



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Metodologies d'alt rendiment per a la identificació de noves mutacions i gens causants de distròfies de retina. Estudi funcional de nous candidats

Marta de Castro Miró

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Metodologies d'alt rendiment per a la
identificació de noves mutacions i gens
causants de distròfies de retina.
Estudi funcional de nous candidats.



Marta de Castro Miró
2017

**Metodologies d'alt rendiment per a la identificació de
noves mutacions i gens causants de distròfies de retina.
Estudi funcional de nous candidats.**

Memòria presentada per
Marta de Castro Miró

Per optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona
Programa de Genètica (H0Q03)
Curs 2016/2017

Tesi dirigida per la **Dra. Roser Gonzàlez Duarte** i el **Dr. Bru Cormand Rifà** al Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística de la
Universitat de Barcelona

Dra. Roser Gonzàlez Duarte

Dr. Bru Cormand Rifà

Marta de Castro Miró
2017

A la meva família

Resum

Les distròfies de retina (DR) formen un ampli grup dins les patologies hereditàries de la visió que es caracteritza perquè cursen amb afectació retinal i per la seva elevada heterogeneïtat clínica i genètica. A nivell clínic les DR es classifiquen entre formes estacionàries o progressives i formes maculars o generalitzades i, en general, són difícils de diagnosticar. A nivell genètic s'han identificat més de 260 gens causals, associats a formes sindròmiques i no sindròmiques, que s'hereten seguint els patrons coneguts d'herència mendeliana. A més, algunes DR, particularment les que afecten el nervi òptic, són causades per gens mitocondrials.

Els avenços realitzats aquests darrers anys en les metodologies de seqüenciació massiva han contribuït molt positivament a la identificació de nous gens i noves mutacions, millorant molt el rendiment del diagnòstic genètic de les DR i obrint noves vies per assegurar el diagnòstic clínic, predir l'evolució de la patologia i identificar noves dianes terapèutiques.

El treball que es presenta en aquesta tesi s'emmarca en una línia d'investigació del grup que té com a objectius: 1) Millorar l'eficàcia i facilitar el rendiment del diagnòstic genètic de les DR i, 2) contribuir a la identificació de nous gens causals. En relació al primer punt, en el primer capítol de la tesi es descriu la versió optimitzada i ampliada (100 gens) d'un xip que havia dissenyat prèviament el grup per al diagnòstic genètic de les DR, basat en l'anàlisi cosegregació amb marcadors de tipus SNP. Emprant aquest xip s'analitza una cohort de 36 famílies espanyoles afectades de DR.

En els darrers anys, les metodologies de seqüenciació massiva, especialment l'estudi de l'exoma o WES, han revolucionat el diagnòstic genètic i han esdevingut especialment rellevants per a l'estudi de malalties com les DR, genèticament molt heterogènies, i per tant inabordables amb la seqüenciació capil·lar convencional (Sanger), pels costos i temps que implicaria aquest tipus d'estudi. El segon capítol de la tesi descriu el diagnòstic genètic per WES de 33 famílies afectades de DR. Aquest treball ha conduït a la identificació de nous gens i noves mutacions causals, i no només demostra que la seqüenciació massiva és l'eina adient per aquest tipus de diagnòstic genètic, molt més eficaç, ràpida i

fiable que els xips emprats anteriorment, sinó que obre noves perspectives d'estudi de les bases genètiques d'aquestes patologies.

Finalment, es recull l'estudi de dues famílies, inicialment diagnosticades a nivell clínic com a retinosi pigmentària, la DR més freqüent, i on l'anàlisi amb el xip DR va donar resultats negatius. El diagnòstic genètic mitjançant WES ha revelat la presència de noves mutacions en el gen que causa la coroiderèmia, *CHM*, i la necessitat d'una reavaluació diagnòstica confirmatòria. Aquest estudi aporta dades rellevants per establir relacions genotip-fenotip en relació a la contribució d'altres variants patogèniques en gens DR que actuen de modificadors i de la inactivació del cromosoma X en el cas de femelles portadores.

Índex

INTRODUCCIÓ	1
1. L'ÒRGAN DE LA VISIÓ	3
1.1. La retina	3
1.2. Els fotoreceptors	5
2. DISTRÒFIES DE RETINA	7
2.1. Característiques genètiques	7
2.2. Característiques clíniques	11
Retinosi pigmentària	12
Distròfia de cons i distròfia de cons i bastons	13
Amaurosi Congènita de Leber	14
Ceguesa nocturna estacionària congènita	14
Coroiderèmia	15
Vitreoretinopaties	15
Distròfies de retina sindròmiques	16
Neuropatia òptica hereditària de Leber	17
2.3. Gens causants de les distròfies de retina i mutacions	17
Gens DR	17
Mutacions als gens DR	20
3. DIAGNÒSTIC GENÈTIC	31
3.1. Importància del diagnòstic genètic	31
3.2. Mètodes de diagnòstic	32
Mètodes directes	32
Mètodes indirectes	36
4. ESTUDIS FUNCIONALS I DE PATOGENICITAT	39
4.1. Anàlisi <i>in silico</i>	40
4.2. Anàlisi <i>in vitro</i>	41
4.3. Anàlisi <i>in vivo</i>	42
OBJECTIUS	45
RESULTATS	49
PUBLICACIÓ 1	53
PUBLICACIÓ 2	67
PUBLICACIÓ 3	101

DISCUSSIÓ	127
Diagnòstic de les distròfies de retina: del xip DR a l'exoma	128
Identificació de nous gens candidats	135
Limitacions de l'anàlisi de l'exoma	136
Identificació d'alteracions estructurals	138
Altres estratègies de seqüenciació massiva	141
Interpretació clínica de les dades obtingudes	143
Reptes de futur	145
CONCLUSIONS	149
BIBLIOGRAFIA	153

Introducció

1. L'òrgan de la visió

L'ull és l'òrgan responsable del sentit de la visió als humans. És capaç de detectar la llum i transformar-la en impulsos nerviosos que són conduïts al cervell a través del nervi òptic. Està format per un globus ocular que es manté gràcies als músculs extraoculars. La paret de l'ull consta de tres capes (Welsch 2010):

- Capa externa: inclou l'escleròtica, capa blanca i resistent característica de l'ull amb funció protectora i la còrnia, estructura hemisfèrica transparent localitzada al capdavant de l'ull, que permet el pas de la llum i que protegeix l'iris i el cristal·lí.
- Capa mitja: formada per l'iris, el cristal·lí, el teixit conjuntiu del cos ciliar, i la coroides, membrana molt irrigada amb vasos sanguinis que permet mantenir la temperatura de l'ull constant i nodrir les estructures internes del globus ocular.
- Capa interna o retina, on es troben les cèl·lules sensibles a la llum.

1.1. La retina

La retina és una capa molt prima i transparent situada a la part posterior de l'ull, en contacte amb la coroides i l'humor vitri. La seva funció principal és la percepció de la llum i el processament d'aquesta senyal perquè arribi al cervell. Per això es tracta d'un teixit neuronal molt especialitzat i estructurat en vuit capes clarament diferenciades (Figura 1) (Sung and Chuang 2010). La part més externa està formada per una sola capa de cèl·lules que formen l'epiteli pigmentari (RPE), mentre que la part interna consisteix en un teixit format per neurones i les seves connexions, donant lloc a la retina nerviosa. Aquesta està formada per diverses capes nuclears i plexiformes (on es donen les interaccions sinàptiques). A la capa nuclear externa o ONL hi ha les cèl·lules fotoreceptores que interaccionen, a través de la capa plexiforme externa (OPL), amb la capa nuclear interna (INL) formada per les cèl·lules bipolars, horitzontals, amacrines i de Müller. Per últim s'observa que les cèl·lules del INL entren en contacte a la capa plexiforme interna (IPL) amb les cèl·lules ganglionars (GCL) que, mitjançant axons molt llargs, formen el nervi òptic responsable de portar la senyal visual al cervell (Figura 1) (Ross and Pawlina 2008).

L'RPE és una monocapa de cèl·lules molt especialitzada que resulta fonamental pel funcionament dels fotoreceptors. Per una banda conté melanina, pigment que li dóna una coloració fosca i que li permet absorbir l'excés de llum, protegint els

fotoreceptors d'una exposició excessiva.

Per l'altra, forma la barrera hematoretinal, tot aïllant les cèl·lules de la retina de les substàncies transportades per la sang. Les cèl·lules del RPE estan en contacte directe amb el segment extern dels fotoreceptors i s'encarreguen de fagocitar els discos d'aquestes cèl·lules per la seva renovació (la taxa diària de fagocitosi de discos per l'RPE és del 10%, de tal manera que les cèl·lules del RPE són les que tenen més activitat fagocítica de tot el cos humà) (Rattner, Sun, and Nathans 1999). A més, també participen en el cicle visual, tot restaurant els pigments dissociats en resposta a la llum, i tenen un paper important en el manteniment de la integritat estructural de la retina ja que secreten diversos factors de creixement (Strauss 2005).

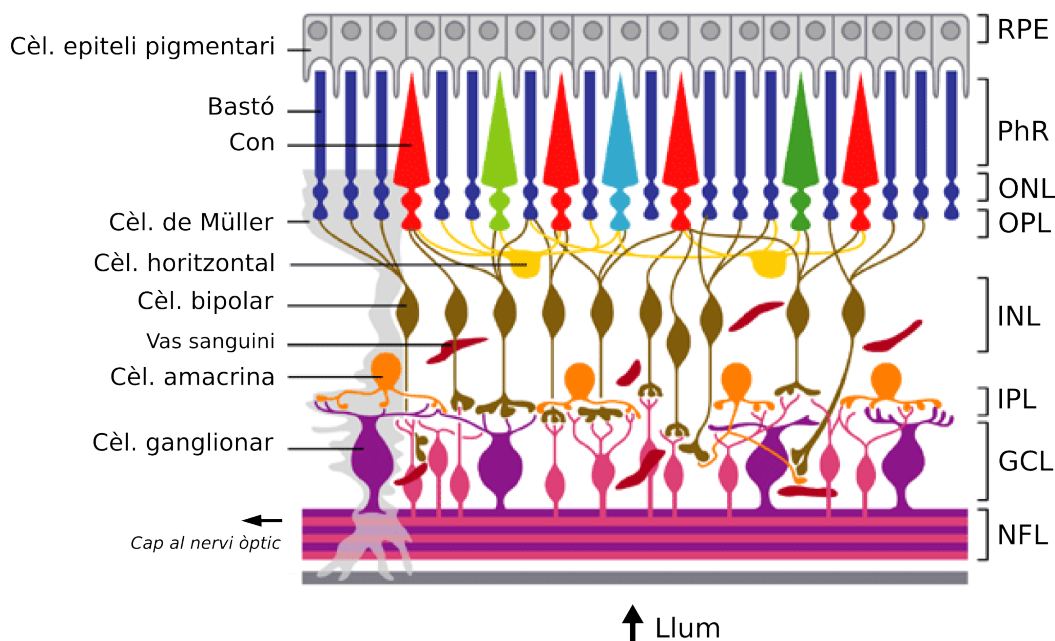


Figura 1. Estructura de la retina i les seves capes. L'esquema mostra els diferents tipus de cèl·lules que hi ha a cada capa i les connexions entre elles. La llum entra per la zona de les fibres que formen el nervi òptic i travessa totes les capes de la retina fins arribar als fotoreceptors. RPE: epiteli pigmentari; PhR: fotoreceptors; ONL: capa nuclear externa; OPL: capa plexiforme externa; INL: capa nuclear interna; IPL: capa plexiforme interna; GCL: capa de cèl·lules ganglionars; NFL: capa de fibres nervioses. Adaptada de Wilkinson-Berka 2004.

Les cèl·lules de la INL transmeten la informació dels fotoreceptors a les cèl·lules ganglionars. Per això, s'estableixen diferents connexions entre elles. Les cèl·lules bipolars connecten directament els fotoreceptors amb les cèl·lules ganglionars i, juntament amb la informació addicional que reben de les cèl·lules horitzontals, processen una imatge inicial, més aviat borrosa, i la converteixen en una imatge més nítida (Kolb 2003; Wässle 2004). Les cèl·lules horitzontals, per la seva banda, estableixen connexió, a més de amb les cèl·lules bipolars, amb els bastons i amb molts cons alhora, actuant com a receptors d'estímuls de molts camps de visió. Per altra banda, les cèl·lules amacrines estan molt ramificades i estableixen connexions tant amb les cèl·lules bipolars com amb les ganglionars, tot exercint una funció moduladora. Per últim, a la INL hi ha un altre tipus cel·lular, les cèl·lules de Müller, que són cèl·lules glijals encarregades de mantenir l'estructura i protegir el teixit neuronal a través de les seves prolongacions, que s'estenen per totes les capes de la retina (Kolb 2007a).

Finalment, les cèl·lules de la capa ganglionar s'encarreguen de processar la informació que prové inicialment dels fotoreceptors i d'enviar-la al cervell. Aquestes formen normalment una monocapa però a la màcula poden arribar a formar vuit capes cel·lulars (Kolb 2007b).

1.2. Els fotoreceptors

La retina dels vertebrats té dos tipus de cèl·lules fotosensibles: els cons i els bastons (Kolb 2012). L'estructura d'aquests dos tipus cel·lulars és molt similar. Estan formats per:

- El segment extern (OS), en contacte amb l'RPE i que està format per discos membranosos on es troba el fotopigment i altres proteïnes estructurals. En els bastons els discos es troben separats de la membrana plasmàtica mentre que en el cas dels cons es troben units. És en els discs on té lloc la fototransducció (veure apartat 2.3.1, Gens DR). La forma d'aquesta estructura serveix per diferenciar els dos tipus de fotoreceptors ja que en el cas dels bastons, l'OS té forma allargada i en els cons té forma cònica i és més curt. Aquesta estructura està en constant renovació ja que per l'extrem basal es van formant nous discos membranosos mentre que a l'apical els vells són fagocitats per l'RPE, a causa del gran estrès lumínic que pateixen. Aquest és l'únic mecanisme de renovació dels fotoreceptors, ja que en tractar-se de cèl·lules nervioses, no es divideixen ni regeneren (Kolb 2003; Strauss 2005).

El segment intern (IS), connectat amb el segment extern per un cili modificat,

conté el nucli i els orgànuls cel·lulars, especialment molts mitocondris, donat el gran requeriment d'energia que tenen els fotoreceptors. Aquí tenen lloc tots els processos metabòlics, la síntesi de proteïnes i l'endocitosi cel·lular, i s'origina un axó que estableix connexió sinàptica amb les cèl·lules bipolars i horitzontals de la INL de la retina (Wright et al. 2010).

La proporció dels dos tipus de fotoreceptors no és equitativa, amb un con per cada 20 bastons en humans. A més, aquestes cèl·lules presenten una distribució peculiar al llarg de la retina, ja que els cons es concentren a l'àrea central, en una zona anomenada fòvea, i van disminuint en nombre a mesura que s'avança cap a la perifèria de la retina on predominen els bastons (Rattner et al. 1999) (Figura 2).

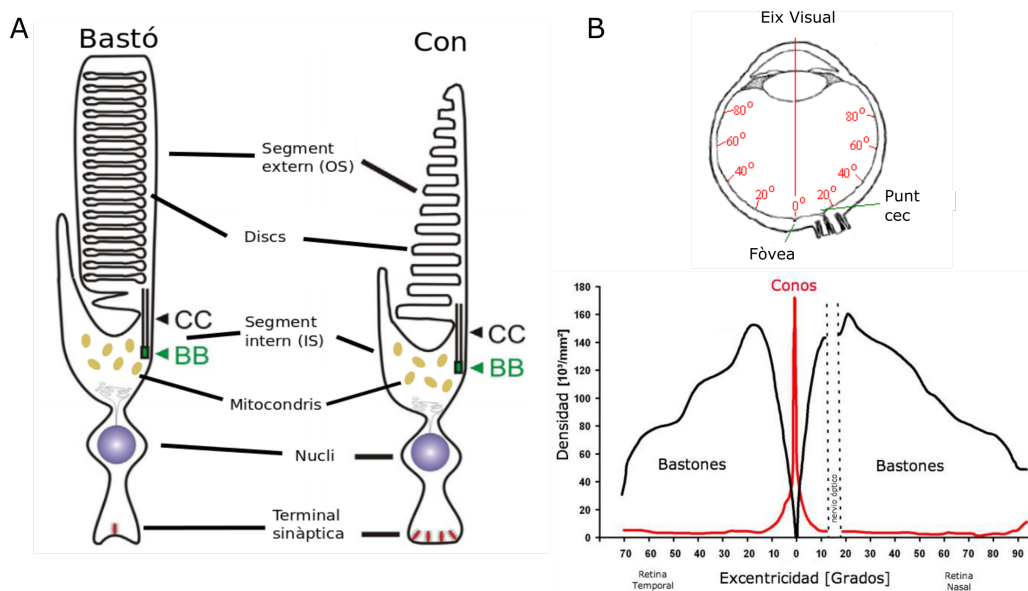


Figura 2. A) Estructura dels dos tipus de fotoreceptors dels vertebrats. Els cons són més curts, i tots els discs estan units a la membrana plasmàtica formant un continu, cosa que no s'esdevé en el cas dels bastons. BB: cos basal; CC: cili connector. Figura adaptada de (Slijkerman et al. 2015). B) Distribució de les cèl·lules fotoreceptores a la retina. Els cons estan concentrats a la part central de la retina, en un punt anomenat fòvea. El punt d'on surt el nervi òptic és un punt cec, ja que no hi ha fotoreceptors. Imatge adaptada de www.medciencia.com.

A nivell funcional, també hi ha diferències funcionals entre aquests dos tipus cel·lulars. Els bastons són responsables de la visió nocturna, essent molt sensibles

a condicions baixes de llum, mentre que els cons permeten la visió en color i determinen l'agudesesa visual, que és màxima a la fòvea donada la gran concentració de cons. Aquesta diferència ve donada pel pigment fotosensible que conté cada cèl·lula. Els bastons tenen la rodopsina, que pot detectar fins a un sol fotó de llum, mentre que els cons presenten diferents tipus d'opsines que reaccionen a diferents longituds d'ona (Masland 2001) i que necessiten uns 100 fotons de llum per excitar-se i enviar un senyal. L'elevada sensibilitat dels bastons a la llum explica per què es veu millor un estel si es fixa la mirada a una regió del seu voltant, de manera que els fotons incideixen en els bastons, que si s'enfoca directament, fent que la llum incideixi en els cons que no són prou sensibles per processar una intensitat de llum tan baixa (Lamb 2013). En primats hi ha tres tipus d'opsines als cons: l'opsina L, que reacciona a longituds d'ona llargues (corresponent a la llum vermella), l'opsina M, que detecta ones de longitud mitjana (color verd) i l'opsina S, que respon a longituds d'ona curtes (color blau). Cada cèl·lula només expressa un tipus d'opsina i aquestes estan repartides per tota la retina formant un “mosaic de colors”, de manera que es poden percebre altres tonalitats a part del verd, blau i vermell (Imamoto and Shichida 2014; Rowe 2002; Swaroop, Kim, and Forrest 2010).

2. Distròfies de retina

Les distròfies de retina (DR) hereditàries son un grup heterogeni de malalties corioretinals provocades per la degeneració de les cèl·lules de la retina, l'RPE i/o la coroides. Afecten 1 de cada 2000 individus, amb un total de més de 2 milions de persones afectades arreu del món, representant la primera causa de ceguesa no traumàtica. Es caracteritzen perquè presenten una gran heterogeneïtat clínica i genètica, característiques que donen un gran interès -i dificultat- al seu estudi (Berger, Kloeckener-Gruissem, and Neidhardt 2010).

2.1. Característiques genètiques

Les distròfies de retina són malalties monogèniques que poden presentar una herència autosòmica dominant (~30%), autosòmica recessiva (~60%) o lligada al sexe (~10%). Hi ha casos d'herència materna causats per mutacions en l'ADN mitocondrial (< 1%) (Hartong, Berson, and Dryja 2006; Sadun, La Morgia, and Carelli 2011). A aquest ventall de modes d'herència cal afegir altres peculiaritats genètiques d'aquest conjunt de patologies, com ara la presència de portadors

asimptomàtics en famílies amb mutacions dominants o de dones amb afectació en famílies amb mutacions al cromosoma X (pseudodominància) (Rozet et al. 2002; Vithana et al. 2001). Totes aquestes possibilitats fan difícil, en famílies petites, establir el patró d'herència i dictaminen que, per exemple, només es pugui descartar totalment una herència lligada al sexe en aquells casos en què hi ha transmissió home-home de la malaltia (Churchill et al. 2013) (Figura 3) S'han descrit uns pocs casos d'herència suposadament digènica, en què la causa de la malaltia són dos gens mutats en heterozigosi, però són situacions molt infreqüents dins del conjunt de les DR (Dryja et al. 1997; Kajiwara, Berson, and Dryja 1994).

