l'estructura ciliar del fotoreceptor, el transport intra-ciliar, i la polarització cel·lular. Entre aquests gens es troben *FLVCR1*, *NPHP1*, *NPHP4*, *CEP290*, *SPATA7*, *EFHC1*, *WHRN*, *IFT172*, *WDR73*,

WDR19 i *OFD1*; i tots ells tenen associades mutacions que donen lloc a RP (Webb *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2016). La disminució en l'expressió d'aquests gens en les cèl·lules RPE mutades, es pot relacionar amb la manifestació de la malaltia degut a la producció insuficient d'estructures ciliars, les quals són indispensables per la correcta funcionalitat de fotoreceptors, i pel correcte trànsit de proteïnes entre cèl·lules RPE i fotoreceptors.

També es troben reprimits en cèl·lules RPE de pacient, gens que donen lloc a proteïnes que formen la maquinària de *splicing*, com el *KHDRBS2* i *PRPF3*. Mutacions descrites en aquests gens s'han relacionat amb la RP (González-Santos *et al.*, 2008). Cal destacar, que no es va detectar expressió diferencial del gen *PRPF8*, que és el gen mutat en les cèl·lules del pacient. Tant la disminució en la síntesi de proteïnes del *spliceosoma* deguda a la mutació, com la pròpia mutació en *PRPF8*, explicarien el desenvolupament de la malaltia, degut a que defectes en la regulació del procés d'*splicing*, implicaria una pèrdua dels mecanismes de control en els fotoreceptors; que són cèl·lules amb gran activitat metabòlica, on els processos de regulació i control de la transcripció són tan importants.

Anàlisi *splicing* alternatiu i estudi d'isoformes

La patologia de RP causada per la mutació en el gen *PRPF8*, únicament afecta a cèl·lules específiques d'òrgan; en aquest cas la retina. El gen *PRPF8* és un gen essencial per a la formació del *spliceosoma*; i per tant, el processament de RNA en aquestes cèl·lules mutades es podria veure afectat de forma específica. S'ha investigat la hipòtesi que els productes de *splicing* (*splicing* alternatiu) en les cèl·lules de retina, estiguin alterats com a conseqüència de la mutació en *PRPF8*; i això sigui el desencadenant del procés patològic que provoca la RP en els pacients amb aquesta mutació.

L'augment de l'activitat de *splicing* alternatiu caracteritza a cèl·lules de teixits més evolucionats, com és el cas del teixit nerviós (Raj *et al.*, 2015), del qual la retina en forma part. El fet que aquest procés de *splicing* alternatiu estigui disminuït en cèl·lules RPE de pacient, podria explicar-se degut a una pèrdua del mecanisme de regulació de l'expressió, provocat per la mutació en *PRPF8*. L'alteració en els mecanismes de *splicing*, desencadenaria l'alteració de l'expressió donant lloc a isoformes insuficients o inespecífiques per la funcionalitat cel·lular de les cèl·lules RPE, i consegüentment dels fotoreceptors. Això podria explicar, des del punt de vista funcional, un possible mecanisme patogènic de la mutació c.6974_6994del21bp (p.V2325fsX2329) en el gen *PRPF8*.

Per l'estudi del procés de *splicing* alternatiu a partir dels transcriptomes obtinguts, es van utilitzar 3 programes diferents: ASapp, SwitchSeq i DEXSeq.

A partir de la distribució dels diferents transcrits que resulten de les diferents comparatives (figures 38-45 de resultats); s'extreu que les cèl·lules RPE presenten una major quantitat d'isoformes amb retenció d'introns al comparar-les amb els fibroblasts. Quan es compara el mateix tipus cel·lular s'observa com en el cas de fibroblasts, el perfil de transcrits és molt similar entre pacient i control. En canvi, el perfil de transcrits entre cèl·lules RPE de pacient i control difereix molt més, essent la retenció d'introns molt superior en RPE control. Aquesta variació en el perfil de transcrits en cèl·lules RPE mostra per primera vegada, una diferència significativa entre cèl·lules de pacient (mutades en *PRPF8*) i control (salvatges). Aquests fets suggereixen que la diferència pot transcendir de ser una variabilitat interindividual, i ser deguda a un defecte sobre la funcionalitat del procés de *splicing* degut a la mutació.

Els resultats obtinguts en aquest treball sobre la variació en el procés de *splicing* i la disminució de retenció d'introns en cèl·lules RPE de pacient concorda amb altres

estudis anteriors fets sobre línies cel·lulars procedents de limfoblasts amb mutacions en PRPFs (Tanackovic et al., 2011). Els introns, al no contenir informació codificant, van ser considerats durant bastant temps com “DNA basura” (Wong et al., 2000) i la retenció d'intró es considerava errades del procés de *splicing* (Roy et al., 2006). Actualment, se sap que el fenomen de retenció d'introns és un potent regulador de l'expressió gènica, donant lloc a la variabilitat proteòmica mitjançant *splicing* alternatiu (Pan et al., 2008) o provocant la degradació de mRNAs incorrectament processats via NMD (Jaillon et al., 2008). Hi ha estudis que mostren com fenòmens específics de retenció d'introns acoblats a NMD, condueixen a la diferenciació cel·lular en el procés d'hematopoesi (Wong et al., 2013); de manera que no seria estrany pensar que aquesta diferenciació cel·lular també succeís a altres teixits; o bé, de la mateixa forma que regula el procés de diferenciació, també pogués regular altres processos cel·lulars.

El fenomen de retenció d'introns observat en cèl·lules RPE salvatges, evidencia l'activitat de *splicing* d'aquest tipus cel·lular. El procés de *splicing* dona lloc a la variabilitat proteòmica, i també de les diferents isoformes. Gràcies a les eines bioinformàtiques ASapp i DEXseq es van analitzar les diferents isoformes dels gens continguts a la llista RP en cèl·lules RPE de pacient i de control. ASapp quantifica de forma relativa els percentatges dels transcrits d'un determinat gen; i DEXSeq analitzà la utilització diferencial d'exons i introns d'isoformes determinades, en cada condició (salvatge i mutat), independentment que el gen tingui o no expressió diferencial entre les dues condicions.

Al estudiar-se les diferents isoformes dels gens específics de la llista RP en cèl·lules RPE de pacient i control; s'observà unes diferències en la distribució de transcrits en determinats gens. Un d'ells és el gen *UNC119* o *HRG4* (*human retinal gene 4*), gen molt conservat des del punt de vista evolutiu, amb una expressió

específica en fotoreceptors; la qual cosa fa que sigui bon candidat per a la degeneració retiniana hereditària (Swanson *et al.*, 1998). Mutacions en aquests gens s'han associat a distròfies de cons i bastons (Kobayashi *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2013). Una de les seves funcions és el transport de proteïnes a través del cil·li connector del fotoreceptor (Sihna *et al.*, 2012). S'uneix a proteïnes acilades en extrem N-terminal, per tal de poder solubilitzar-les i així poder transportar-les d'una membrana a una altra (Baehr 2014). Aquesta proteïna conté un domini β -hidrofòbic, similar a la PDE δ i Rho-GDI, que li permet contenir la part lipídica de les proteïnes que ha de transportar (Wright *et al.*, 2011). Les isoformes majoritàries A i B difereixen en el seu extrem C-terminal, la qual cosa determina la localització cel·lular, les possibles interaccions amb altres proteïnes, i les modificacions post-traduccionals que es puguin donar (Swanson *et al.*, 1998).

El perfil de transcrits d'aquest gen entre cèl·lules RPE de control i pacient, és molt diferent, tal i com es pot observar a la taula 23 de resultats. En RPE control, disminueix el percentatge de la isoforma A o canònica (de 46% a 15%), augmentant el percentatge d'expressió d'isoformes alternatives com la B (de 30% a 40%) i la C (de 8,8% a 17%), degut al fenomen de *splicing*. També augmenten les proporcions de les formes no codificants amb retenció d'introns, la qual cosa concorda amb l'observat en l'estudi del *splicing* alternatiu. Aquesta variació en la distribució d'isoformes del gen *UNC-119* en cèl·lules RPE, no s'observa en la distribució de transcrits entre fibroblasts de pacient i control (essent molt similar). Els resultats obtinguts mostren com la mutació en *PRPF8* afecta el procés de *splicing* alternatiu de forma específica a les cèl·lules de retina, i no a fibroblasts. Aquestes cèl·lules mutades, al tenir menys variació d'isoformes podrien tenir alterat el transport intracel·lular de proteïnes degut a interaccions inadequades o a incorrecta localització cel·lular. La situació patològica d'aquestes cèl·lules podria ser causada per aquesta pèrdua de funcionalitat, donant lloc a defectes en el transport cil·liar.