Una de les principals característiques d'aquest grup de patologies és la seva gran heterogeneïtat. A nivell genètic, avui en dia ja es coneixen més de 250 gens causants de DR amb més de 5000 mutacions descrites (Falk et al. 2012; Stenson et al. 2012). Això vol dir que diferents individus amb la mateixa patologia clínica poden tenir una causa genètica diferent, ja sigui per diferents mutacions en el mateix gen (heterogeneïtat al·lèlica) o per mutacions en gens diferents (heterogeneïtat gènica o no al·lèlica). En general, cada gen explica un nombre petit de casos, tot i que hi ha alguns gens majoritaris en certes patologies com *RHO*, que es troba mutat en més del 25% de pacients amb adRP, els gens *CEP290* i *GUCY2D* que expliquen entre tots dos gairebé la meitat de casos de LCA, o el gen *ABCA4*, que és el principal candidat en distròfies de cons i bastons, sobretot en pacients amb la malaltia de Stargardt (Chacon-Camacho and Zenteno 2015; den Hollander et al. 2006; Roosing et al. 2014). Tot i així, en el 35% dels casos de DR no es coneix la causa genètica de la patologia. Aquest percentatge varia molt segons la malaltia, oscil·lant entre un 20% en acromatòpsia i un 90% en distròfia de cons recessiva (arCD). Hom creu que una proporció d'aquests casos es creu que s'explicaria per mutacions en regions intròniques o no codificants de gens coneguts que no s'acostumen a analitzar per seqüenciació, però s'hipotetitza que la majoria són causats per mutacions en gens encara no associats a distròfies de retina (Den Hollander et al. 2010). Aquesta darrera hipòtesi es veu reforçada per la contínua incorporació de nous gens a la llista de gens responsables de DR (Conte et al. 2015; El-Asrag et al. 2015; Gillespie et al. 2015; Kohl et al. 2015; Marfany and González-Duarte 2015).

Però, les distròfies de retina presenten a més una gran heterogeneïtat clínica. Pot passar que mutacions diferents en un mateix gen causin patologies diferents (p. ex. *CRB1* causa RP i Amaurosis Congènita de Leber (LCA) (Bujakowska et al.

2012), que donin lloc a patrons d'herència diferents (*RHO* causa RP en dominància i recessivitat (al-Magthteh et al. 1993; Kartasasmita et al. 2011; McAlear, Kraft, and Gross 2010)) i fins i tot, poden ser responsable de malalties sindròmiques i no sindròmiques (*USH2A* pot causar RP no sindròmica i síndrome d'Usher (Eudy et al. 1998; Rivolta et al. 2000); *IFT172* causa RP i el síndrome de Bardet-Bield (Bujakowska et al. 2015)) (Figura 4). A més, alguns individus portadors de la mateixa mutació en el mateix gen poden presentar clíniques diferenciades (Nishiguchi and Rivolta 2012; Wang et al. 2014), fins i tot en un mateixa família (Daiger, Sullivan, and Bowne 2013). Tot això s'explica per la complexitat funcional que acostumen a tenir aquests gens, sovint implicats en diferents vies funcionals, pel tipus de mutació que presenta la proteïna (les

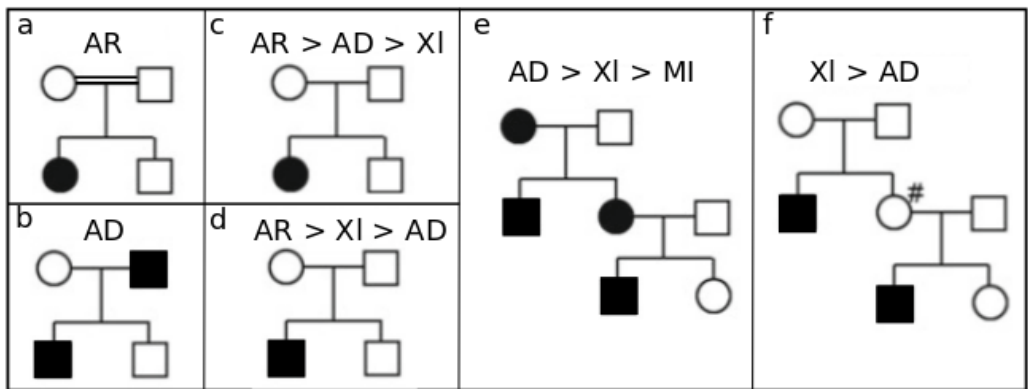


Figura 3. Estructures familiars que il·lustren els tipus d'herència de les distròfies de retina per ordre de probabilitat. a) Donada la consanguinitat dels pares, s'assumeix una herència recessiva amb homozigositat. b) Es considera un cas d'herència dominant ja que hi ha individus afectats en dues generacions amb transmissió entre homes. c) i d) En tenir només un individu afectat és difícil definir el tipus d'herència; el més probable és que es tracti d'una herència recessiva però podria ser un cas de dominància amb una mutació de novo, o, sobretot en el cas del noi afectat, podria tractar-se d'una herència lligada al sexe. e) Donat que hi ha individus afectats en diverses generacions consecutives, s'hipotetitza una herència dominant, però no es pot descartar una herència lligada al sexe o fins i tot l'herència materna. f) En haver-hi només homes afectats i dones portadores obligades (#), es reforça la idea d'una herència lligada al sexe, però també es podria tractar d'una herència dominant amb penetrància incompleta. AR: autosòmica recessiva; AD: autosòmica dominant; XI: herència lligada al sexe (cromosoma X) (de l'anglès X-linked); MI: herència materna (de l'anglès maternal inheritance). Figura modificada de Neveling et al. 2013.

mutacions de truncament prematur acostumen a causar fenotips més severes que les de canvi d'aminoàcid) i per la seva localització en diferents dominis funcionals (veure secció 2.3.2. Mutacions als gens DR), o per la interacció que aquestes proteïnes poden tenir amb d'altres proteïnes associades, sovint modificada pel context genètic de cada individu (Berger et al. 2010). La

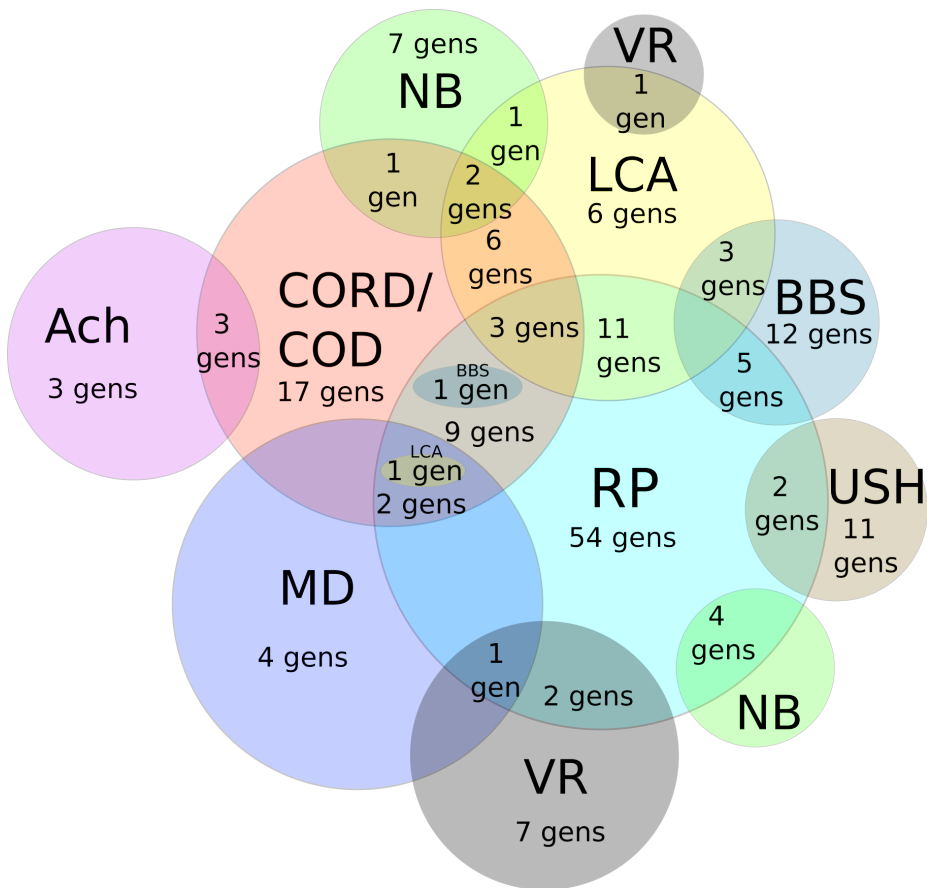


Figura 4. Principals distròfies de retina i número de gens associats. Es pot observar la gran heterogeneïtat fenotípica que presenten aquestes patologies, amb un mateix gen essent el responsable de fins a quatre malalties diferents. Ach: acromatòpsia; BBS: síndrome de Bardet-Biedl; CORD/COD: distròfia de cons i bastons o distròfia de cons; LCA: amaurosi congènita de Leber; MD: degeneració macular; NB: ceguesa nocturna (de l'anglès night blindness); RP: retinosi pigmentària; USH: síndrome d'Usher; VR: vitreoretinopaties exsudatives i erosives. Figura adaptada de Berger et al. 2010 i actualitzada a 2017.

influència de determinats factors ambientals també pot ser rellevant, com per exemple, la exposició diferencial a la llum (Athanasiou et al. 2013). Tot plegat fa difícil, en la majoria de casos, establir correlacions genotip-fenotip clares que simplifiquin el diagnòstic genètic.

2.2. Característiques clíniques

Hi ha més de 25 DR caracteritzades clínicament, que es poden classificar segons el tipus de fotoreceptors afectats i l'edat d'aparició i la progressió de la malaltia (Sundaram et al. 2011) (Figura 5). També es tenen en compte altres aspectes clínics, com ara la participació de la patologia en una síndrome en què l'ull no és l'únic òrgan afectat (Berger et al. 2010; Glöckle et al. 2013; Sahel, Marazova, and Audo 2015; Sundaram et al. 2011). Tot i que en les fases inicials les diferents malalties presenten alteracions diferenciades de la retina, apreciables a través de l'observació del fons de l'ull, en estadis avançats aquesta degenera gairebé en la seva totalitat, i això fa que resulti sovint difícil discernir entre les diferents distròfies.

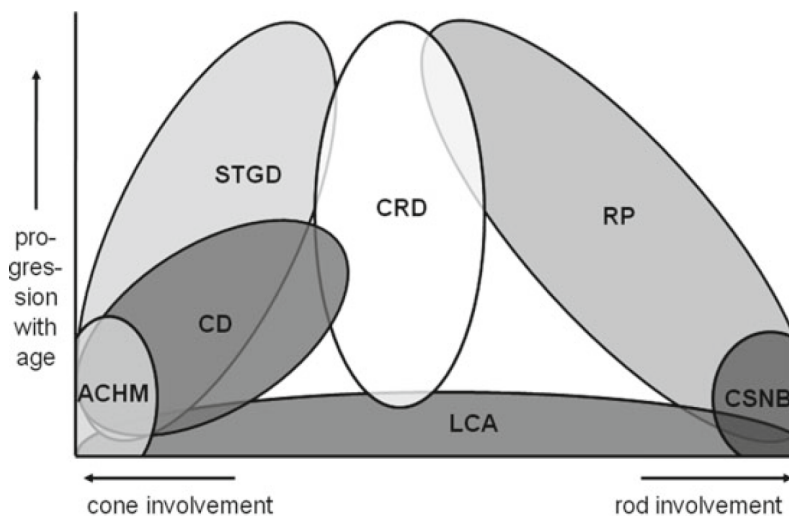


Figura 5. Representació de diferents DR segons el tipus de fotoreceptors que estan afectats (eix horitzontal), l'edat d'aparició i la progressió (eix vertical). Moltes d'aquestes malalties presenten trets fenotípics semblants, sobretot a l'inici i en estats molt avançats de la patologia, per la qual cosa es poden arribar a confondre. ACHM: acromatòpsia; CD: distròfia de cons; CRD: distròfia de cons i bastons; CSNB: Ceguesa nocturna estacionària congènita; LCA: amaurosis congènita de Leber; RP: retinosi pigmentària; STDG: malaltia de Stargardt. Extret de Neveling et al. 2013.

Entre les patologies que afecten inicialment els bastons, i que per tant provoquen una alteració inicial de la retina perifèrica, hi ha la retinosi pigmentària (RP), l'Amaurosi Congènita de Leber (LCA) (també anomenada RP severa) i la ceguesa nocturna estacionària congènita (CSNB). En canvi, altres patologies afecten sobretot els cons i per tant provoquen l'alteració de la màcula. Dins aquest grup hi ha la distròfia de cons (CD) i la distròfia de cons i bastons (CRD) que engloben patologies com la malaltia de Stargardt i l'acromatòpsia.

A part d'aquestes dues categories principals hi ha altres patologies que, tot i que no tenen el seu origen en les cèl·lules de la retina, provoquen la seva degeneració i acostumen a ser incloses en el conjunt de les DR. En aquest grup hi ha la coroiderèmia, que ve donada per l'afectació primerenca de la coroides, les vitreoretinopaties, amb origen en l'alteració de l'humor vitri i la neuropatia òptica hereditària de Leber, que afecta el nervi òptic.

Tot seguit es fa una descripció més acurada de les característiques de cada distròfia, així com de les principals síndromes que cursen amb afectació retinal.

Retinosi pigmentària

És la DR més comuna, amb una prevalença de 1:4.000 i un milió de persones afectades arreu del món. Presenta una edat d'aparició molt variable, ja que pot anar des de la infantesa fins més enllà dels 50 anys. Es caracteritza inicialment per la pèrdua de l'adaptació i visió nocturna causada per la degeneració dels bastons i evoluciona amb el constreyniment del camp visual, que es coneix com a visió en túnel. Amb el temps, els cons també queden afectats i es pot arribar a una ceguesa total per la restricció del camp visual. De la mateixa manera, les cèl·lules de la INL i les ganglionars acaben degenerant en estadis avançats de la malaltia (Hartong et al. 2006). En molts casos els símptomes inicials són difícils de detectar donada la gran quantitat de llum artificial que hi ha a molts llocs durant la nit, que fa que sigui suficient la visió amb els cons, i al fet que la pèrdua del camp visual no es nota fins que aquest no baixa dels 50°. Sovint els pacients descriuen l'etapa inicial de la malaltia com un període de falta de destresa en què, per exemple, ensopeguen i topen amb altres objectes més sovint d'allò que seria normal, però sense arribar a identificar que la causa n'és la disminució del camp visual (Szlyk et al. 2001).

La retinosi pigmentària és una malaltia molt variable, de manera que hi ha casos amb una evolució ràpida en què s'arriba a la ceguesa total en dues dècades, mentre que altres vegades l'evolució és lenta i no s'arriba a perdre la visió totalment.

Actualment, però, és molt difícil predir l'evolució de cada cas (Hartong et al. 2006).

El fons d'ull d'un pacient amb RP no presenta gaires canvis en les fases inicials, però amb el temps apareixen dipòsits en forma d'espícules òssies a la zona perifèrica de la retina. Aquesta pigmentació és el resultat de la migració de les cèl·lules del RPE cap a la retina neural en resposta a la mort dels bastons, i dona el nom a la malaltia. A més, es pot observar una atenuació dels vasos sanguinis i pal·lidesa papil·lar (Hamel 2006).

Genèticament, hi ha més de 60 gens que causen RP amb tots els patrons d'herència coneguts. En general es pot dir que no hi ha un gen majoritari, tot i que *RPGR* explica el 80% de les RP lligades al sexe, *RHO* està mutada en aproximadament el 25% dels casos de RP dominant i *USH2A* és el responsable del 10-15% dels casos de arRP. Tot i això, en la meitat dels pacients no s'ha identificat la causa molecular de la malaltia (Daiger et al. 2013; Fahim, Daiger, and Weleber 2013; Den Hollander et al. 2010).

Distròfia de cons i distròfia de cons i bastons

Al contrari que la RP, la distròfia de cons (CD) es caracteritza per una afectació primerenca dels cons, que es tradueix en una pèrdua inicial de l'agudesia visual, defectes en la visió en color, fotofòbia i pèrdua de la visió central. A vegades però, juntament amb l'afectació dels cons es dona també una degeneració dels bastons, malaltia que s'anomena distròfia de cons i bastons (CRD) i que és més severa. Tenen una prevalença conjunta de 1 en 30.000/40.000, essent la forma recessiva la més comuna. Tot i que es coneixen més de 20 gens responsables d'aquestes distròfies, un 75% dels casos no tenen una causa genètica coneguda. A nivell del fons d'ull, en els estadis inicials s'observa l'aparició de dipòsits pigmentaris a la màcula. Amb el temps, però, la malaltia segueix un curs clínic similar a la RP, fent que en els estadis avançats sigui molt difícil diferenciar-les clínicament (Hamel 2007; Roosing et al. 2014).

D'entre les distròfies de cons, la **malaltia de Stargardt** o distròfia macular juvenil, és la forma més comuna de les DR juvenils, amb una prevalença de 1 en 10.000 individus i alhora menys severa a causa de la seva progressió més lenta.. Té una edat d'aparició més primerenca que altres CD (entre els 10 i els 20 anys) i es caracteritza per l'aparició de dipòsits de pigments groguencs a la màcula (lipofuscina) en observar el fons d'ull i per la foscor de la coroides en fer una angiografia de fluorescència. La majoria de casos presenten una herència

recessiva, essent el gen causal *ABCA4*, però també s'han descrit uns pocs casos amb herència dominant causats per variants a *ELOVL4* (Haji Abdollahi and Hirose 2013; Molday and Zhang 2010; North, Gelman, and Tsang 2014; Walia and Fishman 2009).

L'**acromatòpsia**, caracteritzada per la incapacitat de veure els colors, és un tipus de CD congènita i estacionària. Té una prevalença de 1 en 30.000 individus. Fenotípicament, va acompanyada de nistagme (moviments involuntaris del globus ocular) i fotofòbia. És una malaltia amb herència recessiva i que està causada majoritàriament per mutacions als gens *CNGA3* i *CNGB3*, implicats en la cascada de fototransducció dels cons (veure secció 2.3.1. Gens DR) (Remmer et al. 2015; Roosing et al. 2014).

Amaurosi Congènita de Leber

És la forma més severa i primerenca de les DR. Causa ceguesa o impediments visuals greus abans del primer any de vida, condició que no acostuma a degenerar gaire més amb l'edat. Representa el 5% dels casos de DR, però el 20% de la ceguesa en nens, amb una incidència mundial de 1 en 50.000. Clínicament presenta algunes característiques particulars com ara les pupil·les amauròtiques i l'absència de resposta elèctrica de les cèl·lules de la retina. En canvi, l'aspecte del fons d'ull és molt variable, des de una retina normal, aparició d'espícules, afectació de la màcula, etc. Aquest aspecte s'interpreta com que podria haver-hi una certa correlació genotip-fenotip en aquesta malaltia, ja que en tractar-se d'una patologia que apareix durant el desenvolupament, aquest queda aturat en diferents moments segons el gen alterat, donant un fenotip concret per a cada gen (al contrari del que passa amb altres DR, ja que són malalties que apareixen un cop la retina ja està formada). Presenta en general una herència recessiva, amb una vintena de gens associats fins ara, tot i que entre el 30 i el 50% dels pacients no tenen diagnòstic genètic. A Europa, aproximadament el 20% dels casos estan causats per una mutació intrònica al gen *CEP290* (c.2991+1655A>G), que crea un lloc nou de *splicing*, tot provocant la inclusió d'un nou exó que altera la pauta de lectura de la proteïna normal, que queda interrompuda prematurament (p.C998X) (Berger et al. 2010; Chacon-Camacho and Zenteno 2015; Collin et al. 2012; den Hollander et al. 2008).

Ceguesa nocturna estacionària congènita

Com el seu nom indica, es tracta d'un grup de distròfies estacionàries

caracteritzades per problemes de visió i adaptació a la foscor. Acostumen a anar acompanyades de miopia, nistagme i estrabisme. L'aspecte del fons d'ull varia considerablement. Tot i que és possible establir certa correlació genotip-fenotip, és necessari realitzar un electroretinograma per poder diagnosticar correctament la malaltia, donada la similitud dels símptomes amb altres DR. Fisiològicament, el problema es dona en el processament de la senyal als fotoreceptors, en el reciclatge del retinol al RPE o en la transmissió del senyal a través de les cèl·lules bipolars. Està causada per mutacions en 18 gens, essent predominant l'herència lligada al cromosoma X (58%) (amb cert grau d'afectació de les dones), però també hi ha casos amb patrons d'herència autosòmica dominant (2%) i recessiva (40%). Tot i així, en un 20% dels casos no s'ha trobat la mutació patogènica en cap d'aquests 18 gens associats a la malaltia (Zeitz 2007; Zeitz, Robson, and Audo 2015).

Coroiderèmia

La coroiderèmia és una malaltia que provoca inicialment la degeneració de la coroides però que s'acaba estenent als fotoreceptors i a l'RPE, raó per la qual en estadis avançats s'acostuma a confondre amb d'altres DR, com ara l'RP, encara que no s'observen dipòsits pigmentaris. Els pacients experimenten una pèrdua de visió perifèrica progressiva que no acostuma a ser total abans dels 50 anys. És una malaltia lligada al sexe, i per tant afecta principalment els homes, amb una incidència de 1 en 50.000, encara que hi ha també una afectació variable a les dones, que és objecte d'estudi actualment. Al contrari que en la majoria de DR, aquesta patologia està causada per mutacions en un únic gen, *CHM*, un dels primers gens identificats com a responsables de DR. S'hi han descrit més de 200 mutacions diferents, la majoria de pèrdua de sentit. Aquest gen codifica la proteïna Rab Escort protein 1 (REP-1), un activador de la proteïna Rab, implicada en el transport vesicular (Coussa and Traboulsi 2012; Cremers et al. 1990; MacDonald et al. 2015; MacDonald, Russell, and Chan 2009).

Vitreoretinopaties

Les vitreoretinopaties són un conjunt de trastorns en què la principal característica és l'alteració congènita de l'humor vitri, junt amb la presència de cataractes prematures i una alta predisposició a partir un desprendiment de retina. Entre elles hi ha la síndrome de Stickler, la malaltia de Best, la síndrome de Goldmann-Favre, la retinosquisi juvenil i la síndrome de Wagner, entre d'altres. La majoria d'aquestes patologies s'expliquen per mutacions en un número petit

de gens (1-3) i a vegades, per diferenciar-les, és necessari conèixer la causa molecular (Edwards 2008; Kloeckener-Gruissem and Amstutz 2012; Pachydaki and Young 2007; Robin, Moran, and Ala-Kokko 2014).

Distròfies de retina sindròmiques

En el 20-30% dels casos, les distròfies de retina estan associades amb altres trastorns sistèmics, en què la retina no és l'únic òrgan afectat. Així, hi ha síndromes en què la DR està acompanyada de pèrdua auditiva, problemes neurològics, afectació renal, obesitat o trastorns musculoesquelètics, entre d'altres. S'acostumen a agrupar aquestes síndromes segons l'estructura cel·lular que afecten, de manera que tenim ciliopaties (*Bardet-Biedl*, *Joubert*, *Alström*, *Meckel*), malalties lisosòmiques (malalties d'acumulació lisosòmica, lipofuscinosis neuronals ceroides), trastorns peroxisòmics (*Zellweger*, *Refsum*) i malalties mitocondrials (*Kearns-Sayre*), entre d'altres. És molt important tenir present l'existència d'aquestes síndromes, ja que molts cops la degeneració de la retina és el primer símptoma i pot portar a un diagnòstic clínic erroni de la patologia del pacient (Werdich, Place, and Pierce 2014).

La malaltia sindròmica més comuna és la **síndrome d'Usher**. Té una herència autosòmica recessiva i afecta 1-4 de cada 250.000 persones. Es caracteritza per la pèrdua de l'audició, pèrdua de la visió i possibles problemes de balanceig. Es subdivideix en tres grups, segons la severitat i l'edat d'aparició dels diferents símptomes, essent el tipus II el més comú (56-67% dels casos). Aquest subtipus es caracteritza per una RP que apareix en l'adolescència i una hipoacúsia congènita que acostuma a ser força severa. Es coneixen 13 gens i 3 *loci* associats a la síndrome, essent el gen majoritari *USH2A*, que es troba mutat en el 75-80% dels casos (Bonnet and El-Amraoui 2012; Mathur and Yang 2015).

Una altra síndrome important és la **síndrome de Bardet-Biedl**. Es tracta d'un trastorn genètic pleiotròpic d'herència recessiva i una incidència de 1:140.000-160.000. Presenta un espectre ampli de característiques fenotípiques tals com degeneració de la retina, obesitat, polidactília, dificultats d'aprenentatge i problemes renals, entre d'altres. S'han descrit també més de 20 gens que expliquen el 70-80% dels casos diagnosticats, però no hi ha un gen majoritari. Aquests gens tenen en comú el seu paper en la formació, manteniment o funció del cili. Segons el gen mutat, la penetrància dels diferents símptomes varia, però és molt difícil establir relacions genotip-fenotip a causa del gran nombre de gens implicats. A més, aquesta síndrome acostuma a presentar molta variabilitat

intrafamiliar (M'hamdi, Ouertani, and Chaabouni-Bouhamed 2014; Novas et al. 2015).

Neuropatia òptica hereditària de Leber

Es tracta de la principal DR amb herència materna i és provocada per la degeneració de les cèl·lules ganglionars de la retina, que són altament sensibles a la disfunció mitocondrial i als desajustos metabòlics. Presenta una prevalença d'1 entre 35.000 individus, essent de 1:14.000 en el cas dels homes, ja que presenta un alt nivell de penetrància incompleta. Va ser la primera patologia mitocondrial descrita (Wallace et al. 1988). Clínicament, es caracteritza per un començament agut i sobtat de pèrdua de visió entre els 15 i els 30 anys. Normalment s'acostuma a donar primer en un dels ulls, però es reproduïx a les poques setmanes en l'altre. Evoluciona cap a una atròfia del nervi òptic molt severa amb una disminució de l'agudesesa visual, i acostuma a anar acompanyada d'una pèrdua de la visió en color. Està causada per mutacions al genoma mitocondrial, en gens que codifiquen les subunitats del complex I de la cadena respiratòria, amb tres mutacions que expliquen el 95% dels pacients: m.11778G>A p.R340H al gen *MT-ND4* (responsable del 50-70% dels casos), m.14484T>C p.M64V a *MT-ND6* (10-15%) i m.3460 G>A p.A52T a *MT-ND1* (8-25%) (Meyerson, Van Stavern, and McClelland 2015; Yu-Wai-Man 2015).

2.3. Gens causants de les distròfies de retina i mutacions

Gens DR

Des de la troballa del primer gent causant de retinosi pigmentària, la rodopsina (*RHO*), l'any 1990 (Dryja et al. 1990), el nombre de gens associats a les distròfies de retina no ha parat de créixer fins l'actualitat, quan ja es coneixen més de 250 gens (Figura 6; Taula 1).

Des de l'inici aquests gens s'han anat classificant segons el seu paper a la cèl·lula, i s'han arribat a descriure fins a vuit vies o processos cel·lulars en què tenen una funció important (Figura 7). L'estudi funcional dels gens responsables de les DR, a part d'ajudar a comprendre els mecanismes patogènics de la malaltia, ha servit en nombroses ocasions per assenyalar gens candidats a l'hora de fer una cerca funcional de gens alterats en DR i obre camins per al disseny de noves estratègies terapèutiques. A continuació s'expliquen breument les principals vies funcionals en què intervenen els productes dels gens responsables de les DR.

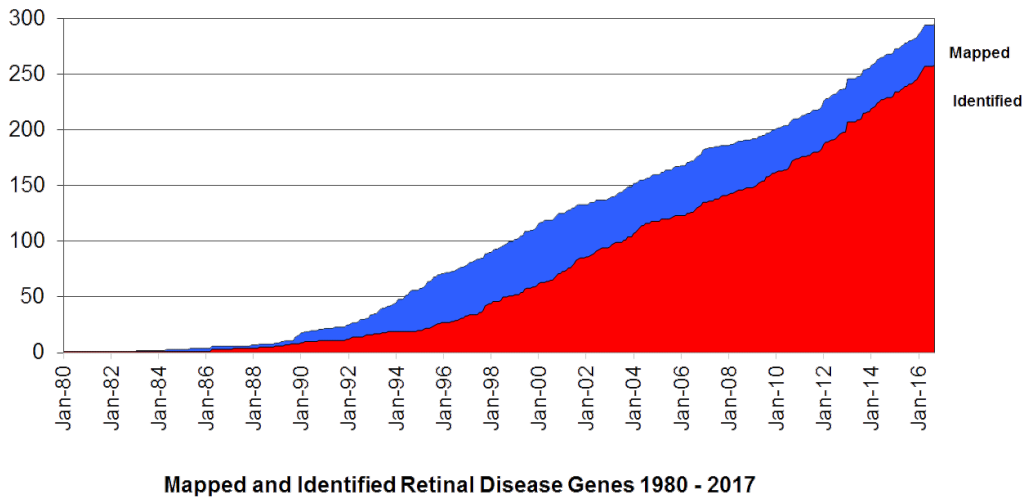


Figura 6. Nombre de gens causants de DR mapats i identificats al llarg del temps. Extret de Retnet (<https://sph.uth.edu/retnet/>).

La fototransducció és el procés mitjançant el qual la informació captada per les cèl·lules fotoreceptores es converteix en senyal elèctrica i es transmet al cervell. Es dona al segment extern de les cèl·lules fotoreceptores i, actualment, es coneixen més de 15 gens alterats només en RP que participen en aquest procés. Entre aquests hi ha gens que codifiquen fotopigments (*RHO*, *OPN1LW*, *OPN1MW*), fosfodiesterases (*PDE6A*, *PDE6B*) i diferents subunitats de canals iònics (*CNGA1*, *CNGB1*, *CNGA3*, *CNGB3*), elements molt importants perquè es doni la cascada de senyalització i posterior recuperació de la cèl·lula (Yau and Hardie 2009). Per mantenir la cascada de la fototransducció cal reciclar el cromòfor activat per la llum, procés que es coneix com a cicle visual o metabolisme del retinol. En aquesta via intervenen gens com *ABCA4*, proteïna transportadora implicada en un nombre important de casos de CRD, i *RPE65*, gen causant de LCA i RP, entre d'altres (Lee and Garg 2015; Molday, Rabin, and Molday 2000).

Una altra via amb molts gens implicats en les DR és la del transport ciliar. El moviment de proteïnes entre el segment extern i intern dels fotoreceptors es dona a través del cili connector (CC) i és un mecanisme molt ben regulat. En aquest procés intervenen proteïnes com *TULP1*, *RPGR*, *RPGRIP1* i *RAB28*, entre d'altres. Alteracions d'aquests gens donen lloc al conjunt de malalties anomenades ciliopaties, que inclouen diverses DR (Roosing et al. 2014; Won et al. 2018).

al. 2009; Zhao et al. 2003).

Molts dels factors de transcripció fonamentals pel desenvolupament de les cèl·lules fotoreceptores també s'han trobat mutats en les DR. És el cas de *CRX* i *OTX2*, factors essencials per a la diferenciació dels fotoreceptors durant el desenvolupament, o *NR2E3* i *NRL*, factors necessaris per dirigir les cèl·lules cap a la formació específica dels bastons (Karali and Banfi 2015; Schorderet and Escher 2009; Wang et al. 2004). El mateix passa amb proteïnes essencials per a la morfogènesi i el manteniment de l'estructura del fotoreceptor, sobretot dels discos dels OS, a causa del seu alt grau de renovació. Aquí trobem, entre d'altres, les proteïnes de membrana RDS (*PRPH2* si ens referim al gen), *ROM1* i *PROM1*, importants per a la formació dels discs; i *FSCN2* i *ELOVL4*, que tenen un paper en el manteniment de la funció fisiològica de les cèl·lules. Curiosament aquests gens causen DR majoritàriament amb herència dominant (Ambasudhan et al. 2004; Dryja et al. 1997; Wada et al. 2003).

Altres proteïnes tenen un paper important en l'adhesió i interacció cel·lular. És el cas de *CRB1*, proteïna transmembrana implicada en les unions entre els fotoreceptors i les cèl·lules de Müller, i de la Usherina (codificada pel gen *USH2A*), que es localitza a la regió apical del IS, embolcallant el CC. Els gens *MERTK*, *RIMS1*, *BEST1* i *IMPG1* són components de la matriu extracel·lular i s'expressen al RPE, amb el qual els fotoreceptors interaccionen contínuament. Tots ells són gens que es troben mutats amb freqüència en les DR (Roosing et al. 2014).

Finalment, hi ha un conjunt de gens que, tot i tenir una expressió molt ubiqua en l'organisme, en mutar només afecten la retina. És el cas de diversos gens que codifiquen proteïnes que formen part de la maquinària de *splicing*: *PRPF3*, *PRPF4*, *PRPF6*, *PRPF8*, *PRPF31* i *SNRNP200*. No està clar per què l'alteració d'aquests gens només té conseqüències a la retina. S'hipotetitza que és degut a la gran activitat de processament de transcrits que es dona en aquest teixit, molt per sobre que a la resta de teixits i òrgans, i que faria que s'acumulessin transcrits aberrants quan aquests factors estan mutats, tot provocant així la mort de les cèl·lules. Cal destacar que aquests gens sempre causen la malaltia en dominància, de tal manera que la presència de mutacions en homozigosi seria possiblement letal, ja que també afectarien altres teixits (Tanackovic et al. 2011). Un altre grup de gens amb expressió a tots els teixits són els que es troben mutats a l'ADN mitocondrial, ja que codifiquen les diferents subunitats que formen el complex I de la cadena respiratòria (Sadun et al. 2011).

Tot i això, hi ha un grup de gens associats a les distròfies de retina pels quals encara no està clar el paper que tindrien en aquests teixit o simplement no s'engloben en cap dels grups funcionals esmentats (*CERKL*, *PRCD*, *RD3*...), i que són actualment objecte d'estudi de molts grups (Fathinajafabadi et al. 2014; Molday, Jefferies, and Molday 2014).

Mutacions als gens DR

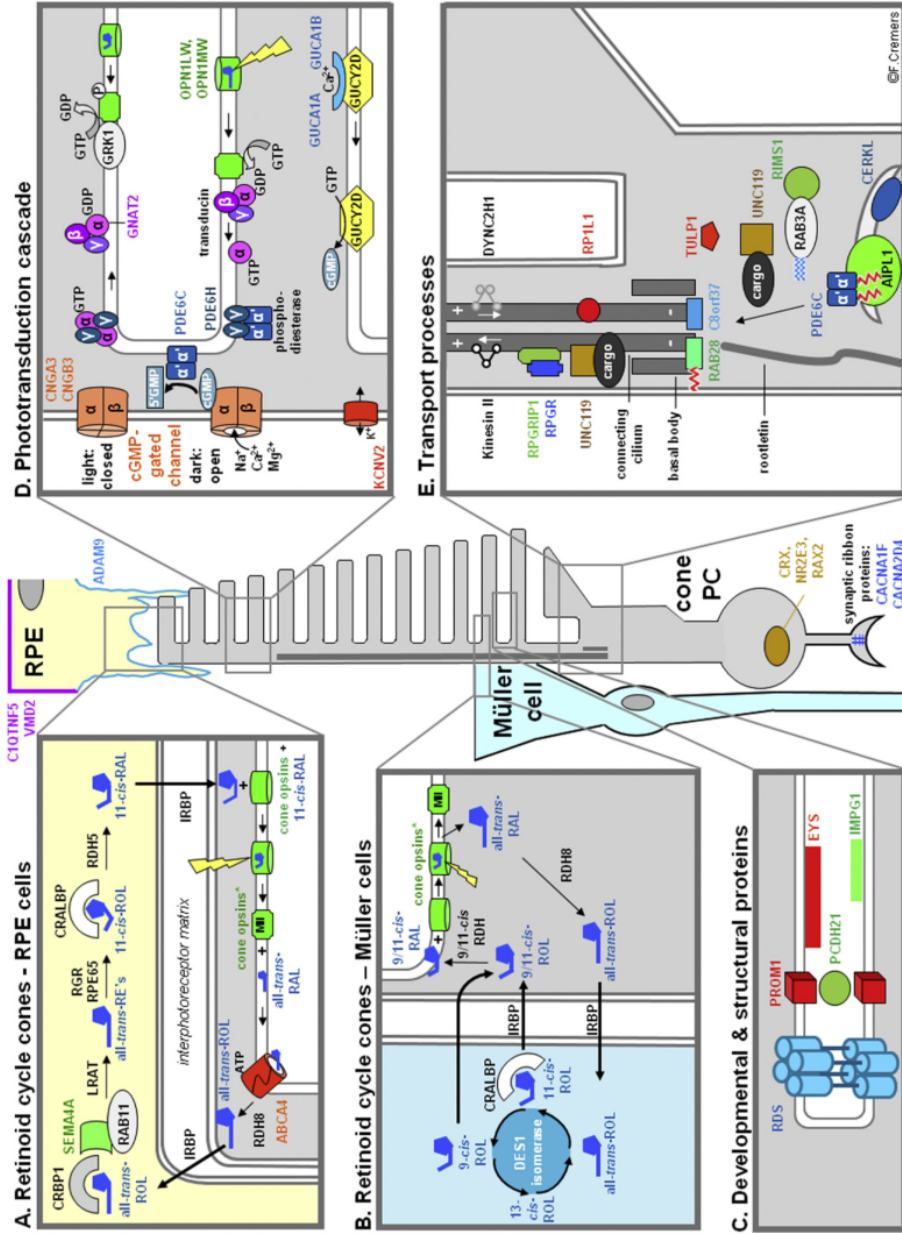
La implicació de cada gen en les diferents DR varia considerablement. Excepte en alguns casos que ja s'han comentat, no acostuma a haver-hi un gen majoritari associat a les patologies, però sí que és cert que en alguns gens s'han descrit moltes més mutacions que en d'altres (Taula 1). Un dels principals factors que hi contribueixen, lògicament, és la mida dels gens. Gens com *ABCA4* i *USH2A*, molt més grans que la majoria, presenten un nombre de mutacions molt més elevat que la resta de gens, fet que, alhora, els fa responsables d'un nombre més gran de casos. Un altre factor rellevant és el temps que ha transcorregut des que es va descriure la relació entre el gen i la patologia, que fa que el gen en qüestió s'hagi avaluat en un nombre molt més gran de pacients (p. ex. *RHO* i *CHM*). A mesura, però, que van millorant les tècniques de seqüenciació i que es van coneixent més gens associats a les DR, aquests escenari s'ha anat i s'anirà modificant, tot apropant-se més a la realitat genètica poblacional. El gen *EYS*, associat a les DR l'any 2008 (Collin et al. 2008), n'és un bon exemple. Des del seu descobriment, s'ha trobat mutat en una elevada proporció dels casos, tot passant a ser fins i tot el gen amb més variants descrites en diversos estudis (Arai et al. 2015; Iwanami et al. 2012).

Es troben tot tipus de mutacions en el gens causants de DR. Tot i així, certs gens/patologies tenen tendència a estar enriquits en certs tipus de variants patogèniques, que poden explicar en certs casos el seu grau d'implicació en cada distròfia. És interessant, per exemple que *CHM* acostumi a causar coreïderèmia per mutacions sense sentit o d'alteració de la pauta de lectura (delecions, insercions o mutacions de *splicing*) havent-hi només tres mutacions de canvi de sentit descrites com a patogèniques (de més de 200). Això suggereix que la causa de la malaltia en aquests casos seria l'absència de proteïna, i en general els transcrits mutats serien degradats pel mecanisme conegut com a *nonsense-mediated RNA decay* (NMD), o decaïment del RNA mediat per mutacions sense sentit (Furgoch et al. 2014). Aquest mecanisme reconeix les alteracions que donen lloc a codons d'aturada de la traducció prematurs i promou la degradació

Figura 7.

Representació de la funció a la retina dels productes de diferents gens implicats en DR. S'observa com els diferents gens es troben agrupats en un seguit de tasques fonamentals per al correcte funcionament dels fotoreceptors: metabolisme del retinol (A i B), fototransducció (D), transport ciliar (E), proteïnes estructurals fonamentals per a la formació dels fotoreceptors (C), així com factors de transcripció essencials pel correcte desenvolupament dels fotoreceptors i proteïnes sinàptiques.

Figura extreta de Roosing et al. 2014.



del transcrit corresponent perquè no es generin proteïnes truncades, la presència de les quals podria tenir efectes més negatius per a la cèl·lula que la seva absència (Kurosaki and Maquat 2016).

Generalment, les mutacions de truncament prematur de la proteïna tenen un efecte molt més sever, com és el cas de *CRBI*. Aquest gen causa majoritàriament RP si presenta mutacions de canvi de sentit, però acostuma a estar associada amb LCA, patologia més greu, quan la mutació provoca el truncament prematur de la proteïna (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Un altre exemple de variacions en el fenotip segons la mutació és *RHO*. Roman-Sanchez et al. descriuen que mutacions sense sentit que no provoquen la degradació del transcrit per NMD estan associades amb RP dominant, mentre que altres mutacions sense sentit que sí que estan sotmeses a aquest procés i que, per tant, resulten en la degradació del transcrit portador de la mutació, causen la malaltia amb herència recessiva (calen dos al·lels mutats per provocar la patologia), o amb herència dominant però amb un fenotip força més lleu (Roman-Sanchez, Wensel, and Wilson 2015). A més, la localització de la mutació en un domini proteic o un altre pot determinar també variacions en el fenotip. Així, *GUCY2D* causa majoritàriament LCA, però quan la mutació es troba en uns aminoàcids concrets, entre els residus 837 i 917, que corresponen al domini de dimerització de la proteïna, el pacient presenta CD/CRD en dominància (Lazar et al. 2015).