Conclusions

6.- CONCLUSIONS

- La tecnologia de seqüenciació massiva (NGS) ha mostrat la seva eficàcia en la determinació de mutacions que causen distròfia de retina en els pacients. El disseny del panell de 107 gens associats a DR, s'utilitza al laboratori de forma rutinària per al diagnòstic molecular de pacients amb DR no sindròmica.
- En aquest estudi, mitjançant la utilització del panell de DR s'ha detectat la mutació causant de la malaltia en el 43% dels casos. En el 24% dels pacients analitzats, s'han detectat variants genètiques rares o noves, que són candidates a produir la malaltia. Aquestes variants s'anoten com a variants de significat incert, ja que calen estudis de segregació familiar o anàlisis funcionals per a la seva confirmació. En el 33% restant dels pacients analitzats no es va detectar cap mutació o variant candidata a l'associació amb la malaltia.
- La seqüenciació de l'exoma complert (WES) per a la caracterització de nous gens és un procediment útil, tal i com es demostra en la detecció de la variant p.Gly103Arg al gen *COL6A6*, associada unívocament als membres afectes d'una família d'adRP. Tot i així, es demostra que l'assignació d'un nou gen a adRP requereix de la posterior confirmació.
- La nova variant genètica al gen *COL6A6* es troba lligada en tots els pacients de la família *RP65* a la deleció g.9281_10108del en el gen *RHO*. Aquesta última és la probable mutació causant de la malaltia en la família. El

lligament entre les dues variants, no permet determinar el paper de la variant en *COL6A6* en la adRP.

- De les quatre famílies adRP analitzades per WES, només es va resoldre una d'elles mitjançant aquesta tècnica. Una altra família es va resoldre a partir d'una nova interpretació del fenotip, passant de adRP a xLRP. Les dues famílies no resoltes per WES suggereixen mutacions en regions no estudiades (introns), regions mal cobertes en la seqüenciació, o mecanismes de deleció/duplicació no detectats.
- Els fibroblasts procedents de la pell d'un pacient amb la mutació c.6974_6994del21bp en el factor de *splicing PRPF8* causant d'adRP, poden ser induïdes a iPSCs al laboratori. Aquestes iPSCs també poden ser diferenciades *in vitro* a cèl·lules de retina (RPE).
- Els estudis del transcriptoma diferencial mitjançant la tècnica RNAseq entre fibroblasts mutats en *PRPF8* i fibroblasts control, no mostren diferències significatives d'expressió en els 296 gens de la llista RP, descrits com a associats a DR. El mateix estudi mostra diferències significatives d'expressió entre cèl·lules de retina (RPE) de pacient i control, en un 15% dels gens de la llista RP. Aquests fets demostren com la mutació en estudi (c.6974_6994del21bp de *PRPF8*) afecta de forma específica a cèl·lules de retina.
- El nombre d'isoformes detectades mitjançant RNAseq és considerablement superior en cèl·lules RPE que en fibroblasts. L'anàlisi d'isoformes generades per *splicing* alternatiu entre cèl·lules RPE mutades en *PRPF8* i control,

mostra diferències en la distribució dels diferents transcrits. De forma significativa, es detecta una disminució en la capacitat de retenció d'introns en les cèl·lules mutades en *PRPF8* respecte a les cèl·lules control.

- Els resultats del RNAseq mostren diferències significatives en l'expressió gènica i/o d'isoformes relacionades amb la funció ciliar. L'anàlisi de gens associats a RP, com *UNC119*, mostren un canvi significatiu en la distribució d'isoformes en les cèl·lules RPE mutades en *PRPF8* respecte les cèl·lules control. Aquestes diferències estan relacionades amb isoformes específiques de retina que impliquen retenció d'introns.

- Els resultats obtinguts, mostren per primera vegada una diferència en la funció de *splicing*, com és el cas de la retenció d'introns específica en cèl·lules de retina RPE, mutades en *PRPF8*. Aquesta pèrdua en la capacitat de retenir introns podria ser el mecanisme patogènic pel qual es produeix la adRP en pacients amb la mutació en estudi.

Referències

7.- REFERÈNCIES

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010 pr;7(4):248-9
- Ajmal M, Khan MI, Neveling K, Khan YM, Azam M, Waheed NK, Hamel CP, Ben-Yosef T, De Baere E, Koenekoop RK, Collin RW, Qamar R, Cremers FP. A missense mutation in the *splicing* factor gene *DHX38* is associated with early-onset retinitis pigmentosa with macular coloboma. *J Med Genet*. 2014 Jul;51(7):444-8
- Akahori, M., Tsunoda, K., Miyake, Y., Fukuda, Y., Ishiura, H., Tsuji, S., Usui, T., Hatase, T., Nakamura, M., Ohde, H., Itabashi, T., Okamoto, H., Takada, Y., Iwata, T. Dominant mutations in *RP1L1* are responsible for occult macular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet*. 2010 Sep 10;87(3):424-9
- Almoguera B, Li J, Fernandez-San Jose P, Liu Y, March M, Pellegrino R, Golhar R, Corton M, Blanco-Kelly F, López-Molina MI, García-Sandoval B, Guo Y, Tian L, Liu X, Guan L, Zhang J, Keating B, Xu X, Hakonarson H, Ayuso C. Application of Whole Exome Sequencing in Six Families with an Initial Diagnosis of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa: Lessons Learned. *PLoS One*. 2015 Jul 21;10(7):e0133624
- Al-Rashed M1, Abu Safieh L, Alkuraya H, Aldahmesh MA, Alzahrani J, Diya M, Hashem M, Hardcastle AJ, Al-Hazzaa SA, Alkuraya FS. *RP1* and retinitis pigmentosa: report of novel mutations and insight into mutational mechanism. *Br J Ophthalmol*. 2012 Jul;96(7):1018-22

- Audo I, Bujakowska KM, Léveillard T, Mohand-Saïd S, Lancelot ME, Germain A, Antonio A, Michiels C, Saraiva JP, Letexier M, Sahel JA, Bhattacharya SS, Zeitz C. Development and application of a next-generation-sequencing (NGS) approach to detect known and novel gene defects underlying retinal diseases. *Orphanet J Rare Dis.* 2012 Jan 25;7:8
- Ayuso C, Millan JM: Retinitis pigmentosa and allied conditions today: a paradigm of translational research. *Genome Medicine* 2010, 2:34
- Baehr W. Membrane protein transport in photoreceptors: the function of PDE δ : the Proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 Dec; 30;55(12):8653-66
- Berger W, Kloenckener-Gruissem B, Neidhardt J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2010 Sep;29(5):335-75. Review
- Blanco S, Suarez A, Gandia-Pla S, Gómez-Llorente C, Antúnez A, Gómez-Capilla JA, Fárez-Vidal ME. Use of capillary electrophoresis for accurate determination of CAG repeats causing Huntington disease. An oligonucleotide design avoiding shadow bands. *Scand J Clin Lab Invest.* 2008;68(7):577-84
- Boon K-L, Grainger R.J, Ehsani P, Barrass J.D, Auchynnikava T, Inglehearn C.F, Beggs J.D. Prp8 mutations that cause human Retinitis pigmentosa lead to a U5 snRNP maturation defect in yeast. *Nat Struct Mol Biol.* 2007 November ; 14(11): 1077–1083
- Bowne SJ, Sullivan LS, Gire AI, Birch DG, Hughbanks-Wheaton D, Heckenlively JR, Daiger SP. Mutations in the *TOPORS* gene cause 1% of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Vis.* 2008 May 19;14:922-7

- Branham K, Othman M, Brumm M, Karoukis AJ, Atmaca-Sonmez P, Yashar BM, Schwartz SB, Stover NB, Trzupke K, Wheaton D, Jennings B, Ciccarelli ML, Jayasundera KT, Lewis RA, Birch D, Bennett J, Sieving PA, Andreasson S, Duncan JL, Fishman GA, Iannaccone A, Weleber RG, Jacobson SG, Heckenlively JR, Swaroop A. Mutations in *RPGR* and *RP2* account for 15% of males with simplex retinal degenerative disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Dec 13;53(13):8232-7
- Bravo-Gil N, Méndez-Vidal C, Romero-Pérez L, González-del Pozo M, Rodríguez-de la Rúa E, Dopazo J, Borrego S, Antiñolo G. Improving the management of Inherited Retinal Dystrophies by targeted sequencing of a population-specific gene panel. *Sci Rep.* 2016 Apr 1;6:23910
- Buckley PT, Lee MT, Sul JY, Miyashiro KY, Bell TJ, Fisher SA, Kim J, Eberwine J. Cytoplasmic intron sequence-retaining transcripts can be dendritically targeted via ID element retrotransposons. *Neuron.* 2011 Mar 10;69(5):877-84
- Cao H, Wu J, Lam S, Duan R, Newnham C, Molday RS, Graziotto JJ, Pierce EA, Hu J. Temporal and tissue specific regulation of RP-associated splicing factor genes *PRPF3*, *PRPF31* and *PRPF8*--implications in the pathogenesis of RP. *PLoS One.* 2011 Jan 19;6(1)
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet.* 2002 Apr;3(4):285-98.
Review
- Coco RM, Tellería JJ, Sanabria MR, Rodríguez-Rúa E, García MT. *PRPH2* (Peripherin/RDS) mutations associated with different macular dystrophies in a Spanish population: a new mutation. *Eur J Ophthalmol.* 2010 Jul-Aug;20(4):724-32