A part, certs gens tenen tendència a patir grans delecions, que sovint afecten exons sencers. Aquest és el cas, per exemple, dels gens *EYS* i *OPAI*, on més del 8% de les mutacions són d'aquest tipus, o *PRPF31*, amb un 15% de grans delecions. És molt important tenir en compte la possible presència d'aquestes mutacions quan es fa diagnòstic genètic ja que, com es comentarà més endavant, la detecció d'aquestes variants no és gens trivial i, segons la tècnica utilitzada, passen desapercebudes. També s'han descrit certes mutacions intròniques (més enllà dels llocs donadors i acceptors de *splicing*) amb un clar efecte patogènic, però representen un nombre molt petit de les mutacions donat que és molt més complicat demostrar l'efecte que aquestes tenen sobre la proteïna. Els casos acceptats fins ara són mutacions que donen lloc a un transcrit madur aberrant, normalment com a resultat de la creació d'un lloc de *splicing* que provoca la inclusió d'un pseudoexó o l'omissió d'un exó (den Hollander et al. 2006; Sangermano et al. 2016; Vaché et al. 2012). Aquests tipus de mutacions també poden passar desapercebudes fàcilment ja que la cerca de variants s'acostuma a centrar en les regions codificants dels gens i, per tant, no s'analitzen les

seqüències intròniques.

Pel que fa a les mutacions a l'ADN mitocondrial, aquestes presenten un alt grau de penetrància incompleta. Els mecanismes subjacents no estan clars, però es creu que hi intervenen tant factors genètics com ambientals. S'ha observat que un dels principals determinants és l'heteroplàsmia de l'ADN mitocondrial. La coexistència de diferents genomes mitocondrials en un mateix individu fa que el percentatge de mitocondris amb la mutació difereixi entre persones i entre teixits, amb conseqüències diferents en cada cas. Per això és molt important poder determinar el grau d'heteroplàsmia en cada individu i tenir-ho molt en compte a l'hora de fer el diagnòstic genètic (Meyerson et al. 2015; Wallace et al. 1988).

Taula 1. Relació de gens que causen distròfies de retina, patrons d'herència i nombre de mutacions diferents identificades fins ara. Dades extretes de Retnet (<https://sph.uth.edu/retnet/>) i the Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>) (Maig 2017).

Gen	RP	LCA	CSNB	CRD/CD	Acromatopsia	M. Stargardt/MD	Vitreoretinopaties	Altres DR	S. Usher	S. Bardet-Biedl	Altres síndromes	Nº Mutacions
<i>ABCA4</i>	ar			ar		ar		ar				1067
<i>ABCC6</i>											ar	293
<i>ABHD12</i>									ar		ar	16
<i>ACBD5</i>				ar								1
<i>ACO2</i>								ar				6
<i>ADAM9</i>				ar								8
<i>ADAMTS18</i>	ar										ar	9
<i>ADIPOR1</i>	ad										ar	2
<i>ADGRV1</i>									ar			153
<i>AGBL5</i>	ar											9
<i>AHI1</i>											ar	65
<i>AIPL1</i>		ar		ad								74
<i>ALMS1</i>		ar		ar							ar	278
<i>ARHGEF18</i>	ar											5
<i>ARL13B</i>											ar	9
<i>ARL2BP</i>	ar											2
<i>ARL3</i>	ad											1
<i>ARL6</i>	ar									ar		21
<i>ATF6</i>					ar							10
<i>ATXN7</i>											ad	4
<i>BBIP1</i>										ar		1
<i>B9D1</i>											ar	9
<i>B9D2</i>											ar	4
<i>BBS1</i>	ar									ar		97
<i>BBS10</i>										ar		97
<i>BBS12</i>										ar		56
<i>BBS2</i>										ar		87
<i>BBS4</i>		ar								ar		48
<i>BBS5</i>										ar		28
<i>BBS7</i>	ar									ar		37
<i>BBS9</i>										ar		45
<i>BCOR</i>											X1	44
<i>BEST1</i>	ad/ar					ar	ad/ar	ad				269
<i>C12orf65</i>											ar	9
<i>CIQTNF5</i>								ad				1

Gen	RP	LCA	CSNB	CRD/CD	Acromatopsia	M. Stargardt/MD	Vitreoretinopatias	Altres DR	S. Usher	S. Bardet-Bield	Altres síndromes	Nº Mutacions
<i>C21orf2</i>				ar								17
<i>C2orf71</i>	ar			ar								36
<i>C5orf42</i>											ar	93
<i>C8orf37</i>	ar			ar						ar		14
<i>CA4</i>	ad/ar											8
<i>CABP4</i>		ar	ar	ar								9
<i>CACNA1F</i>			XI	XI								159
<i>CACNA2D4</i>				ar								4
<i>CAPN5</i>							ad					2
<i>CC2D2A</i>											ar	81
<i>CDH23</i>									ar			296
<i>CDH3</i>											ar	28
<i>CDHR1</i>	ar			ar								34
<i>CEP164</i>											ar	8
<i>CEP250</i>									ar			1
<i>CEP290</i>		ar								ar	ar	255
<i>CEP41</i>											ar	8
<i>CERKL</i>	ar			ar								29
<i>CFH</i>						ar		ar				3
<i>CHM</i>								XI				271
<i>CIB2</i>									ar			1
<i>CISD2</i>											ar	3
<i>CLN3</i>	ar			ar							ar	64
<i>CLRN1</i>	ar								ar			32
<i>CLUAP1</i>		ar										1
<i>CNGA1</i>	ar											27
<i>CNGA3</i>				ar	ar							140
<i>CNGB1</i>	ar											40
<i>CNGB3</i>				ar	ar			ar				62
<i>CNNM4</i>		ar		ar								18
<i>COL11A1</i>											ad	76
<i>COL11A2</i>											ad	6
<i>COL2A1</i>											ad	538
<i>COL4A3</i>											ad	225
<i>COL4A4</i>											ad/ar	170
<i>COL4A5</i>											XI	910
<i>COL9A1</i>											ad	2
<i>COL9A2</i>											ad	1

Gen	RP	LCA	CSNB	CRD/CD	Acromatopsia	M. Stargardt/MD	Vitreoretinopaties	Altres DR	S. Usher	S. Bardet-Bield	Altres síndromes	Nº Mutacions
<i>CRB1</i>	ar	ar										292
<i>CRX</i>	ad	ad/ar		ad								87
<i>CSPP1</i>											ar	25
<i>CTNNA1</i>								ar				3
<i>CYP4V2</i>											ar	74
<i>DFNB31</i>									ar			28
<i>DHDDS</i>	ar											1
<i>DHX38</i>	ar											1
<i>DRAM2</i>				ar								8
<i>DTHD1</i>		ar										1
<i>EFEMP1</i>								ad				2
<i>ELOVL4</i>						ad		ad				11
<i>EMC1</i>	ar											1
<i>EXOSC2</i>											ar	2
<i>EYS</i>	ar	ar										235
<i>FAM161A</i>	ar											15
<i>FLVCR1</i>	ar										ar	1120
<i>FSCN2</i>	ad/ar	ar						ad				11
<i>FZD4</i>							ad					85
<i>GDF6</i>		ar										2
<i>GNAT1</i>			ad/ar									18
<i>GNAT2</i>					ar							11
<i>GNB3</i>			ar									6
<i>GNPTG</i>											ar	1
<i>GPR125</i>	ar											4
<i>GPR179</i>		ar	ar									15
<i>GRK1</i>	ar		ar									20
<i>GRM6</i>			ar									33
<i>GUCA1A</i>				ad								16
<i>GUCA1B</i>	ad/ar							ad				6
<i>GUCY2D</i>		ar		ad								213
<i>HARS</i>									ar			2
<i>HGSNAT</i>	ar											3
<i>HK1</i>	ad											1
<i>HMCN1</i>								ad				1
<i>HMX1</i>											ar	2
<i>IDH3B</i>	ar											2
<i>IFT140</i>	ar	ar									ar	47

Gen	RP	LCA	CSNB	CRD/CD	Acromatopsia	M. Stargardt/MD	Vitreoretinopatias	Altres DR	S. Usher	S. Bardet-Bield	Altres síndromes	Nº Mutacions
<i>IFT172</i>	ar									ar	ar	21
<i>IFT27</i>										ar		2
<i>IMPDH1</i>	ad/ar	ar										19
<i>IMPG1</i>	ad						ad					8
<i>IMPG2</i>	ar						ad					25
<i>INPP5E</i>	ar	ar									ar	42
<i>IQCB1</i>		ar									ar	34
<i>ITM2B</i>	ad											1
<i>KCNJ13</i>		ar					ad					10
<i>KCNV2</i>		ar		ar								87
<i>KIAA1549</i>	ar											3
<i>KIF11</i>							ad				ar	36
<i>KIZ</i>	ar											3
<i>KLHL7</i>	ad/ar											8
<i>LAMA1</i>											ar	34
<i>LCA5</i>	ar	ar										45
<i>LRAT</i>	ar	ar										18
<i>LRIT3</i>			ar									5
<i>LRP5</i>							ad/ar					63
<i>LZTFL1</i>										ar		3
<i>MAK</i>	ar											13
<i>MAPKAPK3</i>								ad				1
<i>MERTK</i>	ar	ar		ar								60
<i>MFRP</i>	ar										ar	7
<i>MFSD8</i>						ar						41
<i>MIR204</i>								ar				1
<i>MKKS</i>										ar		56
<i>MKS1</i>										ar	ar	48
<i>MVK</i>	ar											56
<i>MYO7A</i>									ar			407
<i>NBAS</i>											ar	2
<i>NDP</i>							XI				XI	155
<i>NEK2</i>	ar											1
<i>NEUROD1</i>	ar											1
<i>NMNAT1</i>		ar										64
<i>NPHP1</i>		ar								ar	ar	66
<i>NPHP3</i>											ar	71
<i>NPHP4</i>	ar										ar	103

Gen	RP	LCA	CSNB	CRD/CD	Acromatopsia	M. Stargardt/MD	Vitreoretinopathies	Altres DR	S. Usher	S. Bardet-Bield	Altres síndromes	Nº Mutacions
<i>NR2E3</i>	ad/ar							ar				74
<i>NRL</i>	ad/ar											22
<i>NYX</i>			X1									82
<i>OAT</i>								ar				69
<i>OFD1</i>	X1										X1	152
<i>OPA1</i>								ad				368
<i>OPA3</i>								ad/ar			ar	15
<i>OPN1LW</i>				X1								52
<i>OPN1MW</i>				X1								15
<i>OPN1SW</i>								ad				6
<i>OTX2</i>		ad										64
<i>PANK2</i>											ar	6
<i>PCDH15</i>									ar			98
<i>PCYT1A</i>											ar	9
<i>PDE6A</i>	ar											40
<i>PDE6B</i>	ar		ad									102
<i>PDE6C</i>				ar	ar							32
<i>PDE6D</i>											ar	1
<i>PDE6G</i>	ar											2
<i>PDE6H</i>				ad	ar							2
<i>PEX1</i>											ar	120
<i>PEX2</i>											ar	18
<i>PEX7</i>											ar	2
<i>PGK1</i>											ar	25
<i>PHYH</i>											ar	32
<i>PITPNM3</i>				ad								4
<i>PLA2G5</i>	ar											7
<i>PLK4</i>											ar	5
<i>PNPLA6</i>											ar	50
<i>POC1B</i>				ar							ar	3
<i>POMGNT1</i>	ar										ar	73
<i>PRCD</i>	ar											6
<i>PRDM13</i>						ad						5
<i>PROM1</i>	ar			ad		ar		ad				60
<i>PRPF3</i>	ad											7
<i>PRPF31</i>	ad											127
<i>PRPF4</i>	ad											3
<i>PRPF6</i>	ad											4

Gen	RP	LCA	CSNB	CRD/CD	Acromatopsia	M. Stargardt/MD	Vitreoretinopatias	Altres DR	S. Usher	S. Bardet-Bield	Altres síndromes	Nº Mutacions
<i>PRPF8</i>	ad											36
<i>PRPH2</i>	ad	ar		ad		ad/ar		ad				157
<i>PRPS1</i>											ar	27
<i>RAB28</i>				ar								4
<i>RAX2</i>				ad				ad				4
<i>RB1</i>								ad				1052
<i>RBP3</i>	ar	ar										10
<i>RBP4</i>											ar	5
<i>RD3</i>	ar	ar										13
<i>RDH11</i>											ar	2
<i>RDH12</i>	ad/ar	ar										97
<i>RDH5</i>		ar	ar	ar								50
<i>RGR</i>	ar											7
<i>RGS9</i>				ar								2
<i>RGS9BP</i>				ar								7
<i>RHO</i>	ad/ar		ad									201
<i>RIMS1</i>	ad			ad								4
<i>RLBP1</i>	ar			ar								33
<i>ROM1</i>	ad/ar											14
<i>RP1</i>	ad/ar											153
<i>RP1L1</i>	ar			ar				ad				33
<i>RP2</i>	X1											104
<i>RP9</i>	ad											3
<i>RPE65</i>	ad/ar	ar	ar									172
<i>RPGR</i>	X1			X1								373
<i>RPGRIP1</i>		ar		ar								116
<i>RPGRIP1L</i>											ar	43
<i>RS1</i>								X1				235
<i>RTN4IP1</i>								ar			ar	2
<i>SAG</i>	ar		ar									14
<i>SAMD11</i>	ar											4
<i>SDCCAG8</i>										ar	ar	18
<i>SEMA4A</i>	ad/ar			ad								12
<i>SLC24A1</i>			ar									26
<i>SLC25A46</i>								ar				11
<i>SLC7A14</i>	ar											8
<i>SNRNP200</i>	ad											24
<i>SPATA7</i>	ar	ar										29

Gen	RP	LCA	CSNB	CRD/CD	Acromatopsia	M. Stargardt/MD	Vitreoretinopatias	Altres DR	S. Usher	S. Bardet-Biedl	Altres síndromes	Nº Mutacions
<i>SPP2</i>	ad											1
<i>TCTN2</i>											ar	13
<i>TEAD1</i>											ad	2
<i>TIMM8A</i>											Xl	21
<i>TIMP3</i>								ad				15
<i>TMEM126A</i>								ar				1
<i>TMEM138</i>											ar	7
<i>TMEM216</i>											ar	8
<i>TMEM231</i>											ar	18
<i>TMEM237</i>											ar	10
<i>TOPORS</i>	ad											17
<i>TREX1</i>											ad	65
<i>TRIM32</i>											ar	15
<i>TRNT1</i>											ar	3
<i>TRPM1</i>			ar									66
<i>TSPAN12</i>							ad					35
<i>TTC8</i>	ar									ar		16
<i>TLL5</i>				ar								9
<i>TTPA</i>											ar	2
<i>TUB</i>											ar	1
<i>TUBGCP4</i>											ar	4
<i>TUBGCP6</i>											ar	6
<i>TULP1</i>	ar	ar		ar								67
<i>UNC119</i>				ad								2
<i>USH1C</i>									ar			45
<i>USH1G</i>									ar			24
<i>USH2A</i>	ar								ar			930
<i>VCAN</i>											ad	15
<i>VPS13B</i>											ar	187
<i>WDPCP</i>										ar	ar	7
<i>WDR19</i>											ar	27
<i>WFS1</i>											ar	318
<i>ZNF408</i>	ar						ad					8
<i>ZNF423</i>											ar	5
<i>ZNF513</i>	ar											1

3. Diagnòstic genètic

3.1. Importància del diagnòstic genètic

Conèixer la causa molecular d'una patologia pot semblar irrellevant per una persona que ja ha desenvolupat la malaltia, però al contrari d'aquesta creença, tenir un diagnòstic genètic pot oferir moltes avantatges tant per als pacients com per als seus familiars. En primer lloc, precisa i confirma el diagnòstic clínic del pacient, la qual cosa permet fer una prognosi i anticipar l'evolució del trastorn. Això, en un grup de malalties com les DR, és molt important, ja que es tracta d'un grup molt heterogeni de patologies genètiques en què sovint és difícil fer distincions a partir de les dades clíniques. També és molt important en el cas de les síndromes, en què les DR acostumen a ser el primer símptoma que apareix, i per tant obtenir el diagnòstic molecular anticipa la futura aparició de la resta de símptomes, tot ajudant a la seva possible prevenció (p. ex. en la malaltia de Refsum). A la vegada, ajuda a la definició del patró d'herència de la malaltia, que la majoria de les vegades, com ja s'ha comentat abans, només és una estimació. D'aquesta manera, les famílies obtenen un consell genètic adequat, tant per aquells membres que d'entrada no presenten cap símptoma però que poden haver heretat la/es mutació/ns (germans, cosins...), com per a futures generacions. Quan un membre afectat o portador de la mutació causal vol tenir descendència, pot saber quina probabilitat tindran els seus fills de desenvolupar la malaltia i/o evitar-la gràcies al diagnòstic prenatal o preimplantacional. Aquests diagnòstics només són factibles si es coneix la mutació causal que segrega a la família (Lee and Garg 2015).

Actualment s'està treballant molt en el desenvolupament de teràpies gèniques per a les DR. Ja s'han començat estudis clínics en patologies com la coroiderèmia (MacLaren et al. 2014) i la LCA causada per mutacions en *RPE65* (Bainbridge et al. 2015). No obstant, aquestes teràpies són sempre dirigides a un gen concret o, fins i tot, a una mutació particular, com és el cas de la mutació més freqüent a *CEP290*, c.2991+1655A>G (Collin et al. 2012), i per tant disposar d'un diagnòstic genètic pot obrir les portes, en un futur no massa llunyà, a l'ús d'aquestes teràpies (Boye et al. 2013).

A part del clar benefici pel pacient i la família, conèixer la causa molecular d'una patologia permet avançar en l'estudi de les seves bases moleculars, tot ajudant a entendre els mecanismes que la causen i obrint noves vies de recerca tant per al diagnòstic com per a la teràpia.

3.2. Mètodes de diagnòstic

Avui dia hi ha molts mètodes experimentals que permeten abordar el diagnòstic genètic. Cada aproximació té avantatges i inconvenients, de manera que cal tenir en compte les característiques de cada cas per fer la tria més adequada.

Les diferents metodologies es poden agrupar segons l'estratègia utilitzada. Per una banda, els mètodes directes tenen com a objectiu la identificació de la mutació causant de la patologia a partir, generalment, de la seqüenciació d'una part concreta del genoma de l'individu afectat. Per altra banda, els mètodes indirectes consisteixen en l'anàlisi de marcadors de localització coneguda en el genoma per tal d'acotar una regió candidata a contenir la mutació patogènica. En aquest últim cas, però, cal realitzar algun tipus de seqüenciació de la regió acotada (anàlisi directa) per identificar la causa molecular de la malaltia en el provant. Tot seguit s'explica amb més deteniment cadascuna d'aquestes metodologies.

Mètodes directes

Actualment, el principal mètode de detecció de mutacions utilitzat per al diagnòstic genètic és la seqüenciació manual directa dels gens. Aquesta consisteix en l'amplificació de les regions codificants (exons) dels gens mitjançant PCR i la posterior seqüenciació capil·lar Sanger dels productes obtinguts. La seqüència que s'obté, en forma de cromatograma, es compara amb la seqüència de referència del gen (Figura 8). Això permet la detecció de possibles mutacions puntuals i petites delecions o insercions. Aquest mètode s'utilitza per a la cerca de mutacions patogèniques en gens candidats, ja siguin gens prèviament descrits com a causants de distròfies de retina o candidats funcionals que es creu que poden estar implicats en la malaltia (Napier et al. 2014; Tanackovic et al. 2011). També és el mètode escollit a l'hora de validar variants detectades per qualsevol procediment.