- Daiger S.P, Sullivan L.S, Gire A.I, Birch D.G, Heckenlively J.R, Bowne S.J. Mutations in known genes account for 58% of autosomal dominant retinitis pigmentosa (adRP). *Adv Exp Med Biol.* 2008; 613: 203-209
- de Sousa Dias M, Hernan I, Delás B, Pascual B, Borràs E, Gamundi MJ, Mañé B, Fernández-San José P, Ayuso C, Carballo M. New COL6A6 variant detected by whole-exome sequencing is linked to break points in intron 4 and 3'-UTR, deleting exon 5 of RHO, and causing adRP. *Mol Vis.* 2015 Aug 18;21:857-70
- Di Resta C, Spiga I, Presi S, Merella S, Pipitone GB, Manitto MP, Querques G, Parodi MB, Ferrari M, Carrera P. Integration of multigene panels for the diagnosis of hereditary retinal disorders using Next Generation Sequencing and bioinformatics approaches. *EJIFCC.* 2018 Apr 30;29(1):15-25
- Dujardin G, Dagueneat É, Bernard DG, Flodrops M, Durand S, Chauveau A, El Khoury F, Le Jossic-Corcos C, Corcos L. Pre-mRNA splicing: when the spliceosome loses ground. *Med Sci (Paris).* 2016 Dec;32(12):1103-1110
- Ebert AD, Liang P, Wu JC. Induced Pluripotent Stem Cells as a Disease Modeling and Drug Screening Platform. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2012 October ; 60(4): 408–16
- El Hokayem J, Cukier HN, Dykxhoorn DM. Blood Derived Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs): Benefits, Challenges and the Road Ahead. *J Alzheimers Dis Parkinsonism.* 2016 Oct;6(5). pii: 275
- Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 1998b Mar;8(3):186-94
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 1998a. Mar;8(3):175-85

- Fackenthal JD, Cartegni L, Krainer AR, Olopade OI. BRCA2 T2722R is a deleterious allele that causes exon skipping. *Am J Hum Genet.* 2002 Sep;71(3):625-31
- Fahim AT, Daiger SP, Weleber RG. Nonsyndromic Retinitis Pigmentosa Overview. 2000 Aug 4 [updated 2017 Jan 19]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018
- Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 2003 Feb 15;17(4):419-37
- Ferrari S, Di Iorio E, Barbaro V, Ponzin D, Sorrentino F.S, Parmeggiani F. Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Current genomics* 2011 12(4), 238-49
- Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, Gil L, et al. Ensembl 2012. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jan;40 (Database issue)
- Gamundi MJ, Hernan I, Martínez-Gimeno M, Maseras M, García-Sandoval B, Ayuso C, Antiñolo G, Baiget M, Carballo M. Three novel and the common Arg677Ter RP1 protein truncating mutations causing autosomal dominant retinitis pigmentosa in a Spanish population. *BMC Med Genet.* 2006 Apr 5;7:35
- Gamundi MJ, Hernan I, Muntanyola M, Maseras M, López-Romero P, Alvarez R, Dopazo A, Borrego S, Carballo M. Transcriptional expression of cis-acting and trans-acting splicing mutations cause autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mutat.* 2008 Jun;29(6):869-78

- Gamundi MJ, Hernan I, Muntanyola M, Trujillo MJ, García-Sandoval B, Ayuso C, Baiget M, Carballo M. High prevalence of mutations in peripherin/RDS in autosomal dominant macular dystrophies in a Spanish population. *Mol Vis*. 2007 Jun 28;13:1031-7
- Ge Y, Porse BT. The functional consequences of intron retention: alternative splicing coupled to NMD as a regulator of gene expression. *Bioessays*. 2014 Mar;36(3):236-43. Review
- Gonzalez-Santos JM, Cao H, Duan RC, Hu J. Mutation in the splicing factor Hprp3p linked to retinitis pigmentosa impairs interactions within the U4/U6 snRNP complex. *Hum Mol Genet*. 2008;17(2):225–39
- Graziotto JJ, Farkas MH, Bujakowska K, Deramaudt BM, Zhang Q, Nandrot EF, Inglehearn CF, Bhattacharya SS, Pierce EA. Three gene-targeted mouse models of RNA splicing factor RP show late-onset RPE and retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Jan 5;52(1):190-8
- Hamel C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis*. 2006 Oct 11;1:40. Review
- Hernan I, Mañé B, Borràs E, de Sousa Dias M, Llorc G, Yagüe C, Gamundi MJ, Arcusa À, Carballo M. Two novel frameshift mutations in *BRCA2* gene detected by next generation sequencing in a survey of Spanish patients of breast cancer. *Clin Transl Oncol*. 2015 Jul;17(7):576-80
- Heuertz S, Le Merrer M, Zabel B, Wright M, Legeai-Mallet L, Cormier-Daire V, Gibbs L, Bonaventure J. Novel FGFR3 mutations creating cysteine residues in the extracellular domain of the receptor cause achondroplasia or severe forms of hypochondroplasia. *Eur J Hum Genet*. 2006 Dec;14(12):1240-7

- Hong DH, Pawlyk B, Sokolov M, Strissel KJ, Yang J, Tulloch B, Wright AF, Arshavsky VY, Li T. RPGR isoforms in photoreceptor connecting cilia and the transitional zone of motile cilia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Jun;44(6):2413-21
- Huang L, Li S, Xiao X, Jia X, Wang P, Guo X, Zhang Q. Screening for variants in 20 genes in 130 unrelated patients with cone-rod dystrophy. *Mol Med Rep.* 2013 Jun;7(6):1779-85
- Huranová M, Hnilicová J, Fleischer B, Cvacková Z, Stanek D. A mutation linked to retinitis pigmentosa in HPRP31 causes protein instability and impairs its interactions with spliceosomal snRNPs. *Hum Mol Genet.* 2009 Jun 1;18(11):2014-23
- Irimia M, Blencowe BJ. Alternative splicing: decoding an expansive regulatory layer. *Curr Opin Cell Biol.* 2012 24:323-32. Review
- Ivings L, Towns KV, Matin MA, Taylor C, Ponchel F, Grainger RJ, Ramesar RS, Mackey DA, Inglehearn CF. Evaluation of splicing efficiency in lymphoblastoid cell lines from patients with splicing-factor retinitis pigmentosa. *Mol Vis.* 2008;14:2357-66
- Jaillon O, Bouhouche K, Gout JF, Aury JM, Noel B, Saudemont B, Nowacki M, Serrano V, Porcel BM, Ségurens B, Le Mouël A, Lepère G, Schächter V, Bétermier M, Cohen J, Wincker P, Sperling L, Duret L, Meyer E. Translational control of intron splicing in eukaryotes. *Nature.* 2008 Jan 17;451(7176):359-62
- Ji X, Zhang J, Xu Y, Long F, Sun W, Liu X, Chen Y, Jiang W. MLPA Application in Clinical Diagnosis of DMD/BMD in Shanghai. *J Clin Lab Anal.* 2015 Sep;29(5):405-11

- Jiao, X., Ventruto, V., Trese, M. T., Shastry, B. S., Hejtmancik, J. F. Autosomal recessive familial exudative vitreoretinopathy is associated with mutations in LRP5. *Am. J. Hum. Genet.* 75: 878-884, 2004
- Jones KD, Wheaton DK, Bowne SJ, Sullivan LS, Birch DG, Chen R, Daiger SP. Next-generation sequencing to solve complex inherited retinal dystrophy: A case series of multiple genes contributing to disease in extended families. *Mol Vis.* 2017 Jul 20;23:470-481
- Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science.* 1994 Jun 10;264(5165):1604-8
- Keen TJ, Hims MM, McKie AB, Moore AT, Doran RM, Mackey DA, Mansfield DC, Mueller RF, Bhattacharya SS, Bird AC, Markham AF, Inglehearn CF. Mutations in a protein target of the Pim-1 kinase associated with the RP9 form of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Eur J Hum Genet.* 2002 Apr;10(4):245-9
- Kloeckener-Gruissem, B., Neidhardt, J., Magyar, I., Plauchu, H., Zech, J.-C., Morle, L., Palmer-Smith, S. M., MacDonald, M. J., Nas, V., Fry, A. E., Berger, W. Novel VCAN mutations and evidence for unbalanced alternative splicing in the pathogenesis of Wagner syndrome. *Europ. J. Hum. Genet.* 21: 352-356, 2013
- Kobayashi A, Higashide T, Hamasaki D, Kubota S, Sakuma H, An W, Fujimaki T, McLaren MJ, Weleber RG, Inana G. HRG4 (UNC119) mutation found in cone-rod dystrophy causes retinal degeneration in a transgenic model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 Oct;41(11):3268-77