Un altra estratègia utilitzada en el diagnòstic de les DR és la detecció de mutacions conegudes mitjançant la tecnologia APEX (de l'anglès *Allele-Specific Primer Extension*). Consisteix en la hibridació de l'ADN del pacient amb una petita seqüència de nucleòtids unida a un suport sòlid (xip) i la seva posterior amplificació, incorporant un nucleòtid marcat amb un fluorocrom que permet determinar la variant del pacient en aquella posició (Kurg et al. 2000; Zernant et al. 2005). Tot i que el temps d'anàlisi per aquesta tecnologia és força curt (hores) i la plataforma és prou flexible com per anar incorporant noves mutacions a

mesura que es van descobrir, les característiques de les DR fan que sigui un mètode amb una eficàcia diagnòstica limitada (~15 %) (van Huet et al. 2015). Això es deu al fet que, excepte en comptades ocasions, les mutacions acostumen a ser força privades, amb molt poques coincidències entre pacients. A més, tot i la flexibilitat del sistema, no hi estan incloses totes les mutacions identificades fins ara. Així per exemple, de les més de 2300 mutacions descrites com a causants de arRP fins ara, l'última actualització del xip de diagnòstic APEX per aquesta patologia només en contempla 710 (<http://www.asperbio.com/asper-ophthalmics/autosomal-recessive-retinitis-pigmentosa-genetic-testing/autosomal-recessive-retinitis-pigmentosa-apex-based-test-details>) A més, els xips estan dissenyats per a cada distròfia de retina i per a cada patró d'herència per separat, de manera que en casos en què el fenotip o l'herència no estan clarament definits, pot ser necessari realitzar l'anàlisi amb diferents xips per descartar totes les possibilitats.

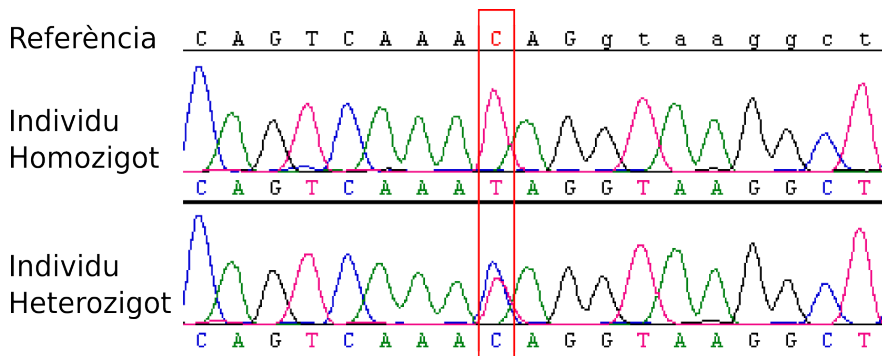


Figura 8. Cromatogrames obtinguts per seqüenciació Sanger. La seqüència superior presenta un canvi en homozigosi C>T, mentre que la inferior mostra el canvi en heterozigosi

Amb l'adveniment de les tècniques d'anàlisi “*high-throughput*” que permeten seqüenciar a gran escala, el panorama ha canviat radicalment. Una d'elles és la “reseqüenciació”. Inicialment es van desenvolupar diversos xips de reseqüenciació basats en la tecnologia dels *microarrays*. Mitjançant la hibridació d'ADN procedent del pacient amb sondes específiques, es pot genotipar cadascuna de les posicions de les regions codificants dels gens d'interès, tot detectant la presència de variants nucleotídiques puntuals. Tot i que aquesta tecnologia permet seqüenciar un gran nombre de regions a la vegada, detectant

tant mutacions conegudes com noves, presenta diverses limitacions. Una de les més importants és la no detecció de delecions ni d'insercions, mutacions molt freqüents en les DR. A més, el nombre de posicions que es poden analitzar simultàniament és limitat, per la qual cosa no és possible incloure tots els gens en un únic xip (Jaakson et al. 2003; Mandal et al. 2005).

Però l'arribada de les tècniques de seqüenciació massiva de nova generació (NGS, per *Next Generation Sequencing*) ha deixat enrere la utilització d'aquest xips. Aquest nou tipus de tecnologia permet la seqüenciació de milions de fragments de DNA de forma paral·lela i automatitzada. A partir d'una petita quantitat de ADN (~5 µg), el genoma és fragmentat a l'atzar per un procés físic o enzimàtic, normalment en fragments petits de 100-150 pb, i unit a uns adaptadors que permeten unir els fragments a uns encebadors fixats a una superfície sòlida. Els adaptadors també permeten la unió d'una polimerasa d'ADN, que amplifica els fragments formant grups amb la mateixa seqüència nucleotídica. Durant l'amplificació es van unint els nucleòtids marcats amb fluorocroms específics que són llegits pel seqüenciador. D'aquesta manera, d'un mateix fragment d'ADN s'obtenen moltes lectures (Goodwin, McPherson, and McCombie 2016). Posteriorment cal mapar i alinear les seqüències obtingudes contra el genoma de referència, per així, mitjançant eines bioinformàtiques, identificar les variants específiques de cada individu, procés conegut com a "*variant calling*", i anotar el tipus de canvi que provoquen sobre la proteïna (Glöckle et al. 2013; Metzker 2010) (Figura 9).

La seqüenciació de l'exoma (WES, de l'anglès *Whole Exome Sequencing*) és una de les aproximacions basades en la metodologia NGS que més s'utilitza avui dia per al diagnòstic de les DR. Consisteix a seqüenciar només les regions codificants de tots els gens coneguts en el genoma humà, que representen menys del 2% de tot el genoma (Bamshad et al. 2011). Per seleccionar aquestes regions, un cop l'ADN ha estat fragmentat i lligat als adaptadors, aquest s'hibrida contra sondes específiques de les regions d'interès, en aquest cas uns 180.000 exons, i són separats de la resta d'ADN.

D'aquesta manera es detecten i s'estudien totes les variants presents en regions codificants del genoma, ja siguin en gens coneguts com a responsables de DR o en altres gens (Neveling et al. 2012). Aquesta metodologia oberta permet estudiar la presència de variants que, tot i no ser la causa principal de la patologia, poden tenir un paper en la modulació del fenotip del pacient (variants modificadores).

Però, tot i que en principi s'analitzen tots els gens del genoma, sempre hi ha

alguns segments amb poca cobertura (número de vegades que es llegeix cada nucleòtid), ja sigui per problemes en la hibridació amb les sondes que seleccionen les regions d'interès o per problemes tècnics en el procés de seqüenciació, havent-hi posicions que no queden ben “llegides”. Això és degut al tipus de seqüències d'aquestes regions, que acostumen a tenir un contingut elevat de CG o moltes repeticions d'un o dos nucleòtids (Siemiatkowska et al. 2014). En el cas de les DR s'ha descrit que el 10% de les regions codificants dels gens causants de RP i LCA no queden cobertes per l'exoma (Ajmal et al. 2014). Per intentar solucionar -en part- aquest problema, hi ha una variant de l'exoma anomenada “*Targeted next-generation sequencing*” o seqüenciació dirigida de nova generació, que consisteix en l'amplificació per PCR múltiple (en comptes de captura per hibridació) i seqüenciació d'un nombre concret de gens o de regions d'interès. El fet que aquest procediment se centri en una regió genòmica (o conjunt de regions) més petita, permet optimitzar més fàcilment el protocol experimental i s'aconsegueix una millor cobertura de les zones desitjades. D'aquesta manera s'han posat a punt diferents dissenys, des de panells amb els gens causants d'una distròfia de retina concreta o síndrome (Bujakowska et al. 2014), fins a panells amb la majoria de gens associats a les DR (Wang et al. 2013). També es poden fer dissenys en què s'analitzen regions promotores i intròniques dels gens d'interès, anant més a fons en l'anàlisi dels gens i augmentant la probabilitat d'identificar la mutació causal (Fernandez-San Jose et al. 2015; Schorderet et al. 2013).

Per últim, es pot recórrer a la seqüenciació del genoma complet (WGS, de l'anglès *Whole Genome Sequencing*), que permet explorar totes les variants genètiques d'un individu en qualsevol regió del genoma. No obstant, a causa de la gran quantitat de bases a seqüenciar, es perd cobertura respecte a les altres aproximacions. A més, tot i què òbviament s'obté molta més informació (~ 3,5 milions de variants per individu), avui dia encara resulta molt difícil avaluar l'impacte funcional de les variants situades fora de les regions codificants dels gens, i per això (i pel cost elevat que encara té) no acostuma a ser l'opció principal a l'hora de cercar canvis patogènics en malalties monogèniques com les DR (Nishiguchi et al. 2013; Royer-Bertrand and Rivolta 2015). Tot i així, presenta considerables avantatges, ja que permet la detecció de variants estructurals grans com duplicacions, inversions o reorganitzacions cromosòmiques complexes, difícilment detectables mitjançant WES o targeted sequencing.

Mètodes indirectes

El diagnòstic indirecte pot resultar una bona opció en malalties amb una heterogeneïtat genètica elevada, ja que permet avaluar la possibilitat que un *locus* contingui la mutació patogènica analitzant només uns pocs marcadors. Es basa en el lligament genètic, pel qual dues regions properes en el genoma tenen tendència a transmetre's conjuntament a la descendència ja que la probabilitat que es doni una recombinació entre elles és molt petita (Dueker and Pericak-Vance 2014). Un cop s'estableix la regió més probable que contindria el gen responsable de la malaltia, cal utilitzar una tècnica d'anàlisi directa per identificar la mutació causal, però amb l'avantatge que la regió candidata és molt més petita.

El mètode principal d'anàlisi indirecta és el *linkage* o lligament, en què es busca una regió cromosòmica que s'hereti conjuntament amb el fenotip de la malaltia (i per tant amb el gen que la causa) en una família. Partint de la premissa que la malaltia és monogènica i que, per tant, en una família concreta tots els membres afectats són portadors de la mateixa alteració genètica, es pot arribar a acotar la regió genòmica compartida per tots els pacients de la família (Dawn Teare and Barrett 2005). Després cal analitzar tots els gens de la regió per identificar la mutació o mutacions causals. Aquesta estratègia es pot fer servir tant per identificar els gens coneguts que cosegreguen amb la patologia a la família com per buscar nous gens causants de DR (Chakarova et al. 2002; Tuson, Marfany, and González-Duarte 2004; Xu et al. 1996; Zhao et al. 2006, 2009). La limitació d'aquest tipus d'anàlisi és que calen famílies grans amb uns quants individus afectats, ja que sinó el poder estadístic és insuficient per identificar la regió implicada en el trastorn. Com més petita és la família, més regions candidates apareixen, i per tant més falsos positius hi ha.

Una segona estratègia basada en l'anàlisi indirecta és el mapatge per homozigotitat. En famílies amb consanguinitat coneguda en què la malaltia es transmet de forma recessiva s'espera trobar una mutació en homozigosi heretada d'un ancestre comú per via paterna i materna; és el que s'anomena identitat per descendència (IBD, de l'anglès *identity by descent*). El mateix s'espera dels marcadors propers a la mutació causal, de manera que, a partir de la genotipació de marcadors polimòrfics, es poden identificar les regions del genoma que són homozigotes en el pacient i per tant, candidates a contenir la variant patogènica.

Aquesta estratègia també es pot aplicar en famílies sense consanguinitat coneguda però pertanyents a poblacions en què el grau de consanguinitat és més gran del que hom podria esperar, per factors com l'aïllament físic (pobles molt

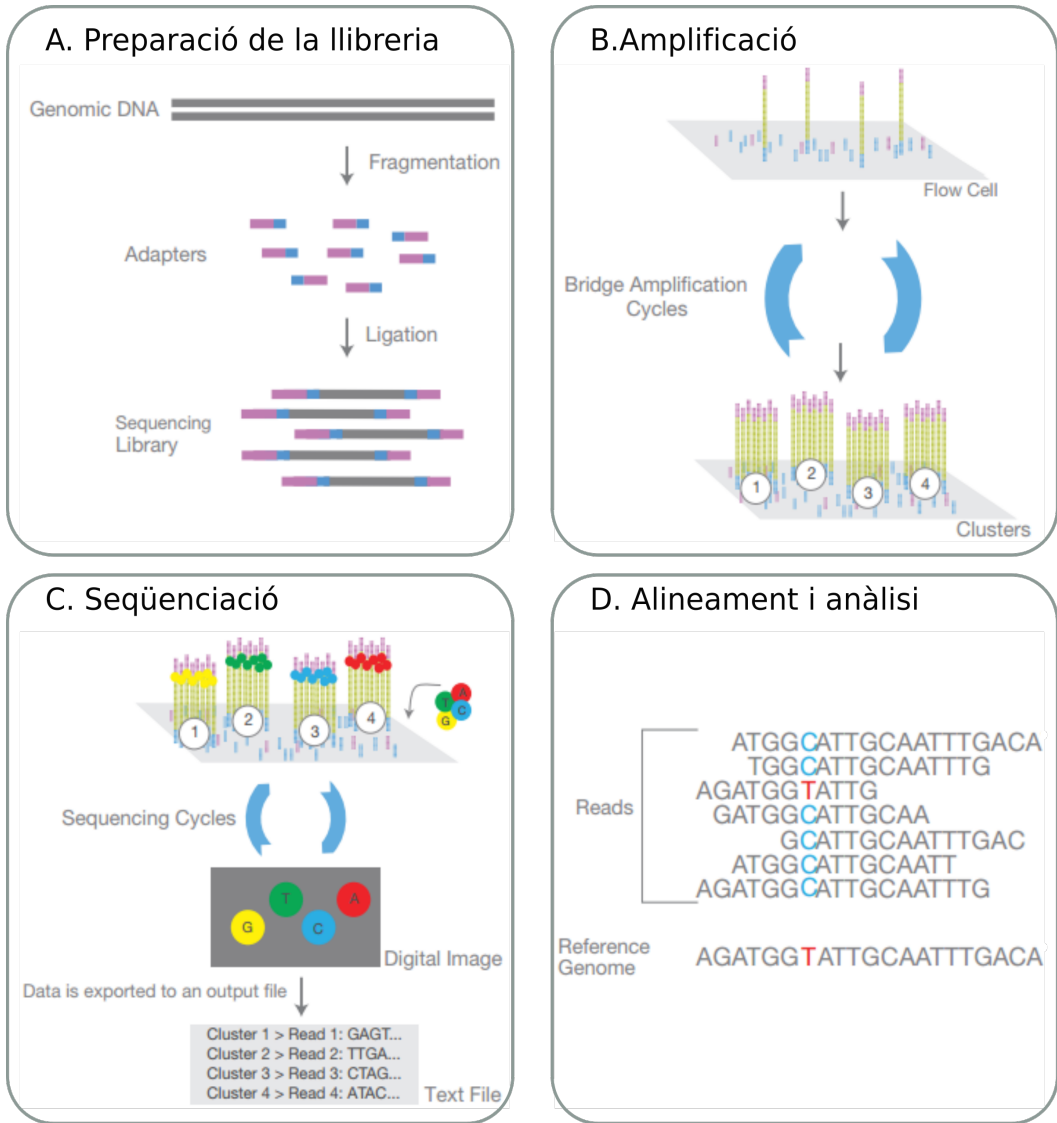


Figura 9. Procés de seqüenciació NGS. El ADN genòmic és fragmentat i lligat a uns adaptadors pels dos extrems. Aquests s'uneixen per hibridació amb uns primers complementaris a una superfície transparent.. Cada fragment unit es amplifica formant grups separats. Tot seguit es procedeix a la seqüenciació on es van incorporant nucleòtids marcats amb diferents fluorocroms que són detectats. Finalment, un cop tenim les dades cal analitzar-les, mapant i alineant les seqüències contra el genoma de referència per poder identificar els canvis propis de l'individu. Figura adaptada de Illumina.

allunyats de la resta), polític (comunitats petites amb poca immigració o poca relació entre persones de diferent origen) o fins i tot religions, en què s'afavoreixen els aparellaments entre membres d'una mateixa comunitat (Broman and Weber 1999; McQuillan et al. 2008).

Aquesta aproximació s'ha utilitzat amb èxit en poblacions com l'holandesa, en famílies sense consanguinitat aparent (Collin et al. 2011), però també en poblacions on els aparellaments entre membres de la mateixa família són freqüents, com la pakistanesa i la índia (Saqib et al. 2015; Srilekha et al. 2015).

Tant per a l'anàlisi de cosegregació com per al mapatge per homozigositat s'utilitzen marcadors genètics comuns. Es tracta de seqüències polimòrfiques (variables) distribuïdes idealment per tot el genoma. Les més utilitzades actualment són els SNPs (de l'anglès *Single Nucleotide Polymorphism*), variants polimòrfiques d'un sol nucleòtid, i els microsatèl·lits, petites repeticions en tàndem d'un nombre petit de nucleòtids. Els primers són molt abundants al genoma, i per tant asseguren una bona cobertura de totes les regions cromosòmiques, mentre que els microsatèl·lits, tot i ser molt més informatius per l'elevat nombre d'al·lels diferents que poden arribar a tenir (número de repeticions) no són tan comuns, i per tant no sempre n'hi ha prop del lloc d'interès (Barh, Zambare, and Azevedo 2013; Cheng and Zhang 2010). D'altra banda, la genotipació dels microsatèl·lits no és tan fàcilment automatitzable com la dels SNPs. Per aquests motius actualment s'acostuma a utilitzar la genotipació de SNPs en els estudis de cosegregació. Aquesta es duu a terme mitjançant plataformes d'hibridació de *microarrays* a gran escala, on es poden arribar a genotipar al voltant de 2,5 milions de SNPs a la vegada, una variant cada 1,3 Kb (<https://www.illumina.com/>).

Donada la complexitat de les DR és força habitual combinar estratègies de diagnòstic directe i indirecte quan es fa diagnòstic genètic, sobretot en la cerca de nous gens causants de DR. En molts casos es comença per una tècnica de diagnòstic indirecte i, segons el resultat, se segueix amb algun mètode de seqüenciació directa. Si la regió de cosegregació apunta clarament a un gen conegut, s'acostuma a seqüenciar aquest gen directament (Dvir et al. 2010; Weil 2003). Però si l'anàlisi indirecta no apunta a un candidat clar, se sol continuar amb tècniques de NGS que permetin analitzar alhora totes les variants de les regions acotades prèviament per lligament genètic o per homozigositat. D'aquesta manera es rebaixa el nivell de complexitat que suposa discernir quina de totes les variants genètiques identificades en un individu és la patogènica

(Nikopoulos et al. 2010; Sullivan et al. 2014).

El grup va desenvolupar durant l'any 2007 un xip per facilitar el diagnòstic de la RP i la LCA basat en l'estratègia de l'anàlisi de lligament. Es tracta d'un *microarray* que inicialment permetia analitzar la cosegregació en famílies de 22 gens descrits com a responsables d'arRP i/o arLCA (Pomares et al. 2007). L'any 2010 es van incloure 18 gens més responsables d'aquests trastorns amb herència dominant (Pomares et al. 2010). Aquest xip permet, d'una manera molt senzilla i ràpida, analitzar si un gen en concret cosegrega amb la malaltia en una família, de manera que permet descartar els gens que segur que no contenen la mutació patogènica i seleccionar els candidats a ser seqüenciats. En el marc d'aquesta Tesi s'han analitzat 4 famílies dominants i 61 famílies recessives amb el xip, tot identificant la causa molecular en quatre d'elles i descartant tots els gens inclosos en el xip en nou casos, en què probablement la causa genètica es troba en un gen no identificat fins ara.

4. Estudis funcionals i de patogenicitat

En un moment en què és possible generar una gran quantitat de dades genètiques en poc temps i a un cost cada cop més baix, és necessari interpretar correctament l'impacte funcional de les variants rares identificades en els pacients. Aquestes variants de baixa freqüència no es consideren polimorfismes ja que no superen freqüències de l'1% a la població. D'altra banda, establir la funció i el paper dels nous gens associats a les DR resulta fonamental tant per verificar la seva implicació en la malaltia com per ajudar a entendre el funcionament d'un teixit tan complicat com la retina. Per això, cal realitzar diferents assajos que permetin corroborar la relació entre les mutacions identificades, tant en gens coneguts com no, amb la patologia que presenta l'individu.

És important considerar la diferència conceptual que hi ha entre una variant responsable d'una malaltia i una variant que té un efecte nociu sobre la proteïna però que no té perquè ser necessàriament patogènica en aquest individu. Per això, cal tenir en compte altres dades genètiques com són la presència d'altres mutacions en altres gens, la concordança amb el patró d'herència, la cosegregació de la variant amb la patologia a la família i la freqüència de la variant a la població control.

4.1. Anàlisis *in silico*

D'entrada, quan s'identifica una variant genètica en un individu, cal comprovar si aquesta ha estat descrita prèviament com a mutació en algun altre pacient amb la mateixa patologia o amb una patologia similar. Per això hi ha bases de dades, com la *Human Gene Mutation Database* (HGMD, www.hgmd.org) que recull totes les variants patogèniques publicades; o la *Leiden Open Variation Database* (LOVD, (Fokkema et al. 2011) que a més permet consultar la freqüència amb què s'ha identificat la mutació en pacients.

En el cas dels canvis no descrits prèviament com a mutacions, cal fer una avaluació de la seva possible patogenicitat. Les variants de pèrdua de sentit o de truncament prematur són generalment assumides com a patogèniques ja que sovint condueixen a la degradació del transcrit dirigida per la cèl·lula, i per tant a l'absència de proteïna, o bé deixen fora del producte final dominis importants per a la seva funció. Però en el cas de mutacions de canvi de sentit o que alteren llocs de *splicing*, calen eines per tal de predir l'impacte del canvi sobre la proteïna.