- Koboldt DC, Chen K, Wylie T, Larson DE, McLellan MD, Mardis ER, Weinstock GM, Wilson RK, Ding L. VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics*. 2009 Sep 1;25(17):2283-5
- Korir P.K, Roberts L, Ramesar L, Seoighe C. A mutation in a splicing factor that causes retinitis pigmentosa has a transcriptome-wide effect on mRNA splicing. *BMC Research Notes* 2014, 7:401
- Krainer AR. Splicing: still so much to learn. *RNA*. 2015 Apr;21(4):500-1.
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variant on protein function using the SHIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-81
- Kuniyoshi K, Hayashi T, Sakuramoto H, Nakao A, Sato T, Utsumi T, Tsuneoka H, Shimomura Y. Novel mutations in enhanced S-cone syndrome. *Ophthalmology* 2013 Feb;120(2):431.e1-6
- Lareau LF, Brooks AN, Soergel DA, Meng Q, Brenner SE. The coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay. *Adv Exp Med Biol*. 2007;623:190-211
- Lee K, Berg JS, Milko L, Crooks K, Lu M, Bizon C, Owen P, Wilhelmsen KC, Weck KE, Evans JP, Garg S. High Diagnostic Yield of Whole Exome Sequencing in Participants With Retinal Dystrophies in a Clinical Ophthalmology Setting. *Am J Ophthalmol*. 2015 Aug;160(2):354-363.e9
- Leskov, Ilya; Klenchin, Handy, Whitlock, Govardovskii, Bownds, Lamb, Pugh, Arshavsky . The Gain of Rod Phototransduction: Reconciliation of

- Biochemical and Electrophysiological Measurement. *Neuron* 2000 Sept 27 (3): 525–537
- Li G, Guo X, Tang L, Chen M, Luo X, Peng L, Xu X, Wang S, Xiao Z, Yi W, Dai L, Wang J. Analysis of *BRCA1/2* mutation spectrum and prevalence in unselected Chinese breast cancer patients by next-generation sequencing. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017 Oct;143(10):2011-2024
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009 Aug 15;25(16):2078-9
- Liazoghli D, Perreault S, Micheva KD, Desjardins M, Leclerc N. Fragmentation of the Golgi Apparatus Induced by the Overexpression of Wild-Type and Mutant Human Tau Forms in Neurons. *Am J Pathol* 2005;166(5):1499–514
- Linder B, Hirmer A, Gal A, Rütther K, Bolz HJ, Winkler C, Lagerbauer B, Fischer U. Identification of a *PRPF4* loss-of-function variant that abrogates U4/U6.U5 tri-snRNP integration and is associated with retinitis pigmentosa. *PLoS One*. 2014 Nov 10;9(11):e111754
- Liu S, Rauhut R, Vornlocher H.P, Lührmann R. The network of protein-protein interactions within the human U4/U5·U6 tri-snRNP. *RNA(New York, N.Y)* 2006 12(7), 1418-30
- Lukovic D, Artero Castro A, Delgado AB, Bernal Mde L, Luna Pelaez N, Díez Lloret A, Perez Espejo R, Kamenarova K, Fernández Sánchez L, Cuenca N, Cortón M, Avila Fernandez A, Sorkio A, Skottman H, Ayuso C, Erceg S, Bhattacharya SS. Human iPSC derived disease model of *MERTK*-associated retinitis pigmentosa. *Sci Rep*. 2015 Aug 11;5:12910

- M. Krausová, D. Stanek. snRNP proteins in health and disease. *Semin Cell Dev Biol* 2018 Jul;79:92-102. Review
- Mahdieh N, Rabbani B. An Overview of Mutation Detection Methods in Genetic Disorders. *Iran J Pediatr*. Aug 2013; Vol 23 (No 4), Pp: 375-388. Review
- Maita H, Kitaura H, Ariga H, Iguchi-Ariga SM. Association of *PAP1* and Prp3p, the products of causative genes of dominant retinitis pigmentosa, in the tri-snRNP complex. *Exp Cell Res*. 2005 Jan1; 302 (1): 61-8
- Maita H, Kitaura H, Keen TJ, Inglehearn CF, Ariga H, Iguchi-Ariga SM. *PAP-1*, the mutated gene underlying the RP9 form of dominant retinitis pigmentosa, is a splicing factor. *Exp Cell Res*. 2004 Nov 1;300(2):283-96
- Manes G, Guillaumie T, Vos WL, Devos A, Audo I, Zeitz C, Marquette V, Zanlonghi X, Defoort-Dhellemmes S, Puech B, Said SM, Sahel JA, Odent S, Dollfus H, Kaplan J, Dufier JL, Le Meur G, Weber M, Faivre L, Cohen FB, Bérout C, Picot MC, Verdier C, Sénéchal A, Baudoin C, Bocquet B, Findlay JB, Meunier I, Dhaenens CM, Hamel CP. High prevalence of *PRPH2* in autosomal dominant retinitis pigmentosa in france and characterization of biochemical and clinical features. *Am J Ophthalmol*. 2015 Feb;159(2):302-14
- Maquat LE. Defects in RNA splicing and the consequence of shortened translational reading frames. *Am J Hum Genet*. 1996 Aug;59(2):279-86
- Martínez-Gimeno M, Gamundi MJ, Hernan I, Maseras M, Milla E, Ayuso C, Garcia-Sandoval B, Beneyto M, Vilela C, Baiget M, Antinolo G, Carballo M. Mutations in pre-mRNA splicing-factor genes *PRPF3*, *PRPF8* and *PRPF31* in spanish families with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 May;44(5):2171-7

- Martinez-Gimeno M1, Trujillo MJ, Lorda I, Gimenez A, Calvo MT, Ayuso C, Carballo M. Three novel mutations (P215L, T289P, and 3811-2 A-->G) in the rhodopsin gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa in Spanish families. *Hum Mutat.* 2000 Jul;16(1):95-6.
- Martin-Merida I, Sanchez-Alcudia R, Fernandez-San Jose P, Blanco-Kelly F, Perez-Carro R, Rodriguez-Jacy da Silva L, Almoguera B, Garcia-Sandoval B, Lopez-Molina MI, Avila-Fernandez A, Carballo M, Corton M, Ayuso C. Analysis of the *PRPF31* Gene in Spanish Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa Patients: A Novel Genomic Rearrangement. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017 Feb 1;58(2):1045-1053
- Mayerle M, Guthrie C. Prp8 retinitis pigmentosa mutants cause defects in the transition between the catalytic steps of splicing. 2016 *RNA* 22:793–809
- McKie AB1, McHale JC, Keen TJ, Tarttelin EE, Goliath R, van Lith-Verhoeven JJ, Greenberg J, Ramesar RS, Hoyng CB, Cremers FP, Mackey DA, Bhattacharya SS, Bird AC, Markham AF, Inglehearn CF. Mutations in the pre-mRNA splicing factor gene *PRPC8* in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP13). *Hum Mol Genet.* 2001 Jul 15;10(15):1555-62
- Mears A.J, Hiriyantha S, Vervoort F, Yashar B, Gieser L, Fahrner S, Daiger S.P, Heckenlively J.R, Sieving P.A, Wright A.F, Swaroop A. Report Remapping of the RP15 Locus for X-Linked Cone-Rod Degeneration to Xp11.4-p21.1, and Identification of a De Novo Insertion in the *RPGR* Exon ORF15. *Am. J. Hum. Genet.* 2000 67:1000–1003
- Megaw RD, Soares DC, Wright AF. *RPGR*: Its role in photoreceptor physiology, human disease, and future therapies. *Exp Eye Res.* 2015 Sep;138:32-41

- Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010 Jan;11(1):31-46 Review
- Millá E1, Hernan I, Gamundi MJ, Martínez-Gimeno M, Carballo M. Novel *LMX1B* mutation in familial nail-patella syndrome with variable expression of open angle glaucoma. *Mol Vis.* 2007 Apr 27;13:639-48
- Miyamoto, T., Inoue, H., Sakamoto, Y., Kudo, E., Naito, T., Mikawa, T., Mikawa, Y., Isashiki, Y., Osabe, D., Shinohara, S., Shiota, H., Itakura, M. Identification of a novel splice site mutation of the *CSPG2* gene in a Japanese family with Wagner syndrome. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 46: 2726-2735, 2005
- Mozaffari-Jovin S, Wandersleben T, Santos K.F, Will C.L, Lührmann R, Wahl M.C. Novel regulatory principles of the spliceosomal Brr2 RNA helicase and links to retinal disease in humans. *RNA Biology* 2014 April 11:4, 298–312
- Mylykangas S, Natsoulis G, Bell JM, Ji HP. Targeted sequencing library preparation by genomic DNA circularization. *BMC Biotechnol.* 2011 Dec 14;11:122.
- Neveling K, Collin RW, Gilissen C, van Huet RA, Visser L, Kwint MP, Gijzen SJ, Zonneveld MN, Wieskamp N, de Ligt J, Siemiatkowska AM, Hoefsloot LH, Buckley MF, Kellner U, Branham KE, den Hollander AI, Hoischen A, Hoyng C, Klevering BJ, van den Born LI, Veltman JA, Cremers FP, Scheffer H. Next-generation genetic testing for retinitis pigmentosa. *Hum Mutat.* 2012 Jun;33(6):963-72
- Ng PC, Henikoff S. Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. *Genome Res* 2002 Mar;12(3):436-46
- Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006;7:61-80

- Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious aminoàcid substitutions. *Genome Res* 2001 May;11(5):863-74
- Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul1;31(13):3812-4
- Nilsen TW, Graveley BR. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 2010; 463:457-63
- Novoyatleva T, Tang Y, Rafalska I, Stamm S. Pre-mRNA missplicing as a cause of human disease. *Prog Mol Subcell Biol.* 2006;44:27-46. Review
- Ovando-Roche P, Georgiadis A, Smith AJ, Pearson RA, Ali RR. Harnessing the Potential of Human Pluripotent Stem Cells and Gene Editing for the Treatment of Retinal Degeneration. *Curr Stem Cell Rep.* 2017;3(2):112-123. Review
- Pagani F1, Baralle FE. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet.* 2004 May;5(5):389-96. Review
- 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 Dec;40(12):1413-5
- Pangkanon S. Molecular diagnosis of Prader-Willi syndrome. *J Med Assoc Thai.* 2003 Aug;86 Suppl 3:S510-6
- Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet.* 2011 Nov;52(4):413-35
- Park BC, Shen X, Samaraweera M, Yue BY. Studies of optineurin, a glaucoma gene: Golgi fragmentation and cell death from overexpression of wild-type

- and mutant optineurin in two ocular cell types. *Am J Pathol.* 2006 Dec;169(6):1976-89
- Patil H, Guruju MR, Cho KI, Yi H, Orry A, Kim H, Ferreira PA. Structural and functional plasticity of subcellular tethering, targeting and processing of RPGRIP1 by RPGR isoforms. *Biol Open.* 2012 Feb 15;1(2):140-60.
- Pras E, Abu A, Rotenstreich Y, Avni I, Reish O, Morad Y, Reznik-Wolf H, Pras E. Cone-rod dystrophy and a frameshift mutation in the *PROM1* gene. *Mol Vis.* 2009 Aug 28;15:1709-16
- Qu YJ, Bai JL, Cao YY, Zhang WH, Wang H, Jin YW, Song F. A rare variant (c.863G>T) in exon 7 of SMN1 disrupts mRNA splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet.* 2016 Jun;24(6):864-70. doi: 10.1038/ejhg.2015.213. Epub 2015 Sep 30
- Raj B, Blencowe BJ. Alternative Splicing in the Mammalian Nervous System: Recent Insights into Mechanisms and Functional Roles. *Neuron.* 2015 Jul 1;87(1):14-27. Review
- Renault L, Kuhlmann J, Henkel A, Wittinghofer A. Structural basis for guanine nucleotide exchange on Ran by the regulator of chromosome condensation (RCC1). *Cell.* 2001 Apr 20;105(2):245-55
- Rose AM, Bhattacharya SS. Variant haploinsufficiency and phenotypic non-penetrance in *PRPF31*-associated retinitis pigmentosa. *Clin Genet.* 2016 Aug;90(2):118-26
- Roy SW, Gilbert W. The evolution of spliceosomal introns: patterns, puzzles and progress. *Nat Rev Genet.* 2006 Mar;7(3):211-21

- Rozet J.M, Perrault I, Gigarel N, Souied E, Ghazi I, Gerber S, Dufier J.L, Munnich A, Kaplan J. Dominant X linked retinitis pigmentosa is frequently accounted for by truncating mutations in exon ORF15 of the *RPGR* gene. *J Med Genet* 2002;39:284–285
- Rubio-Peña K, Fontrodona L, Aristizábal-Corrales D, Torres S, Cornes E, García-Rodríguez FJ, Serrat X, González-Knowles D, Foissac S, Porta-De-La-Riva M, Cerón J. Modeling of autosomal-dominant retinitis pigmentosa in *Caenorhabditis elegans* uncovers a nexus between global impaired functioning of certain splicing factors and cell type-specific apoptosis. *RNA*. 2015 Dec;21(12):2119-31
- Ruddle JB, Ebenezer ND, Kearns LS, Mulhall LE, Mackey DA, Hardcastle AJ. *RPGR* ORF15 genotype and clinical variability of retinal degeneration in an Australian population. *Br J Ophthalmol*. 2009;93:1151-1154
- Růžicková Š, Staněk D. Mutations in spliceosomal proteins and retina degeneration. *RNA Biol*. 2017 May 4;14(5):544-552. Review
- Sharon D, Sandberg M.A, Rabe V.W, Stillberger M, Dryja T.P, Berson E.L. *RP2* and *RPGR* Mutations and Clinical Correlations in Patients with X-Linked Retinitis Pigmentosa. *Am. J. Hum. Genet*. 2003 73:1131–1146.
- Sharp PA. The discovery of Split genes and RNA splicing. *Trends Biochem Sci*. 2005 Jun;30(6):279-81. Review
- Sinha S, Majumder A, Belcastro M, Sokolov M, Artemyev NO. Expression and subcellular distribution of *UNC119a*, a protein partner of transducin α subunit in rod photoreceptors. *Cell Signal*. 2013 Jan;25(1):341-8

- Sossi V, Giuli A, Vitali T, Tiziano F, Mirabella M, Antonelli A, Neri G, Brahe C. Premature termination mutations in exon 3 of the *SMN1* gene are associated with exon skipping and a relatively mild SMA phenotype. *Eur J Hum Genet.* 2001 Feb;9(2):113-20.
- Souied E, Segues B, Ghazi I, Rozet JM, Chatelin S, Gerber S, Perrault I, Michel-Awad A, Briard ML, Plessis G, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J. Severe manifestations in carrier females in X linked retinitis pigmentosa. *J Med Genet.* 1997 Oct;34(10):793-7
- Stone EM. Finding and interpreting genetic variations that are important to ophthalmologists. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2003;101:437-84. Review
- Swanson DA, Chang JT, Campochiaro PA, Zack DJ, Valle D. Mammalian orthologs of *C. elegans* unc-119 highly expressed in photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998 Oct;39(11):2085-94
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):861-72
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):663-76
- Tanackovic G, Ransijn A, Thibault P, Abou Elela S, Klinck R, Berson EL, Chabot B, Rivolta C. PRPF mutations are associated with generalized defects in spliceosome formation and pre-mRNA splicing in patients with retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet.* 2011 Jun 1;20(11):2116-30

- Tanner G, Glaus E, Barthelmes D, Ader M, Fleischhauer J, Pagani F, Berger W, Neidhardt J. Therapeutic strategy to rescue mutation-induced exon skipping in rhodopsin by adaptation of U1 snRNA. *Hum Mutat.* 2009 Feb;30(2):255-63
- Toomes, C., Bottomley, H. M., Jackson, R. M., Towns, K. V., Scott, S., Mackey, D. A., Craig, J. E., Jiang, L., Yang, Z., Trembath, R., Woodruff, G., Gregory-Evans, C. Y., Gregory-Evans, K., Parker, M. J., Black, G. C. M., Downey, L. M., Zhang, K., Inglehearn, C. F. Mutations in *LRP5* or *FZD4* underlie the common familial exudative vitreoretinopathy locus on chromosome 11q. *Am. J. Hum. Genet.* 74: 721-730, 2004
- Towns KV, Kipioti A, Long V, McKibbin M, Maubaret C, Vaclavik V, Ehsani P, Springell K, Kamal M, Ramesar RS, Mackey DA, Moore AT, Mukhopadhyay R, Webster AR, Black GC, O'Sullivan J, Bhattacharya SS, Pierce EA, Beggs JD, Inglehearn CF. Prognosis for splicing factor *PRPF8* retinitis pigmentosa, novel mutations and correlation between human and yeast phenotypes. *Hum Mutat.* 2010 May;31(5):E1361-76
- Vervoort R, Lennon A, Bird AC, Tulloch B, Axton R, Miano MG, Meindl A, Meitinger T, Ciccodicola A, Wright AF. Mutational hot spot within a new *RPGR* exon in X-linked retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 2000 Aug;25:462-6
- Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell.* 2009 Feb 20;136(4):701-18. Review
- Wang Z, Xiao X, Van Nostrand E, Burge C.B. General and Specific Functions of Exonic Splicing Silencers in Splicing Control. *Mol Cell.* 2006 Jul 7; 23(1): 61–70
- Wang Z, B. Burge C.B. Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA.* 2008 May; 14(5): 802–813. Review