Hi ha una gran varietat d'eines bioinformàtiques que permeten avaluar la patogenicitat d'una variant genètica. Es poden dividir en dues categories segons si prediuen canvis en l'estructura o funció de la proteïna o si analitzen el possible efecte en el *splicing* del gen.

L'impacte d'una variant de canvi de sentit es pot avaluar seguint diferents criteris: la conservació evolutiva del residu aminoacídic, la seva localització en els dominis de la proteïna i les conseqüències bioquímiques del canvi d'aminoàcid. Els algoritmes més utilitzats són *PolyPhen2* (Adzhubei et al. 2010), *SIFT* (Kumar, Henikoff, and Ng 2009) i *Mutation Taster* (Schwarz et al. 2010). En general, els programes són força sensibles en les seves prediccions, donant resultats correctes entre un 65 i un 80% dels cops per a les variants de canvi de sentit ja descrites, però en canvi tenen una especificitat baixa, de manera que tendeixen a predir en excés canvis com a deleteris (Richards et al. 2015). De la mateixa manera també hi ha molts programes que permeten analitzar variants de *splicing*, tant exòniques com intròniques. Aquests tenen una sensibilitat molt elevada, 90-100%, però no tanta especificitat, 60-80%. Els més comuns són *NetGene2* (Hebsgaard et al. 1996) i *Human Splicing Finder* (Desmet et al. 2009). En tots els casos també es pot tenir en compte la conservació nucleotídica, calculada per *GERP* (Cooper et al. 2005) o *PhastCons* (Siepel et al. 2005)(Siepel et al. 2005).

4.2. Anàlisis *in vitro*

Els estudis en cultius cel·lulars estan molt estesos en el camp de les distròfies de retina. Donada la pràctica impossibilitat d'obtenir aquest teixit dels pacients, cal utilitzar altres aproximacions a l'hora d'estudiar mutacions i gens nous. Entre els mètodes utilitzats hi ha la transfecció de cèl·lules en cultiu amb construccions gèniques portadores de la mutació o bé l'estudi de mutacions a partir de cèl·lules del propi pacient. En el cas de les línies cel·lulars, s'utilitzen cèl·lules de transfecció fàcil, com ara les HEK293 (cèl·lules humanes embrionàries de ronyó) (Thomas and Smart 2005) o cèl·lules derivades de retina com ara les ARPE-19 i les hTERT-RPE1 (cèl·lules humanes derivades de l'RPE) (Dunn et al. 1996; Gong et al. 2014) que s'acosten més a les condicions reals. En el cas de les cèl·lules del pacient, que solen ser limfòcits sanguinis o fibroblasts de pell, pot passar que el gen d'interès no s'hi expressi, i en aquest cas es pot recórrer a la generació de cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPS) i rediferenciar-les al tipus cel·lular d'interès. Aquest procés, però, és encara molt llarg i laboriós. En tots els casos cal comparar el fenotip cel·lular que dona el gen mutat amb l'obtingut amb el gen salvatge.

Una de les aplicacions més comunes és en l'estudi de mutacions que afecten el mecanisme de *splicing*, ja que podem analitzar l'efecte real que tenen els canvis sobre el mRNA codificat pel gen alterat i comprovar si es produeix alguna alteració en l'estructura/seqüència del transcrit. Si partim de teixit del pacient, és imprescindible que el gen s'hi expressi, o optar per metodologies com la de les iPS. Si utilitzem cèl·lules en cultiu que no provenen del pacient es pot fer l'anàlisi del *splicing* mitjançant la transfecció de “mini-gens”. Els “mini-gens” són construccions plasmídiques en què s'inclou un cert nombre d'exons del gen d'interès i les regions intròniques flanquejants (~200 pb). En ser transfectats dins la cèl·lula (en la seva versió normal i mutant), són transcrits i es pot analitzar si hi ha diferències en el *splicing* d'un i altre (Pomares et al. 2009).

Una altra metodologia experimental permet estudiar variants genètiques localitzades en promotors o en factors de transcripció. Per això es clona la regió 5' d'un gen en un vector que expressi un gen reporter (p. ex. la luciferasa, una proteïna que emet llum, activitat fàcilment mesurable). En transfectar la construcció en cèl·lules eucariotes, sola o amb construccions que codifiquen diferents factors de transcripció, es poden avaluar, entre altres coses, la regió mínima necessària perquè un gen s'expressi, l'efecte de diferents factors de transcripció sobre l'expressió del gen i els canvis que diferents variants en la

seqüència promotora o en un factor provoquen sobre la transcripció, ja que es tracta d'un assaig quantificable.

Per valorar la relació entre un nou gen i les DR també es poden dur a terme assajos *in vitro*, com ara l'estudi de la localització subcel·lular de la proteïna mitjançant immunohistoquímica o el silenciament del gen mitjançant siRNA o Gapmers per analitzar el fenotip cel·lular. De la mateixa manera, es pot intentar recuperar després el canvi fenotípic tot introduint el gen clonat amb la seqüència salvatge (Lee et al. 2012).

4.3. Anàlisi *in vivo*

Les DR no només afecten l'home, sinó que es donen també en animals. Hi ha models animals, tant naturals com transgènics, per un gran nombre dels gens causant de DR. Aquests models constitueixen una eina molt valuosa tant per a l'estudi dels mecanismes fisiopatològics de la malaltia com per al desenvolupament de teràpies. Actualment, els models més utilitzats són els murins i els de peix zebra, tot i que n'hi ha també en mico, rata, gos, gat, porc, ovella i gall (Slijkerman et al. 2015).

Els ratolins es van escollir perquè presenten una sèrie d'avantatges respecte d'altres mamífers: el seu temps generacional és molt curt, són molt prolífics i s'adapten fàcilment a la vida als estabularis, fet que permet controlar les variabilitats ambientals durant l'experimentació. El seu genoma està molt ben establert i presenta més d'un 90% d'homologia amb l'humà. A més, hi ha sistemes molt eficients i estandarditzats de cultiu de cèl·lules embrionàries pluripotents fàcilment manipulables a nivell genètic per a la generació de transgènics (Rivas and Vecino 2009). Actualment, el descobriment del mecanisme CRISPR/Cas9 està suposant una revolució en la generació de models animals, ja que permet editar el genoma d'una manera ràpida i senzilla. Introduint una molècula de ARN guia del gen a modificar, la cèl·lula altera el gen de manera autònoma. A més, la tècnica permet editar més d'un gen a la vegada (Doudna et al. 2014). Tot i així, hi ha certes diferències entre la retina humana i la del ratolí, de tal manera que en alguns casos, com amb els gens causants de ciliopaties, els models murins no mimetitzen el fenotip humà.

En els darrers anys, el desenvolupament de models *knockdown* en peix zebra ha tingut un creixement molt gran en l'estudi de les malalties de la visió. Els principals tipus cel·lulars i l'estructura de l'ull es troben altament conservats amb l'humà i, a més, la transparència de l'embrió i el seu ràpid desenvolupament

permeten l'observació a temps real de l'evolució de la patologia amb un microscopi i sense la necessitat de matar l'animal. La generació d'aquests models es pot fer per mutagènesi a l'atzar, tot exposant els mascles a etilnitrosourea, que indueix l'aparició de mutacions puntuals, o per la microinjecció en embrions d'una seqüència nucleotídica anti-sentit (morfolino) que silencia el gen d'interès (Lieschke and Currie 2007; Slijkerman et al. 2015). Acostumen a ser el model escollit per l'estudi de nous candidats associats a les DR. El *Wellcome Trust Sanger Institute* està duent a terme un projecte per generar un repositori de mutants de peix zebra (<http://www.sanger.ac.uk/resources/zebrafish/zmp/>) amb l'objectiu d'aconseguir un mutant per a cada gen codificant del seu genoma, tot facilitant també el fenotip associat a la variant. De moment s'han generat ja 36284 al·lels (Kettleborough et al. 2013).

Objectius

El treball d'aquesta tesi té com a objectiu principal aprofundir en la identificació de les causes genètiques i moleculars de les diferents distròfies de retina (DR), mitjançant la descripció de mutacions en gens ja coneguts com a responsables d'aquestes patologies i la identificació de nous gens causals. Les noves metodologies de seqüenciació massiva han revolucionat el diagnòstic genètic, especialment el de les malalties monogèniques que presenten heterogeneïtat al·lèlica i no al·lèlica, com és el cas de les DR. En aquest treball, per incrementar l'eficàcia diagnòstica, hem combinat aquestes metodologies de seqüenciació amb aproximacions de genètica convencional en famílies.

Al principi d'aquesta tesi la realitat del diagnòstic genètic de les DR era molt diferent de l'actual. Les tècniques de NGS acabaven d'aparèixer i tot just l'any 2010 s'havia descrit el primer cas de diagnòstic molecular d'una malaltia mendeliana per seqüenciació de l'exoma (Ng et al. 2010). No obstant, l'elevat cost d'aquesta metodologia i les dificultats existents llavors en l'anàlisi de dades massives complicaven la seva translació a la rutina diagnòstica. Aquest escenari determinava que el diagnòstic genètic es dugués a terme mitjançant la cerca directa de mutacions o per seqüenciació dels exons dels gens candidats més probables, tasca molt tediosa i també cara. Per tant, es feia palès que calia un mètode que prioritzés, en cada família, els gens DR ja coneguts que havien de ser seqüenciats i que alhora permetés identificar famílies candidates a presentar mutacions en nous gens. En aquest context ens vam marcar el primer objectiu:

1. Construcció i implementació d'un xip de cosegregació per al diagnòstic genètic de famílies afectades de DR.

- Selecció de 100 gens principals causants de les DR i dels marcadors de tipus SNP adients per a l'anàlisi de cosegregació.
- Estudi de 36 famílies afectades, principalment amb RP i CRD, mitjançant el xip de cosegregació i posterior seqüenciació Sanger dels gens candidats.

Amb els anys, les noves tècniques de seqüenciació massiva han canviat molt la perspectiva del diagnòstic genètic: el cost ha disminuït considerablement i s'ha avançat molt en les metodologies bioinformàtiques per a l'anàlisi de les dades. Per aquest motiu ens vam plantejar el segon objectiu de la tesi:

2. Incorporació dels mètodes de seqüenciació massiva al diagnòstic de les DR.

- Diagnòstic genètic d'un panell de famílies i casos aïllats de pacients afectats de DR.
- Identificació de nous gens associats a la RP i la CRD.
- Estudi funcional dels nous gens DR identificats.
- Diagnòstic genètic mitjançant WES de dues famílies amb diagnòstic clínic incert. Reavaluació del diagnòstic clínic.

Resultats

INFORME DELS DIRECTORS DE TESI SOBRE LES PUBLICACIONS PRESENTADES

Títol de la tesi: Metodologies d'alt rendiment per a la identificació de noves mutacions i gens causants de distròfies de retina hereditàries. Estudi funcional de nous candidats.

Autora: Marta de Castro Miró

Directors: Dra Roser González Duarte i Dr. Bru Cormand Rifà

Article 1

Marta de Castro-Miró, Esther Pomares, Laura Lorés-Motta, Raul Tonda, Joaquín Dopazo, Gemma Marfany and Roser González-Duarte. Combined Genetic and High-Throughput Strategies for Molecular Diagnosis of Inherited Retinal Dystrophies. PLoS One. 2014 Feb 7;9(2):e88410. doi: 10.1371/journal.pone.0088410. Erratum in: PLoSOne. 2014;9(6):e101641

Índex de qualitat: SCI2015 = 3,057. Quartil 1 de la categoria MULTIDISCIPLINARY SCIENCES

Aportació de l'autora a l'article:

Contribució al diagnòstic genètic de les famílies afectades de distròfies de retina (RD) mitjançant seqüenciació Sanger i anàlisi de cosegregació dels gens candidats prioritzats a partir de l'estudi amb el xip RD. Diagnòstic genètic per seqüenciació massiva de l'exoma (WES) de dues famílies addicionals. Col·laboració en la redacció del primer esborrany del manuscrit i persona responsable de la seva edició final.

Article 2

Marta de Castro-Miró, Raul Tonda, Paula Escudero-Ferruz, Rosa Andrés, Andrés Mayor-Lorenzo, Joaquín Castro, Marcela Ciccioi, Daniel A. Hidalgo, Juan José Rodríguez-Ezcurra, Jorge Farrando, Juan J. Pérez-Santonja, Bru Cormand, Gemma Marfany and Roser González-Duarte. Novel Candidate Genes and a Wide Spectrum of Structural and Point Mutations Responsible for Inherited

Retinal Dystrophies Revealed by Exome Sequencing. PLoSOne. 2016 Dec 22;11(12):e0168966. doi: 10.1371/journal.pone.0168966.

Índex de qualitat: SCI2015 = 3,057. Quartil 1 de la categoria MULTIDISCIPLINARY SCIENCES

Aportació de l'autora a l'article:

Contribució al diagnòstic genètic de 33 famílies espanyoles afectades de RD mitjançant seqüenciació massiva, anàlisi bioinformàtica per prioritzar les variants nucleotídiques identificades i validació dels canvis per seqüenciació Sanger i anàlisi de cosegregació. Contribució a l'estudi funcional d'alguns dels nous gens proposats com a responsables de la patologia. Col·laboració en la redacció del primer esborrany del manuscrit i persona responsable de la seva edició final.

Article 3

Marta de Castro-Miró, Raul Tonda, Gemma Marfany, Ricardo P. Casaroli-Marano and Roser González-Duarte. Novel mutations in the choroideremia gene and a complex severe phenotype due to additional mutations in ocular genes in two Spanish families. Manuscrit sotmès a publicació.

Aportació de l'autora a l'article:

Contribució al diagnòstic genètic de dues famílies espanyoles afectades de Retinosi Pigmentària (RP) amb diagnòstic clínic poc clar. Contribució a l'estudi de seqüenciació WES i anàlisi bioinformàtica per prioritzar les variants nucleotídiques identificades. Realització de les proves de validació de les variants candidates per seqüenciació Sanger i anàlisi de cosegregació. Contribució a l'estudi funcional d'alguns dels nous gens proposats com a responsables de la patologia. Col·laboració en la redacció del primer esborrany del manuscrit i persona responsable de la seva edició final.

Barcelona, 25 de maig de 2017

Signatura dels directors

Dra. Roser González Duarte

Dr. Bru Cormand Rifà

PUBLICACIÓ 1

Títol

«Combined genetic and high-throughput strategies for molecular diagnosis of inherited retinal dystrophies»

Resum

Les Distròfies de Retina (DR) són un conjunt de patologies degeneratives de la visió amb una gran heterogeneïtat clínica i genètica, heterogeneïtat que planteja reptes importants a l'hora de definir una estratègia diagnòstica viable i eficaç. Quan vam iniciar aquest treball es coneixien més de 100 gens associats a aquestes malalties, i la major part de les mutacions que s'havien descrit eren molt poc freqüents, moltes d'elles privades. En absència de pistes clíniques clares per prioritzar l'estudi dels gens candidats, i donada la impossibilitat d'analitzar per seqüenciació manual (Sanger) tots i cadascun dels exons d'un nombre tan elevat de gens, vam decidir ampliar els xips de diagnòstic genètic familiar de adRP i arRP dissenyats anteriorment per l'equip per analitzar un nou panell de famílies espanyoles afectades. Els criteris emprats per a la construcció del nou xip (xip DR) i els resultats diagnòstics obtinguts es presenten en el treball esmentat.

L'objectiu principal va ésser dissenyar un xip de diagnòstic que inclogués els 100 gens principals causants de les distròfies de retina no sindròmiques hereditàries, considerant els diferents patrons d'herència possibles (autosòmic dominant, autosòmic recessiu i lligat al sexe) i emprar aquest xip per fer un estudi de cosegregació de marcadors de tipus SNP en famílies afectades.

La primera part de l'estudi va consistir en una selecció curosa de marcadors moleculars (entre 7 i 10 marcadors de tipus SNP per cobrir cadascun dels 100 gens més prevalents) en base a 1) la seva localització física respecte el gen diana, en concret, en posicions flanquejants a 5' i 3' del gen i en la regió interna del mateix; 2) que presentessin un grau d'informativitat elevat i; 3) que pertanyessin a grups haplotípics diferents. La segona fase va consistir en l'estudi de l'herència d'aquests marcadors mitjançant la plataforma Golden Gate Array (Illumina) en 36 famílies afectades de diverses distròfies de retina (RP, LCA, CRD, CD) per identificar els gens que no cosegregaven amb la patologia i que per tant quedaven descartats com a causals. Si el nombre de gens no descartats era baix (< 10) i la

seva extensió era petita-mitjana, es duia a terme un estudi mutacional directe per seqüenciació Sanger. La tercera fase del treball va consistir en estudiar per WES dues famílies que no s'havien pogut diagnosticar amb el xip DR.

La utilització del xip DR en 36 famílies va permetre identificar la causa molecular de la patologia en 17 d'elles, amb 12 mutacions noves i 12 mutacions conegudes en 9 gens DR, essent *USH2A* i *CRB1* els gens causals majoritaris. Entre les qualitats més rellevants del xip cal destacar: la robustesa de la informació genètica que s'obté i per tant la fiabilitat dels candidats assenyalats, la possibilitat d'identificar haplotips associats amb una mutació concreta en individus no emparentats que indiquen la presència d'un efecte fundador i la d'ampliar la segregació dels haplotips als gens propers, reforçant la selecció dels candidats. En definitiva, l'eficàcia diagnòstica del xip DR és del 47%. Aquesta varia segons el patró d'herència de la família, essent molt efectiva en casos d'herència recessiva (80%) i no tant en casos dominants (16%), on són necessaris més individus per tenir prou informació genètica. Aquest percentatge està en línia amb el rang d'èxit de la majoria d'estratègies diagnòstiques basades en la seqüenciació massiva disponibles en el moment en què es va realitzar el treball, tot certificant la validesa del xip DR en casos familiars i el seu ús en laboratoris mitjans-petits de diagnòstic rutinari.

Referència

Marta de Castro-Miró, Esther Pomares, Laura Lorés-Motta, Raul Tonda, Joaquin Dopazo, Gemma Marfany, and Roser González-Duarte. *Combined genetic and high-throughput strategies for molecular diagnosis of inherited retinal dystrophies*. PLoS One. 2014 Feb 7;9(2):e88410. Erratum in: PLoS One. 2014;9(6):e101641



Combined Genetic and High-Throughput Strategies for Molecular Diagnosis of Inherited Retinal Dystrophies

Marta de Castro-Miró^{1,2,3}, Esther Pomares^{1,2*}, Laura Lorés-Motta¹, Raul Tonda⁴, Joaquín Dopazo^{5,6}, Gemma Marfany^{1,2,3}, Roser González-Duarte^{1,2,3*}

1 Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain, **3** Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **4** Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica, PCB, Barcelona, Spain, **5** Department of Computational Genomics, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain, **6** BIER, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia, Spain

Abstract

Most diagnostic laboratories are confronted with the increasing demand for molecular diagnosis from patients and families and the ever-increasing genetic heterogeneity of visual disorders. Concerning Retinal Dystrophies (RD), almost 200 causative genes have been reported to date, and most families carry private mutations. We aimed to approach RD genetic diagnosis using all the available genetic information to prioritize candidates for mutational screening, and then restrict the number of cases to be analyzed by massive sequencing. We constructed and optimized a comprehensive cosegregation RD-chip based on SNP genotyping and haplotype analysis. The RD-chip allows to genotype 768 selected SNPs (closely linked to 100 RD causative genes) in a single cost-, time-effective step. Full diagnosis was attained in 17/36 Spanish pedigrees, yielding 12 new and 12 previously reported mutations in 9 RD genes. The most frequently mutated genes were *USH2A* and *CRB1*. Notably, *RD3*—up to now only associated to Leber Congenital Amaurosis— was identified as causative of Retinitis Pigmentosa. The main assets of the RD-chip are: i) the robustness of the genetic information that underscores the most probable candidates, ii) the invaluable clues in cases of shared haplotypes, which are indicative of a common founder effect, and iii) the detection of extended haplotypes over closely mapping genes, which substantiates cosegregation, although the assumptions in which the genetic analysis is based could exceptionally lead astray. The combination of the genetic approach with whole exome sequencing (WES) greatly increases the diagnosis efficiency, and revealed novel mutations in *USH2A* and *GUCY2D*. Overall, the RD-chip diagnosis efficiency ranges from 16% in dominant, to 80% in consanguineous recessive pedigrees, with an average of 47%, well within the upper range of massive sequencing approaches, highlighting the validity of this time- and cost-effective approach whilst high-throughput methodologies become amenable for routine diagnosis in medium sized labs.