- Ward AJ, Cooper TA. The pathobiology of splicing. *J Pathol* 2010 Jan;220(2):152-63. Review
- Webb TR, Parfitt DA, Gardner JC, Martinez A, Bevilacqua D, Davidson AE, Zito I, Thiselton DL, Ressa JH, Apergi M, Schwarz N, Kanuga N, Michaelides M, Cheetham ME, Gorin MB, Hardcastle AJ. 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.* 2012 Aug 15;21(16):3647-54
- Weisschuh N, Mayer AK, Strom TM, Kohl S, Glöckle N, Schubach M, Andreasson S, Bernd A, Birch DG, Hamel CP, Heckenlively JR, Jacobson SG, Kamme C, Kellner U, Kunstmann E, Maffei P, Reiff CM, Rohrschneider K, Rosenberg T, Rudolph G, Vámos R, Varsányi B, Weleber RG, Wissinger B. Mutation Detection in Patients with Retinal Dystrophies Using Targeted Next Generation Sequencing. *PLoS One.* 2016 Jan 14;11(1):e0145951
- Wen Y, Locke KG, Klein M, Bowne SJ, Sullivan LS, Ray JW, Daiger SP, Birch DG, Hughbanks-Wheaton DK. Phenotypic characterization of 3 families with autosomal dominant retinitis pigmentosa due to mutations in *KLHL7*. *Arch Ophthalmol.* 2011 Nov;129(11):1475-82
- Wiley LA, Burnight ER, Songstad AE, Drack AV, Mullins RF, Stone EM, Tucker BA. Patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) for the study and treatment of retinal degenerative diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2015 Jan;44:15-35
- Will C.L, Lührmann R. Spliceosoma Structure and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Jul 1;3(7). pii: a003707. Review

- Wong GK, Passey DA, Huang Y, Yang Z, Yu J. Is "junk" DNA mostly intron DNA? *Genome Res.* 2000 Nov;10(11):1672-8
- Wong JJ, Ritchie W, Ebner OA, Selbach M, Wong JW, Huang Y, Gao D, Pinello N, Gonzalez M, Baidya K, Thoeng A, Khoo TL, Bailey CG, Holst J, Rasko JE. Orchestrated intron retention regulates normal granulocyte differentiation. *Cell.* 2013 Aug 1;154(3):583-95
- Wright AF, Chakarova CF, Abd El-Aziz MM, Bhattacharya SS. Photoreceptor degeneration: genètic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat Ver Genet.* 2010 Apr; 11(4):273-84. Review
- Wu Y, Zhang Y, Zhang J. Distribution of exonic splicing enhancer elements in human genes. *Genomics.* 2005 Sep;86(3):329-36.
- Yang Y, Zhang X, Chen LJ, Chiang SW, Tam PO, Lai TY, Chan CK, Wang N, Lam DS, Pang CP. Association of *NR2E3* but not *NRL* mutations with retinitis pigmentosa in the Chinese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Apr;51(4):2229-35
- Yang Z, Alvarez BV, Chakarova C, Jiang L, Karan G, Frederick JM, Zhao Y, Sauvé Y, Li X, Zrenner E, Wissinger B, Hollander AI, Katz B, Baehr W, Cremers FP, Casey JR, Bhattacharya SS, Zhang K.. Mutant carbonic anhydrase 4 impairs pH regulation and causes retinal photoreceptor degeneration. *Hum Mol Genet.* 2005 Jan 15;14(2):255-65
- Yeon Lee Y, Rio D.C. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu Rev Biochem.* 2015 ; 84: 291–323. Review

Yoshida N, Ikeda Y, Notomi S, Ishikawa K, Murakami Y, Hisatomi T, et al. Clinical Evidence of Sustained Chronic Inflammatory Reaction in Retinitis Pigmentosa. *Ophthalmology* [Internet]. 2013 Jan;120(1):100–5

Zhao Y, Shi J, Winey M, Klymkowsky MW. Identifying domains of EFHC1 involved in ciliary localization, ciliogenesis, and the regulation of Wnt signaling. *Dev Biol* 2016;411(2):257–65.

Pàgines web i bases de dades consultades

- Ensembl genome browser: www.ensembl.org/
- Exome Aggregation Consortium: <http://exac.broadinstitute.org/>
- Genome browser (UCSC): <https://genome.ucsc.edu/>
- Human genome mutation data base: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>
- National Center for Biotechnology Information: www.ncbi.nlm.nih.gov/
- Red Espanyola de Retina: <http://www.esretnet.org/>
- Retinal information network: <https://sph.uth.edu/retnet/>

Annexos

ANNEXOS

Annex 1: Taula amb els primers utilitzats, mida del fragment i temperatura annealing (PCR) per a la seqüenciació de variants en els estudis de segregació familiars.

HGVSc_name	HGVSc_name	Primers utilitzats	Mida fragment (bp)	Temperatura anellament
<i>.AGO2</i>	c.1516C>T	Fwd: GGCCTGAGTTCTCTGCCATT Rev: CATCATACAGGACGACGGGG	447	60°C
<i>ADAMTS6</i>	c.461T>G	Fwd: TGATCCACAGCAGGCAGTATC Rev: AGCTGCCCTTGAAAAGTCAATAC	438	61°C
<i>ARHGAP15</i>	n.423-3C>T	Fwd: GCGGTTCAAATGCTCCCAG Rev: GCATTTTTGATAGCGTGAACC	252	60°C
<i>ARL13B</i>	c.831C>A	Fwd: AGTCTCACAGTGTCTTGAAGT Rev: CAATGATGGCCGGTCTGTCT	336	60°C
<i>ARPC2</i>	c.57C>A	Fwd: CTCACCGCCCTTGTCTCTC Rev: GGCACCCCATTTCTCTCTC	224	60°C
<i>BASP1</i>	c.611C>G	Fwd: CTTCAGACTCAAACCCGGC Rev: TTGGATTCTCCACCCCTC	407	60°C
<i>CAPN5</i>	c.179A>C	Fwd: CTCACGCTCTCTCTCGC Rev: AATCAGGTTCCGCTGTCTG	246	60°C
<i>CDH10</i>	c.329A>T	Fwd: TTCTTTCAGCATCCTGCACCT Rev: GGGAAAGTTGGCTCATTGTC	313	60°C
<i>CDHR2</i>	c.1445A>G	Fwd: GCAATGGCACCTTCTCTGTG Rev: CTGTCGTGCTTCTCACACA	553	61°C
<i>CEP164</i>	c.2333G>A	Fwd: AGCATGAGCACCATCTGTGG Rev: CTGAGGACCTGGCATCCATC	488	60°C
<i>CYP4V2</i>	c.332T>C	Fwd: CCTGGACTCTTGGCCTCTTG Rev: CCAAACCTCATTGAGTCCCC	489	60°C
<i>DGKH</i>	c.215-2A>T	Fwd: TTCTTCTACTTCTCTCTCCCT Rev: ACAACGGCCACTTCTAAGCC	443	59°C
<i>DHX34</i>	c.1986_1987delCT	Fwd: GAGGGATGCCATTTTGGGG Rev: TCTGGAGTGTGCTTACACAGC	263	58°C
<i>DNAH14</i>	c.359C>G	Fwd: CTAGGTAGGCATGCAGGTGG Rev: GGAAGACGCTGACGACCTTA	467	60°C
<i>DSCAM</i>	c.2525A>C	Fwd: TTGCTTTGCTCATAAACACC Rev: TCCTGAGCCCTTGTAGGA	296	59°C
<i>FBLN5</i>	c.211T>G	Fwd: GACCACCTAGGTGTTTGGG Rev: TTGTGGTGAGCATGCCAGAT	461	60°C
<i>GRIK3</i>	c.1158G>T	Fwd: CATGGTCTTGGGGGAACAGT Rev: CTGAGACCACGCACCTTCTC	241	60°C
<i>GZF1</i>	c.824A>C	Fwd: GAGAAGACTCCGAGAGCAGC Rev: ACAGAAACGCTTCTCGCAA	260	60°C
<i>HMCN1</i>	c.8821T>G	Fwd: AGCTAGCATCAGCACTAGTATGT Rev: TCTGCTTTTCCAAGCATAACCT	295	60°C
<i>HMX2</i>	c.644C>T	Fwd: CTCCTTCGCACTCGGACTTT Rev: GTAAGCCGAGAGGTTGCTT	459	60°C
<i>HMX3</i>	c.644G>A	Fwd: GGAGAAGGCCTTGTGAGAG Rev: GCCGAGTTCTCGTGGTAGAG	540	60°C
<i>HOXC12</i>	c.679G>A	Fwd: TGCCATTATCTCCACCCAG Rev: GTTCTGAAACCAGATCTTGACC	202	59°C
<i>INVS</i>	c.725C>T	Fwd: ATCAGGATGCTGTCCAACA Rev: GTGGAAGGGAAGGCACAGAA	259	60°C
<i>KALRN</i>	c.6082T>G	Fwd: CGCCTTTGTCTTTGTCCAC Rev: TTGGCCTGAGTTTTCTCCC	240	60°C
<i>KAZN</i>	c.647G>C	Fwd: GGGTGGACGAGAGGAAACAG Rev: GGTGGAGGAGGTTTATTGG	472	60°C
<i>KIFC2</i>	c.600G>T c.604A>T	Fwd: CTGGAGTTCGGGGTCATGTT Rev: GCCTGTCTCCAGATCAG	503	60°C