Citation: de Castro-Miró M, Pomares E, Lorés-Motta L, Tonda R, Dopazo J, et al. (2014) Combined Genetic and High-Throughput Strategies for Molecular Diagnosis of Inherited Retinal Dystrophies. PLoS ONE 9(2): e88410. doi:10.1371/journal.pone.0088410

Editor: Hector Escriva, Laboratoire Arago, France

Received: November 28, 2013; **Accepted:** January 6, 2014; **Published:** February 7, 2014

Copyright: © 2014 de Castro-Miró et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: MdCM was a recipient of a FPI fellowship from the Spanish MICINN. This study was supported by grants SAF2009-08079 (RGD), BFU2010-15656 (GM), and BIO2011-27069 (JD) (Ministerio de Ciencia e Innovación), SGR2009-1427 (RGD)(Generalitat de Catalunya), CIBERER (U718 and U715), Retina Asturias (RGD) and ONCE (RGD). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: No competing interests to be declared.

* E-mail: rgonzalez@ub.edu

‡ Current address: Instituto de Microcirugía Ocular, Barcelona, Spain

Introduction

Retinal dystrophies (RD) are a group of more than 25 genetic visual disorders [1]. Although RDs rank among mendelian rare diseases, taken together, they occur at an estimated prevalence of 1–2 patients per 1000 individuals. In fact, the most frequent form of RD, retinitis pigmentosa (RP), affects 1.5 million individuals worldwide [2]. The clinical traits underlying these disorders disturb from the macular region (central vision) to the outlying retinal area (peripheral vision). In addition, at least 30 different syndromes (such as Usher and Bardet-Biedl) share some of these phenotypic alterations [3,4]. On the genetic side, more than 5000 mutations in almost 200 genes are causative of retinal dystrophies so far [1,5,6]. Yet, around 35% of the cases remain unassigned [7]. The extreme heterogeneity of RDs at the clinical and genetic levels hinders the accurate clinical assessment, patient management, and genetic counseling. Within this context, molecular diagnosis,

however challenging, is instrumental to improve the diagnosis and prognosis of RDs and guide future therapies [7–9].

Currently, the most demanding issue in RD molecular diagnosis is the prioritization of methodological strategies, where the main parameters to be balanced are cost, time and yield. These parameters strongly depend on phenotypic clinical assessment, pedigree information, sample availability and methodological resources. Most genetic laboratories resort to direct mutational screening when the clinical traits and/or the genetic information associated to the disease limit the number of candidates to be analyzed. Unfortunately, this is not a common case for RDs, and this type of analysis would imply screening more than 1500 exons. The search for an alternative cost-effective approach is mainly being performed using high-throughput platforms, in particular massive sequencing, which require powerful and sophisticated bioinformatics tools for analyzing and filtering the data [10,11].

To improve diagnosis, we have focused on a comprehensive strategy based on the clinical phenotype and all available genetic data prior to either analyze a reduced manageable number of candidate genes or resort to massive sequencing. We have generated and optimized a SNP-based chip for haplotype cosegregation analysis [12,13] to genotype 7–10 SNP markers of one hundred genes associated to the most prevalent RDs: Cone Dystrophies (CD), Cone-Rod Dystrophies (CRD), Congenital Stationary Night Blindness (CSNB), Leber Congenital Amaurosis (LCA), Macular Degeneration (MD) and RP. Based on this methodology, a multi-tiered approach has been devised to cost-effectively diagnose [14] a panel of 36 Spanish families with non-syndromic retinal dystrophies plus 5 patients with Usher's syndrome. As a result, we have identified the pathogenic mutation of 17 out of the 36 families, and 3 of the 5 isolated Usher patients, overall reporting 14 novel mutations. After the RD-chip analysis discarded all known RD genes, Whole Exome Sequencing (WES) was undertaken in two pedigrees. The pathogenic mutations were unexpectedly identified in two RD candidates, which had been previously discarded as non-cosegregating on the basis of homozygosity by descent in consanguineous families, and infrequent recombination of closely mapping SNPs.

Methods

Patients

Thirty-six Spanish families diagnosed with RP, LCA, CRD or CD plus 5 isolated Usher's syndrome patients were recruited for this study. Written informed consent from the patients and relatives was obtained following the tenets of the Declaration of Helsinki. Patient recruitment and sample collection procedures had been previously approved by the Bioethics Committee of the University of Barcelona (Barcelona, Spain). Peripheral blood DNA was obtained using the MoleStrips DNA Blood kit with the GeneMole instrument (Mole Genetics, Mole, Lysaker, Norway). DNA from Spanish control individuals was obtained from peripheral blood using the same methodology.

SNP Selection

The RD chip for the molecular diagnosis of Mendelian non-syndromic retinal dystrophies was an optimized version of a previous cosegregation chip for RP-LCA disorders [12,13]. Seven to ten SNPs were selected for each candidate (100 genes in total), and genotyped on a customized Golden Gate Genotyping Assay (Illumina). The SNPs were selected following: i) high informativity according to SNPbrowser Software Version 4.0.1 and dbSNP database (www.nlm.nih.gov/projects/SNP/); ii) physical location (covering upstream, intragenic and downstream regions); iii) inclusion in different haplotypic blocks. The genes analyzed by this RD chip are listed by chromosome position in Figure 1. In addition, some common mutations in *ABCA4*, *CERKL*, *COL8A2*, *CRB1*, *LRP5*, *NR2E3*, *PRPF31*, *RHO* and *USH2A*, were included for direct genotyping.

High-throughput SNP Genotyping

One microgram of sample DNA (at 20 ng/ μ l) was laid in 96-well plates. SNPs were genotyped using the Golden Gate Array (Illumina) platform following the instructions, protocol and software provided by the manufacturers. Haplotype and cosegregation analyzes were performed by hand from the raw data genotypes.

Mutational Screening

In Usher syndrome samples, where a major causative gene is involved, the Arrayed Primer Extension (APEX) approach plus direct gene sequencing was the molecular diagnosis procedure of selection. In all other cases, cosegregation analysis with the RD-chip allowed to highlight the best candidates for mutational screening. All the exons and exon–intron boundaries of selected genes were directly screened for mutations in each patient. Genomic DNA was amplified, purified on High Pure 96 UF Cleaning Plates (Roche) and sequenced using the BigDye v3.1 kit (Applied Biosystems, Inc.) in the ABI PRISM 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems, Inc.).

All missense changes identified were verified in control population using the dbSNP database (Build 137, www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/), the 1000 Genomes Project data (<http://browser.1000genomes.org/index.html>), and ESP6500 data of the National Heart, Lung, and Blood Institute GO Exome Sequencing Project (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>). To validate unreported missense genetic variants, over one hundred matched controls were analyzed to discard rare non-pathogenic polymorphisms restricted to the Spanish population.

Bioinformatic Analyses

All the sequences were analyzed using the sequence assembly software Seqman (DNASTar, Madison, WI) and aligned to the reference gene sequence (Genome Reference Consortium human genome build 37, human genome 19).

The pathogenicity of all new missense changes identified in patients was evaluated using the *in silico* predictors SIFT ([http://sift.jcvi.org/\[15\]](http://sift.jcvi.org/[15])) and PolyPhen-2 ([http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/\[16\]](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/[16])). When the putative mutations affected splice sites, the splicing site score values of the wild-type and variant sequences were predicted online with NetGene2 ([http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/\[17,18\]](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/[17,18])), Human Splicing Finder [19], and MaxEntScan ([http://www.umd.be/HSF/\[20\]](http://www.umd.be/HSF/[20])) prediction servers.

Whole-Exome Sequencing

Genomic DNA from peripheral blood was prepared using the QIAamp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen). Exome capture was performed at the CNAG using SureSelectXT All Exome v4 kit (Agilent), following the manufacturer's protocol. Libraries were sequenced on a HiSeq2000 (Illumina) to at least 80x average coverage of the target region.

Reads were aligned to the human reference genome build GRCh37 (hg19) using the Burrows-Wheeler Aligner (BWA) [21] in family E5 and GEMMapper [22] in family 9RE. Mapped reads were filtered (leaving only those mapping in unique genomic positions with enough quality), sorted and indexed with SAMtools (version 0.1.18) [23]. Identification of single nucleotide variants and Indels was performed using GATK standard hard filtering parameters [24] (family E5) or SupEff [25] (family 9RE). In house Perl scripts were used to select the variants shared by all affected individuals, predicted to produce a high or moderate impact, including intron-exon junctions, non-annotated variants (synonymous, non-synonymous, and non-sense mutations) in coding regions, or short coding insertions or deletions. Variants mapping to the candidate genes were selected for further validation. For the final WES report the VARIANT [26] annotation tool provided the putative functional consequence, as well as other additional relevant information of the identified variants for the final candidate gene selection.

Chr	Gene	Covered region (hg18)	CD,CRD	CSNB	LCA	MD	RP	OR
1	RPE65	68.415.679 - 68.909.560						
1	ABCA4	94.222.719 - 94.431.982						
1	GNAT2	109.942.500 - 109.972.419						
1	PRPF3	148.532.328 - 148.602.797						
1	SEMA4A	154.387.714 - 154.467.069						
1	HMCN1	183.966.670 - 184.434.556						
1	CFH	194.842.225 - 195.059.087						
1	CRB1	195.301.449 - 195.833.465						
1	RD3	209.633.383 - 209.770.830						
1	USH2A	214.242.873 - 214.830.563						
2	ZNF513	27.438.170 - 27.466.535						
2	C2ORF71	29.134.249 - 29.152.859						
2	EFEFMP1	55.941.781 - 56.012.150						
2	FAM161A	61.891.702 - 61.954.848						
2	SNRNP200	96.288.996 - 96.343.840						
2	CNNM4	96.787.353 - 96.904.965						
2	CNGA3	98.333.140 - 98.430.085						
2	MERTK	112.365.943 - 112.712.281						
2	CERKL	181.860.076 - 182.241.456						
2	SAG	233.846.587 - 234.011.399						
3	GNAT1	50.198.597 - 50.223.811						
3	IMPG2	102.398.652 - 102.537.708						
3	RHO	130.533.633 - 131.033.267						
3	OPA1	194.782.019 - 194.905.089						
4	PDE6B	424.079 - 805.055						
4	PROM1	15.577.672 - 15.692.948						
4	CNGA1	47.374.685 - 47.884.898						
4	LRAT	155.873.871 - 155.924.594						
4	CYP4V2	187.346.860 - 187.385.127						
5	VCAN	82.798.333 - 82.914.835						
5	PDE6A	149.218.109 - 149.427.821						
5	GRM6	178.328.456 - 178.362.981						
6	TULP1	35.530.732 - 35.816.612						
6	GUCA1A	42.206.073 - 42.267.535						
6	GUCA1B	42.256.658 - 42.305.894						
6	PRPH2	42.752.601 - 42.861.382						
6	EYS	66.096.322 - 66.352.493						
6	RIMS1	72.646.723 - 73.168.175						
6	LCA5	80.233.216 - 80.336.597						
6	ELOVL4	80.667.558 - 80.731.013						
7	KLHL7	23.106.624 - 23.186.975						
7	RP9	33.082.770 - 33.139.684						
7	TSPAN12	120.213.054 - 120.299.196						
7	IMPDH1	127.760.369 - 127.876.209						
7	OPN1SW	128.195.549 - 128.208.371						
8	RP1L1	10.496.410 - 10.552.688						
8	ADAM9	38.923.050 - 39.165.544						
8	RP1	55.674.229 - 55.756.140						
8	CNGB3	87.627.399 - 87.838.015						
9	KCNV2	2.700.537 - 2.725.415						
9	TOPORS	32.516.233 - 32.563.602						
10	RBP3	47.988.279 - 48.043.081						
10	CDHR1	85.908.918 - 85.968.919						
10	RGR	85.950.129 - 86.124.939						
10	RBP4	95.328.584 - 95.370.959						
10	PDE6C	95.358.506 - 95.419.747						
10	OAT	126.064.223 - 126.142.968						
11	TEAD1	12.738.235 - 12.929.811						
11	BEST1	61.447.283 - 61.502.867						
11	ROM1	62.123.562 - 62.216.570						
11	CABP4	66.962.038 - 66.991.927						
11	LRP5	67.830.957 - 68.014.437						
11	TMEM126A	84.988.923 - 85.072.109						
11	FZD4	86.322.657 - 86.357.222						
11	C1QTNF5	118.690.557 - 118.722.665						
11	MFRP	118.708.715 - 118.723.922						
12	CACNA2D4	1.769.975 - 1.904.551						
12	RDH5	54.375.476 - 54.469.113						
12	CEP290	86.934.473 - 87.125.195						
13	RB1	47.737.742 - 47.957.578						
13	GRK1	113.350.294 - 113.485.357						
14	RPGRIP1	20.661.565 - 21.063.338						
14	NRL	23.455.999 - 23.661.732						
14	OTX2	56.319.531 - 56.367.417						
14	RDH12	67.136.312 - 67.431.984						
14	SPATA7	87.896.594 - 88.016.375						
14	TTC8	88.356.598 - 88.415.263						
15	TRPM1	29.077.739 - 29.185.374						
15	NR2E3	69.524.477 - 70.353.669						
15	RLBP1	87.482.020 - 87.674.801						
16	CNGB1	56.311.769 - 56.576.754						
16	CDH3	67.227.572 - 67.303.342						
17	PRPF8	1.457.008 - 1.568.927						
17	AIPL1	6.252.280 - 6.303.111						
17	PITPNM3	6.295.689 - 6.402.825						
17	GUCY2D	7.580.474 - 7.956.738						
17	UNC119	23.885.279 - 23.923.629						
17	CA4	55.371.053 - 55.937.320						
17	RGS9	60.578.935 - 60.674.048						
17	PRCD	72.030.753 - 72.132.418						
17	FSCN2	77.057.292 - 77.185.156						
17	PDE6G	77.207.216 - 77.291.775						
19	RAX2	3.706.266 - 3.734.070						
19	RGS9BP	37.839.497 - 37.891.623						
19	CRX	52.942.132 - 53.261.521						
19	PRPF31	59.245.509 - 59.338.102						
20	IDH3B	2.569.998 - 2.604.328						
22	TIMP3	31.521.373 - 31.589.104						
X	RPGR	37.992.315 - 38.101.193						
X	RP2	46.549.608 - 46.671.740						

Figure 1. Genes included in the RD-chip. The RD-chip contains the most relevant RD genes at the time of the array design (100 genes). Genes are listed by chromosome and physical location. The interval between the first and last genotyped SNP is shown as "Covered region" (the chromosome position is based on human reference sequence NCBI 36/hg18). Colored boxes indicate association with particular retinal dystrophies. CD/CRD: Cone or Cone-Rod Dystrophy; CSNB: Congenital Stationary Night Blindness; LCA: Leber Congenital Amaurosis; MD: Macular Degeneration; RP: Retinitis Pigmentosa; OR: Other Retinopathies. doi:10.1371/journal.pone.0088410.g001

RT-PCR Expression Analysis

Blood samples from patients, relatives and unrelated controls were mixed with an RNA stabilizer solution (RNALater; Ambion) in a 1:4 ratio. Total RNA was obtained from 3 ml of blood using the RiboPure-Blood Kit (Ambion, Austin, TX), and retrotranscribed using the Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) with a mixture of random hexamers and oligo(dT)18, according to the manufacturer's instructions. *RPGRIPI* and *G3PDH* (used as control) transcripts were amplified using specific exon primers and the GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega, Fitchburg, WI) in a final volume of 50 μ l. The *G3PDH* PCR conditions were: denaturation for 5 min at 94°C followed by 35 cycles of 20 s at 94°C, 30 s at 60°C, and 1 min at 72°C, using 2 μ l of cDNA. For *RPGRIPI*, primers were located in exons 14 and 16, and the PCR conditions were: denaturation for 5 min at 94°C followed by 38 cycles of 20 s at 94°C, 30 s at 60°C and 40 s at 72°C, using 5 μ l of cDNA. Amplified bands were excised, purified from the gel using the Expin GeneAll Gel SV kit (GeneAll) following the manufacturer's protocol, and sequenced.

Plasmid Constructions and Expression Assay

The reconstructed *RPGRIPI* minigene encompassed exons 12 to 18, plus at least 200 bp of each intron-exon boundary, after amplification of genomic DNA from patient 1 of the 59RE pedigree (heterozygote for the c.2367+23del mutation). The minigene was cloned in-frame at the C-terminus of the HA epitope into the pcDNA3.1 expression vector. Wild-type and mutated clones were confirmed by sequencing.

HEK293 cells were seeded on 12-well plates (4×10^5 cells/well) and grown in DMEM (Invitrogen, Barcelona, Spain) supplemented with 10% of fetal bovine serum. After 12 hours, cells were transiently transfected with, either the pcDNA3.1-wild type (wt) *RPGRIPI* minigene, the pcDNA3.1-mut *RPGRIPI* minigene (containing the c.2367+23del mutation), or the empty vector (Clontech-BD), using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Forty-eight hours after transfection, cells were collected, lysed, and total mRNA was used for RT-PCR (same protocol as above). *RPGRIPI* cDNA amplification was performed using primers of exons 15 and 18 as follows: denaturation for 5 min at 94°C, followed by 35 cycles of 20 s at 94°C, 30 s at 62°C, and 1 min 30 s at 72°C, using 1 μ l of cDNA. *G3PDH* amplification was used as a control.

Results

Classification of the Patients According to Phenotype and Family Information

Our initial cohort comprised 41 families, 36 affected with non-syndromic RDs and 5 affected by Usher syndrome type II. We attained full diagnosis for 22 of them, whose pedigrees are displayed in Figure 2. Cosegregation with the novel mutated alleles identified is shown in Figure S1.

Analysis of Usher Syndrome Cases

Usher syndrome is characterized by specific phenotypic traits that allow a clear clinical characterization in three main forms, being USH II the most frequent type (between half and two thirds of all cases), and *USH2A* the major causative gene (75–80% of USH II cases) [27]. Our cohort had 5 USH II cases as isolated patients or small pedigrees, which when directly tested for described mutations in *USH2A* (Asper Biotech), only 4 out of 10 mutated alleles were identified, all in heterozygosis. As no complete molecular diagnosis was achieved, direct mutational screening of all *USH2A* exons was then undertaken, prioritizing

the analysis of exons where reported mutations cluster. Overall, three of the five patients (pedigrees shown in Figure 2) were completely diagnosed, with 3 missense mutations identified: c.1751G>T in heterozygosis (p.C584F), c.10636G>A in homozygosis (p.G3546R), and c.12574C>T in heterozygosis (p.R4192C) (Table 1 A). The pathogenicity of the two novel variants, p.C584F and p.R4192C, was supported by the PolyPhen and SIFT algorithms (Table 2). In the remaining two patients only one mutated allele was identified (Table 1 A).

Genotyping of RD Families

Contrary to Usher syndrome, most RDs show high clinical and genetic heterogeneity, which greatly hampers molecular diagnosis. Our approach was to use genetic information and cosegregation analysis to decrease the number of candidate genes for mutational screening. When pedigrees were available, the use of an automated and robust SNP-based genotyping microarray greatly diminished the number of candidates. To this aim, 36 families (with at least four available samples) affected with retinal dystrophies (Retinitis Pigmentosa, Leber Congenital Amaurosis, Cone-rod Dystrophy or Cone Dystrophy) were analyzed with our optimized in house RD-chip that genotyped 768 SNP markers spanning the 100 most prevalent RD genes reported at that moment (Figure 1). Six families showed autosomal dominant inheritance and a large number of affected individuals; twenty-nine were autosomal recessive pedigrees with a low number of affected members, and the remaining two were compatible with X-linked inheritance.

After RD-chip genotyping, haplotypes were constructed for each family to assess cosegregation under the presumed inheritance pattern. In pedigrees where 90 to 99% of candidates were discarded, direct mutational screening was performed in the remaining non-excluded genes. For each case, the candidates were prioritized according to previous gene assignment to: 1) the same clinical diagnosis and mendelian pattern; 2) a closely related retinal dystrophy with the same inheritance pattern; 3) the same clinical phenotype irrespective of the inheritance pattern, and finally 4) the remaining RD candidates.

This approach allowed us to identify the pathogenic mutation in 17 families out of 36 (47.2%), depicted in Figure 2: 2/2 in X-linked families, 6/18 of recessive non-consanguineous families (33.3%), 8/10 recessive consanguineous families (80%) and 1/6 of dominant families (16.6%).

Inferred Haplotypes and Subsequent Mutation Screening of the Prioritized Candidates in X-linked and Dominant Pedigrees

The genotyping results for each family were first analyzed under the most probable mendelian pattern of inheritance to exclude non-cosegregating genes and prioritize the remaining candidates. The final results are presented by family and summarized in Table 1 B.