LTBR	c.1060T>G	Fwd: GGCCTTCCTTCTCAACACT Rev: CCAAGCCTTGCCATCTTCT	238	60°C
MAGED1	c.748C>T	Fwd: AAGGCCCAACAGCTGATAC Rev: GTGAACATCCGGAGGACAGG	344	60°C
MAP1S	c.2458G>A	Fwd: GACGAAGACACAGAGGGCTT Rev: CCCTTGGTTTTGGCAGCAG	236	60°C
MFRP	c.1374G>T	Fwd: GTCAGGACACTCTGGGGTA Rev: ATGGGACACTGTGCAGTACG	286	60°C
MPP5	c.692T>C	Fwd: ACAGGCACTTTTACTGGCCC Rev: TCCCCACACTTTCTGCTTC	272	60°C
MYO7A	c.3514_3535delGGAGGCGGGACACCAAGGCGCT	Fwd: GCCAGTTCTTCTGCTCACT Rev: AACTAGCTAGCAGCGAAGCC	377	59°C
NCOA1	c.1316G>A	Fwd: GGCTCGTTCATCCACATTGC Rev: CATGCCAACGGGAGAGCTTA	364	60°C
NRBP1	c.436-3C>T	Fwd: TCCTTCGCTCCCTTCTGAT Rev: CACCTATGCCTTTTGTGTGGC	417	59°C
NRBP2	c.453C>T	Fwd: GCACCTTCTCAAGTACCGT Rev: CAGAGCTGGGGTTCCTACA	390	60°C
NUDT16L1	c.598T>G	Fwd: CCGATGGGTAACACGTCTCC Rev: GCCCTTCAGACCACAAAGT	349	60°C
NUPL1	c.213A>C	Fwd: TCCAGCACTACATCTGCTCC Rev: TTGGCCTATCACTAGCCCTT	269	70°C
OTOP1	c.1793G>C c.1774C>G	Fwd: AACTCAAGAGGTGGCACAGG Rev: AAGGACAGATTCCAGCCACC	859	60°C
PCDH1	c.2068G>A	Fwd: TCGAGAGCAACAAAGCACCT Rev: CAGGGTGATGGCACTGAAT	307	60°C
PCDHGB4	c.767A>G	Fwd: CACACGCCAAAATTCACGCA Rev: CGTCCCTTGCTTCCAAAAT	580	61°C
PDCD2L	n.917+6A>G	Fwd: TCTGCTTCTGTTTTAGCCTTCC Rev: TGGACTTCATCTGTGCCGTT	425	59°C
PHYHIPL	c.880C>G	Fwd: AGGTTTGAGATTGCCGAGA Rev: ACAGGTTTTGCAGCTGGGAT	360	60°C
PITPNM1	c.1726T>C	Fwd: GACAAGGCCTCTCCTGATGG Rev: TAGAAGTGAGGAGCGAGGCT	323	59°C
PJA1	c.1120G>A	Fwd: GCGAGGAGTGACCAAGTGAA Rev: CCCTCACTGCTACTGTCATTCTC	443	60°C
POU6F2	c.1739G>A	Fwd: CACACCATCTGAGAAGCCA Rev: GGGCTTGCCTTATTGCAG	412	59°C
PRIMPOL	c.662A>G	Fwd: GGGTTTGGTTTTGTGGGCA Rev: TCTGTACCCTTACATTTTATAGGA	619	59°C
PSMF1-1	c.17T>G	Fwd: GGGCGTCTCCATTTTGGTCT Rev: GGCAGAAGACAGTCCCTTCC	323	61°C
PSMF1-5	c.569C>T	Fwd: ATGTATCAGGTGCCTGGCTG Rev: TCCTCCACCCCAAAGGAAGA	225	60°C
PTPN23	c.3010G>A	Fwd: ATGTGCCATCAGCTCCATC Rev: AGGCCAGCAATCCAGGGAG	260	61°C
RALGPS2	c.236C>T	Fwd: AGGTCCTGAAGTAGGAGCGT Rev: AGCTTTTAGGCAACAAGGCA	297	59°C
RARS	c.318G>C	Fwd: CTTTGGTCATGCAATTAAGGC Rev: TCAAACCTGTGGCAATGTCCT	246	58
RBMX	c.559_561delTAT	Fwd: CATCCGAGCCAGTGAATCT Rev: TGAGCCAGACTCACGAAAT	462	59°C
RDH5	c.682C>T	Fwd: CCATGTCCTCAAAGTCCCC Rev: TCCTGTTACCCTCAACCTG	351	61°C
RING1	c.1004A>G	Fwd: TTCCCAGCCACTGAGAAAC Rev: TCCCTCTTACCCTGACC	474	60°C
RP1L1	c.3955G>A	Fwd: TCCAACCTTCTTGAACGCC Rev: CCTTCTCTTTGAGACCCTC	421	59°C
RPL14	c.445_446insCTGCTG	Fwd: ACACGATGGGCCAAGAAGAT Rev: CTGGCAGCCTGAAATGGGA	274	59°C
SHISA7	c.325A>C	Fwd: ATGTCATGGGCCAGTACGAC Rev: CCTGGGCAGTTGATATCCC	413	60°C
SPAG1	c.1059_1060insGAC	Fwd: TGTTGCAGAAAACCTTGTCAGAG Rev: TGAGCGAAACTGGCTTGTGA	308	60°C

TDRD7	c.126+7C>T	Fwd: CTGCTCTCAAGCATTACGA Rev: TGCACTGTGGCATCATCAAC	504	59°C
TNS1	c.1438G>A	Fwd: TGCTGAGTGGCTTTGGCTTA Rev: CAGACTCGTAGGGGTAGCCT	363	60°C
TOP1MT	c.218A>G	Fwd: TCCTCCTTTTCCCACCCTGA Rev: CTGGGGAGGAAGGGCTCTAT	548	60°C
VCL	c.590C>T	Fwd: CCAGACCCGGGATTGTTTCA Rev: GAACCTCAGAGTTTAGAACATGC	246	58°C
WBSCR17	c.800G>A	Fwd: TCATTCCGTGTGGTCTTGGG Rev: GCTTTCCTGGCCTCTCTCAG	355	60°C
WDR43	c.238A>G	Fwd: TATCCCATGCCTGCCAAAGG Rev: ATTTGATTCGCTCACCTGT	373	59°C
ZFHX3	c.1226-1G>A	Fwd: GCTCCGCAGAGATTCTGTCA Rev: GTCTGAAGGCAGCAGAAGT	321	60°C

Annex 2: llista RP de 296 gens (Text mining)

<i>RHO</i>	<i>TRPM1</i>	<i>ADAMTS10</i>	<i>EFHC1</i>	<i>CA4</i>	<i>ELOVL4</i>
<i>RPGR</i>	<i>NPHP1</i>	<i>MAPT</i>	<i>MFN2</i>	<i>MYOC</i>	<i>ADGRV1</i>
<i>ABCA4</i>	<i>FSCN2</i>	<i>TRIM32</i>	<i>EMD</i>	<i>ROM1</i>	<i>CLRN1</i>
<i>USH2A</i>	<i>GRM6</i>	<i>COL2A1</i>	<i>P2RX2</i>	<i>SAG</i>	<i>CFH</i>
<i>BEST1</i>	<i>SNRNP200</i>	<i>PRKCG</i>	<i>SPAST</i>	<i>OPN1MW</i>	<i>CYP4V2</i>
<i>MYO7A</i>	<i>SLC26A4</i>	<i>PDE6C</i>	<i>RIMS1</i>	<i>GRN</i>	<i>SLC4A11</i>
<i>PRPH2</i>	<i>LRAT</i>	<i>VSX2</i>	<i>TIMM8A</i>	<i>TGFBI</i>	<i>OPN1LW</i>
<i>CRB1</i>	<i>DFNB31</i>	<i>OPTN</i>	<i>FLNA</i>	<i>NPHP4</i>	<i>CEP290</i>
<i>RPE65</i>	<i>PDE6A</i>	<i>OTX2</i>	<i>RANBP2</i>	<i>PRPF3</i>	<i>LCA5</i>
<i>PRPF31</i>	<i>COL4A5</i>	<i>PRCD</i>	<i>NUB1</i>	<i>SERPINF1</i>	<i>HTRA1</i>
<i>RP2</i>	<i>CDHR1</i>	<i>RGS9</i>	<i>PNKD</i>	<i>EFEMP1</i>	<i>TOPORS</i>
<i>RP1</i>	<i>ARL3</i>	<i>CLN3</i>	<i>KIF21A</i>	<i>GJB2</i>	<i>OAT</i>
<i>NR2E3</i>	<i>RP9</i>	<i>BBS9</i>	<i>RAX2</i>	<i>BBS2</i>	<i>GDAP1</i>
<i>AIPL1</i>	<i>RGR</i>	<i>GPR179</i>	<i>ND4</i>	<i>MKKS</i>	<i>KCNJ13</i>
<i>CACNA1F</i>	<i>SPATA7</i>	<i>CDH3</i>	<i>ERCC6</i>	<i>ARL6</i>	<i>RCVRN</i>
<i>GUCY2D</i>	<i>RDH8</i>	<i>UNC119</i>	<i>GPR143</i>	<i>LMNA</i>	<i>C1QTNF5</i>
<i>CRX</i>	<i>MAK</i>	<i>RPGRIP1L</i>	<i>TCF4</i>	<i>POMGNT1</i>	<i>GNAT1</i>
<i>TULP1</i>	<i>RBP3</i>	<i>CAPN3</i>	<i>AAAS</i>	<i>PAX3</i>	<i>NPHP3</i>
<i>EYS</i>	<i>C8orf37</i>	<i>MYOT</i>	<i>KCNQ4</i>	<i>CHN1</i>	<i>GNAT2</i>
<i>RDH5</i>	<i>NMNAT1</i>	<i>PLA2G6</i>	<i>PMM2</i>	<i>RD3</i>	<i>FLVCR1</i>
<i>CNGA3</i>	<i>IQCB1</i>	<i>FOXC1</i>	<i>DCN</i>	<i>OPN1MW2</i>	<i>PDE6G</i>
<i>USH1C</i>	<i>NDP</i>	<i>COL4A3</i>	<i>KCND3</i>	<i>EYA4</i>	<i>CIB2</i>
<i>RLBP1</i>	<i>COL4A4</i>	<i>PITPNM3</i>	<i>LTBP2</i>	<i>GRK7</i>	<i>CRYGD</i>
<i>CDH23</i>	<i>IMPG1</i>	<i>PAX6</i>	<i>TEAD1</i>	<i>FKRP</i>	<i>CHML</i>
<i>CHM</i>	<i>PROM1</i>	<i>CRYBB2</i>	<i>EYA1</i>	<i>PANK2</i>	<i>SEMA4A</i>
<i>GUCA1A</i>	<i>CNNM4</i>	<i>GJA3</i>	<i>MITF</i>	<i>DHDDS</i>	<i>POC1B</i>
<i>NRL</i>	<i>BBS4</i>	<i>MPP4</i>	<i>ATL1</i>	<i>SLC19A2</i>	<i>SIX6</i>
<i>OPA1</i>	<i>C2orf71</i>	<i>PLP1</i>	<i>COL11A1</i>	<i>GJB6</i>	<i>TSPAN12</i>
<i>IMPDH1</i>	<i>ABCC6</i>	<i>MPP5</i>	<i>KCNQ3</i>	<i>C2</i>	<i>ADAMTS18</i>
<i>USH1G</i>	<i>ATP6</i>	<i>C3</i>	<i>C10orf2</i>	<i>BBS7</i>	<i>ZEB1</i>
<i>CNGB3</i>	<i>BBS10</i>	<i>PITX2</i>	<i>ATP1A3</i>	<i>PEX6</i>	<i>DRAM2</i>
<i>TIMP3</i>	<i>CNGB1</i>	<i>COCH</i>	<i>HMX1</i>	<i>BBS5</i>	<i>KRT3</i>
<i>MERTK</i>	<i>PDE6D</i>	<i>NXNL1</i>	<i>RRH</i>	<i>SOX10</i>	<i>DGKI</i>
<i>RPGRIP1</i>	<i>IMPG2</i>	<i>PRPS1</i>	<i>ADAM9</i>	<i>OPA3</i>	<i>AGBL5</i>
<i>MFRP</i>	<i>PHYH</i>	<i>COL6A3</i>	<i>GCK</i>	<i>ATF6</i>	<i>TMEM126A</i>
<i>PCDH15</i>	<i>ATXN7</i>	<i>FZD4</i>	<i>KRT17</i>	<i>CAPN5</i>	<i>CACNG3</i>
<i>PDE6B</i>	<i>ARR3</i>	<i>SMPX</i>	<i>TBCC</i>	<i>PDC</i>	<i>CRB2</i>
<i>WFS1</i>	<i>OPN4</i>	<i>OFD1</i>	<i>FHL1</i>	<i>INVS</i>	<i>EIF2AK3</i>
<i>RS1</i>	<i>CABP4</i>	<i>SPG11</i>	<i>HK1</i>	<i>TTPA</i>	<i>BFSP2</i>
<i>RDH12</i>	<i>PDZD7</i>	<i>MYH9</i>	<i>EPYC</i>	<i>MTTP</i>	<i>RAB28</i>
<i>NYX</i>	<i>VSX1</i>	<i>TYR</i>	<i>WDR73</i>	<i>PLEKHA1</i>	<i>ZFYVE26</i>
<i>CERKL</i>	<i>GUCA1B</i>	<i>IFT172</i>	<i>NEUROD1</i>	<i>FBN1</i>	<i>MYRIP</i>
<i>BBS1</i>	<i>ABHD12</i>	<i>BEST2</i>	<i>MYO6</i>	<i>HGSNAT</i>	<i>MBTPS2</i>
<i>ALMS1</i>	<i>C9orf72</i>	<i>COL18A1</i>	<i>PDE6H</i>	<i>PAX2</i>	<i>LZTFL1</i>
<i>PRPF8</i>	<i>CFB</i>	<i>WDR19</i>	<i>CLRN3</i>	<i>SRPX</i>	<i>DCTN1</i>
<i>ARMS2</i>	<i>CNGA1</i>	<i>ARX</i>	<i>KCNQ2</i>	<i>CRB3</i>	<i>POU4F3</i>
<i>KCNV2</i>	<i>IFT140</i>	<i>C21orf2</i>	<i>ATP1A2</i>	<i>OPTC</i>	
<i>FAM161A</i>	<i>MFSD8</i>	<i>EML1</i>	<i>GLRA1</i>	<i>TTC8</i>	
<i>GRK1</i>	<i>OPN1SW</i>	<i>TACSTD2</i>	<i>APOE</i>	<i>HNF4A</i>	
<i>RP1L1</i>	<i>KLHL7</i>	<i>SIX1</i>	<i>IFT122</i>	<i>VCAN</i>	

Publicacions

PUBLICACIONES RELACIONADAS

-De Sousa Dias M, Hernan I, Delás B, **Pascual B**, Borràs E, Gamundi MJ, Mañé B, Fernández-San José P, Ayuso C, Carballo M. New COL6A6 variant detected by whole-exome sequencing is linked to break points in intron 4 and 3'-UTR, deleting exon 5 of RHO, and causing adRP. *Mol Vis.* 2015 Aug 18;21:857-70.

-M.Carballo, MJ Gamundi, I Hernán, E Borràs, B Mañé, M de Sousa, **B Pascual**. "Genómica funcional aplicada al estudio de las enfermedades genéticas". En "Lecciones magistrales en diagnóstico e innovación". (F Bandrés Moya, J Barreiro, eds): 97-108. Cátedra extraordinaria ROCHE-UCM de diagnóstico e innovación (10 aniversario), 2014

- de Sousa Dias M, Hernan I, **Pascual B**, Borràs E, Mañe B, Mañe,Gamundi MJ, Carballo M Detection of mutations in genes that cause autosomal dominant retinitis pigmentosa by Long-Range PCR amplification and Next Generation Sequencing. *Mol Vis.* 2013; 19:654-664

- Borràs E, de Sousa Dias M, Hernan I, **Pascual B**, Mañé B, Gamundi MJ, Delás B. Carballo Detection of novel genetic variation in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Clin Genet.* 2013 Nov;84(5):441-52