Seven pedigrees were compatible with an autosomal dominant (ad) pattern, but one (11NCE) could also be explained by an X-linked inheritance, as all affected women showed a less severe phenotype. In this case, the haplotypes were first analyzed under a X-linked hypothesis (see below). Of the six AD families, only 2 (6ORG and 2NCE) were amenable for mutational screening, while in the rest more than 10 candidates remained. Indeed, in dominant diseases a large number of samples is required to attain genetic informativity, which seldom occurs. In family 6ORG, the RD-chip highlighted seven candidates, three of them responsible for adRP: *SEMA4A*, *SNRNP200* and *TOPORS*. We prioritized the

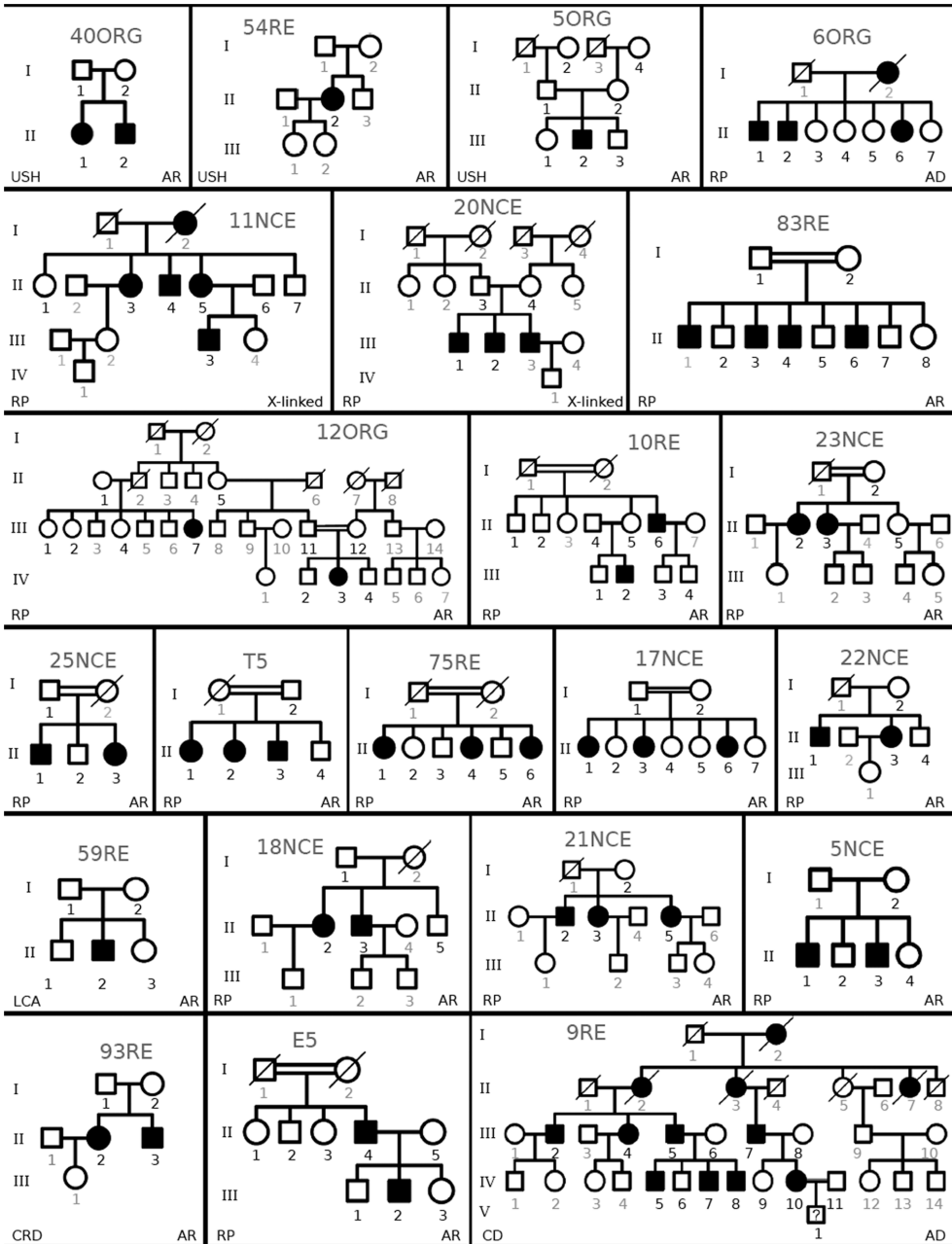


Figure 2. Spanish pedigrees diagnosed in this study. Families were categorized as arUSH II, arRP, adRP, XL-RP, arLCA, arCRD and adCD according to mendelian pattern of inheritance and phenotype. Bold numbers indicate samples available for analysis. doi:10.1371/journal.pone.0088410.g002

Table 1. Summary of the diagnosed families in this study.

Family	Phenotype	Inheritance	Gene	Nucleotide change	Protein change	Zygoty	References
A) USH II families							
40ORG	Usher II	recessive	<i>USH2A</i>	c.1751G>T	p.C584F	Het	[a]
				c.2299delG ^b	p.E767Sfs*20	Het	[50]
54RE	Usher II	recessive	<i>USH2A</i>	c.10636G>A	p.G3546R	Hom	[34]
50RG	Usher II	recessive	<i>USH2A</i>	c.9799T>C ^b	p.C3267R	Het	[33]
				c.12574C>T	p.R4192C	Het	[a]
56RE	Usher II	recessive	<i>USH2A</i>	c.2299delG ^b	p.E767Sfs*20	Het	[50]
				n.i	n.i		
94RE	Usher II	recessive	<i>USH2A</i>	c.2299delG ^b	p.E767Sfs*20	Het	[50]
				n.i	n.i		
B) Families analyzed by the RD-xip with identified mutations (sorted by gene).							
12ORG	RP	recessive	<i>CRB1</i>	c.1702C>T	p.H568Y	Hom	[a]
10RE	LCA	recessive	<i>CRB1</i>	c.3749+2_3749+3del	<i>splicing</i>	Homo/Het	[a]
				c.2843G>A	p.C948Y	Het	[30]
23NCE	RP	recessive	<i>CRB1</i>	c.2290C>T	p.R764C	Hom	[30]
25NCE	RP	recessive	<i>CRB1</i>	c.2843G>A	p.C948Y	Hom	[30]
T5	RP	recessive	<i>CRB1</i>	c.2843G>A	p.C948Y	Hom	[30]
17NCE	RP	recessive	<i>MERTK</i>	c.2189+1G>T	<i>splicing</i>	Hom	[31]
22NCE	RP	recessive	<i>PROM1</i>	c.1984-1G>T	<i>splicing</i>	Hom	[a]
83RE	RP	recessive	<i>RD3</i>	c.259A>G	p.K87E	Hom	[a]
11NCE	RP	X-linked	<i>RP2</i>	c.409_411del	p.I137del	Hemi	[29]
20NCE	RP	X-linked	<i>RP2</i>	All gene deletion		Hemi	[a]
59RE	LCA	recessive	<i>RPGRI1</i>	c.895_896del	p.E299Sfs*21	Het	[a]
				c.2367+23del ^f	intronic	Het	[a]
60RG	RP	dominant	<i>SNRNP200</i>	c.2042G>T	p.R681L	Het	[a]
18NCE	RP	recessive	<i>USH2A</i>	c.2276G>T	p.C759F	Het	[32]
				c.9799T>C	p.C3267R	Het	[33]
21NCE	RP	recessive	<i>USH2A</i>	c.1434G>C	p.E478D	Het	[51]
				c.2276G>T	p.C759F	Het	[32]
75RE	RP	recessive	<i>USH2A</i>	c.2209C>T	p.R737X	Het	[52]
				c.8693A>C	p.Y2898S	Het	[a]
5NCE	RP	recessive	<i>USH2A</i>	c.652-2A>G	<i>splicing</i>	Het	[a]
				c.2276G>T	p.C759F	Het	[32]
93RE	CRD	recessive	<i>ABCA4</i>	c.3988G>T	p.E1330X	Het	[a]
				c.6410G>A	p.C2137Y	Het	[a]
C) Families with identified mutations by WES							
9RE	CD	dominant	<i>GUCY2D</i>	c.2747T>C	p.I916T	Het	[a]
E5	RP	recessive	<i>USH2A</i>	c.2167+5G>A	<i>splicing</i>	Het	[53]
				c.4325T>C	p.F1442S	Het	[35]
				c.7364G>A	p.W2455X	Het	[a]

For each family, the phenotype, inheritance model, the altered gene, the identified mutation, the homozygosity/heterozygosity state, and the reference of previously described mutations are indicated. [a] This study, ^bMutations previously identified by APEX ^cUnknown pathogenicity, ^{n.i} Not identified.
doi:10.1371/journal.pone.0088410.t001

analysis of *SNRNP200*, as the cosegregating haplotype extended to three neighbouring RD genes (*CNVM4*, *CNGA3*, *MERTK*), overall covering more than 16 Mb (Figure 1). Direct exonic sequence revealed a novel missense mutation in *SNRNP200*, c.2042G>T (p.R681L) (Table 1 B) in a codon also mutated in other adRP cases (c.2041C>T, p.R681C and c.2042G>A, p.R681H) [28]. Bioinformatics analysis showed that this residue was highly evolutionary

conserved (data not shown) and predicted a damaging effect (Table 2). Moreover, none of the healthy siblings did carry the pathogenic variant, supporting its pathogenicity. In family 2NCE, after the RD chip analysis, ten candidates remained. Extended haplotypes with neighbouring RD genes decreased the number of candidates to five. Unfortunately, no mutation was found in any candidate (the pedigree is not included in Figure 2).

Table 2. Pathogenicity predictions for new missense mutations.

Gene	Mutation	SIFT		PolyPhen-2	
		Score	Prediction	Score	Prediction
<i>CRB1</i>	p.H568Y	1	Tolerated	0,999	Probably damaging
<i>GUCY2D</i>	p.I916T	0,002	Damaging	1	Probably damaging
<i>RD3</i>	p.K87E	0,01	Damaging	0,997	Probably damaging
<i>SNRNP200</i>	p.R681L	0	Damaging	1	Probably damaging
<i>USH2A</i>	p.C584F	0	Damaging	1	Probably damaging
<i>USH2A</i>	p.F1442S	0	Damaging	1	Probably damaging
<i>USH2A</i>	p.Y2898S	0	Damaging	0,998	Probably damaging
<i>USH2A</i>	p.R4192C	0	Damaging	0,998	Probably damaging
<i>ABCA4</i>	p.C2137Y	0	Damaging	1	Probably damaging

Dash(–) means no splice site predicted.
doi:10.1371/journal.pone.0088410.t002

X-linked inheritance was assumed for 20NCE and 11NCE, the latter being also compatible with AD inheritance. SNP genotyping revealed a common deleted region comprising the full *RP2* locus in all male patients of 20NCE, clearly underscoring *RP2* as the disease-causing gene. Indeed, mutational screening confirmed the deletion of the whole coding region. Concerning pedigree 11NCE, the milder affection of women –suggestive of an X-linked trait–, added to the cosegregation of the *RP2* haplotype, both pinpointed this candidate for mutational screening. Exon sequencing identified a previously reported mutation, c.409_411del causing p.I137del, in all the family patients (Table 1 B) [29].

Recessive Consanguineous Families

In five of ten known consanguineous families (10RE, 12ORG, 23NCE, T5, and 25NCE), *CRB1* was the candidate of choice. Prioritization was established based on either an extended haplotype comprising the adjacent *CFH* locus in four pedigrees, or a shared haplotype with a previously diagnosed family, suggesting a founder effect.

The patient II.6 in the family 10RE (Figure 2) carried an homozygous unreported deletion in the intron 9 splice donor site of *CRB1*, c.3749+2_3749+3del, which ablated the splice signal. This outcome was confirmed by *in silico* predictions (Table 3). His nephew was a double heterozygote for this mutation plus a frequent pathogenic variant, c.2843G>A p.C948Y [30].

In family 12ORG, all but four RD genes were discarded, of those, *CRB1* showed an extended haplotype. Direct sequencing revealed a novel missense mutation in homozygosity, c.1702C>T p.H568Y, whose pathogenicity was supported by *in silico* analyses (Table 2). On the other hand, families 23NCE and T5 showed homozygosity for the known missense mutations c.2290C>T p.R764C, and c.2843G>A p.C948Y, respectively [30]. Of note, the haplotype of family T5 affected members was also shared by the patients of another family (25NCE). Subsequent sequencing analysis of *CRB1* confirmed the same causative mutation, supporting common ancestry.

Family 83RE showed an extended haplotype spanning *USH2A* and *RD3*. Given that the clinical diagnosis of the family was RP, *USH2A* was prioritized for direct mutational screening but was excluded after sequencing 72 exons. Screening of the *RD3* candidate, previously reported only as a LCA-causative gene, revealed a new missense mutation c.259A>G p.K87E in homozygosity. *In silico* predictions supported its pathogenicity

(Table 2). Notably, this variant had been identified in 4 out of 13.002 control chromosomes (NHLBI Exome Sequencing Project).

The consanguineous family 75RE was first analyzed assuming homozygosity by descent, and under this assumption, all candidates were discarded. However, if non-consanguinity was assumed an extended haplotype spanning candidates *USH2A* and *RD3* emerged. Subsequent mutational screening of *USH2A* identified two disease-causing mutations in the patients: the reported nonsense c.2209C<T p.R737X and the novel missense c.8693A>C p.Y2898S. The pathogenicity of the latter was fully supported by *in silico* predictions (Table 2).

The non-discarded genes of family 17NCE were prioritized according to: 1) cosegregation and phenotype, pointing to *LRAT*, or 2) shared haplotype with a previously diagnosed Spanish family in *MERTK* [31]. *LRAT* was discarded after sequencing of all exons, whereas direct screening of *MERTK* exon 16 identified the expected mutation c.2189+1G>T in homozygosis, again supporting a founder effect.

Two remaining families were not further considered due to the lack of genetic informativity.

Recessive Non-consanguineous Families

After cosegregation analysis, three candidate genes remained in the 22NCE family (*PROM1*, *RPI* and *TEAD1*). Although consanguinity had not been reported, the mutational screening of *PROM1* revealed a novel homozygous mutation, c.1984-1G>T, which ablates the consensus acceptor splice site of intron 17. Its pathogenicity was fully confirmed by *in silico* predictions (Table 3).

In family 59RE, seven candidate genes cosegregated, although the clinical phenotype of the patients pointed *RPGRIPI* and *TULP1* as the best candidates. *TULP1* did not bear any mutation, whereas two previously unreported variants in *RPGRIPI* were identified. The variant c.895_896del, p.E299Sfs*21, was clearly pathogenic and produced a truncated protein. The other variant was intronic, c.2367+23del, and the possible pathogenic effect was unknown. *In silico* predictions for splice sites, splice enhancers and silencers did not reveal any strong molecular alteration. Besides, *in vivo* analysis of patient’s mRNAs was restrained by the *RPGRIPI* low expression levels in blood. Finally, the transfection in cultured cells of minigenes bearing either the WT or the variant sequence did not conclusively support its pathogenicity. As the analysis of 434 control chromosomes identified this variant once, the c.2367+23del variant could be presumably classified as a rare indel, and its pathogenicity remains to be proved.

Table 3. Pathogenicity predictions for new splicing mutations.

	NetGene2 (0–1)	MaxEnt (score)	HSF (0–100)
<i>CRB1</i> wt	0,37	9,6	96,67
c.3749+2_3749+3del	–	–	–
<i>MERTK</i> wt	0,86	5,58	86,8
c.2189+1G>T	–	–	–
<i>PROM1</i> wt	0	8,36	84,3
c.1984–1G>T	–	–	–
<i>USH2A</i> wt	0,83	4,89	90,92
c.652–2A>G	–	0,56	–

doi:10.1371/journal.pone.0088410.t003

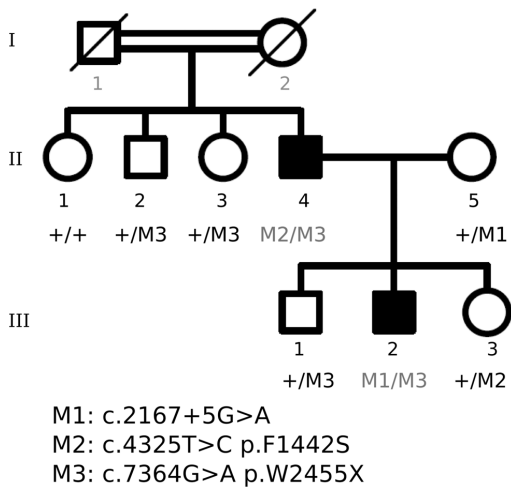


Figure 3. Cosegregation of *USH2A* mutations identified in family E5. Three heterozygous *USH2A* mutations cosegregate with the disease in this consanguineous family. Patient II-4 carried two mutated alleles M2 (c.4325T>C) and M3 (c.7364G>A), whereas his affected son (III-2) inherited the M3 paternal allele plus the reported M1 (c.2167+5G>A) mutation from his mother. doi:10.1371/journal.pone.0088410.g003

Three families compatible with a recessive RP inheritance (5NCE, 18NCE and 21NCE) showed cosegregation with 5–12 candidates, *USH2A* among them. Given that direct genotype of mutations in the RD-chip had already detected a frequent *USH2A* pathogenic allele c.2276G>T, p.C759F, in heterozygosis [32], direct sequencing of the full coding sequence was undertaken. Data revealed one novel pathogenic allele in family 5NCE, c.652-2A>C, which ablates the acceptor splice site, and two reported mutations c.9799T>C p.C3267R (18NCE) and c.1434G>C p.E478D (21NCE); although the pathogenicity of this last variant is still controversial [32–34].

Family 93RE whose clinical diagnosis was compatible with either CRD or recessive Stargardt disease showed cosegregation with *GNAT2*, *ζNF513*, *OPAI1*, *RP1L1* and *ABCA4*. Based on the type of inheritance and phenotype, we prioritized the analysis of *GNAT2*, *ζNF513* and *ABCA4*. Two unreported mutations in *ABCA4* were identified, the nonsense c.3988G>T p.E1330X and the missense c.6410G>A p.C2137Y variants. *In silico* predictions

by PolyPhen2 and SIFT of the latter supported its pathogenicity (Table 2).

WES Families

After exclusion with the chip of the one hundred RD candidates, WES was undertaken in suitable remaining families. Concerning family E5, most recessive RD genes were discarded under the assumption of claimed consanguinity (I.1 and I.2), and the rest of candidates was excluded by Sanger sequencing. WES was then undertaken for patients II.4 and III.2 (Figure 2). Unexpectedly, one novel (c.7364G>A) and one recently reported mutation (c.4325T>C) [35] in *USH2A* were identified in patient II.4, whereas his affected son (patient III.2) carried the c.4325T>C mutation from his father plus the reported pathogenic c.2167+5G>A allele inherited from his mother. Haplotype analysis of the pedigree confirmed cosegregation of these pathogenic variants (Figure 3). In this family, the exceptional non-compliance with the homozygosity-by-descent assumption had excluded *USH2A* as the causative gene in the RD chip analysis.

The 9RE pedigree (Figure 2) showed an autosomal dominant cone dystrophy. In this large cohort, the high genetic informativity allowed us to exclude most candidates after the RD cosegregation chip, and Sanger sequencing ruled out the few remaining genes. Exome sequencing was then undertaken and identified a new mutation in *GUCY2D*, c.2747T>C. This candidate had not been previously considered because the SNP haplotype analysis showed recombination within the 3' flanking region in one affected member (IV 5). Although the selected SNPs are closely linked to the genes to minimize it, recombination, however infrequent, may occur and mislead the analysis.

RD-Chip Efficiency

Table 4 summarizes the percentage of complete molecular diagnosis attained with the RD chip, categorized by inheritance pattern and the number of samples available per family. Six autosomal dominant families with at least 4 available samples (and a minimum of three patients) were analyzed, yet only one family, 6ORG, (7 samples with three affected members) was successfully diagnosed. Indeed, when dealing with dominant diseases, the main drawback for successful diagnosis is the large number of samples required to attain discriminative genetic informativity. In contrast, in recessive families, the percentage of success doubles to 33% (6 out of 18) in non-consanguineous, and dramatically raises up to 80% (8 out of 10), in consanguineous pedigrees. We conclude that the highest informativity of recessive pedigrees, particularly under the homozygosity-by-descent assumption in consanguinity, increases the efficiency of the RD chip and highlights its reliability for RD molecular diagnosis.

Table 4. Families solved by the RD-chip according to the number of samples available and the inheritance pattern.

	Number of families solved/Total number of families						
	4 samples	5 samples	6 samples	7 samples	8 samples	>8 samples	Total
Dominants		0/1	0/1	1/2		0/2	1/6
Recessives	4/7*	2/6	0/1	0/2	0/1	0/1	6/18
Consanguineous	2/2	1/3	1/1		2/2	2/2	8/10
X-linked	1/1			1/1			2/2
Total	7/10	3/10	1/3	2/5	2/3	2/5	17/36

*One allele identified by direct genotyping in 3 cases. doi:10.1371/journal.pone.0099354.t004

Table 5. Comparison of efficiencies of different methods for RD molecular diagnosis.

	N° Genes analyzed	Yield	Reference
APEX	1-16	15-44%	[44, 54]
Long-PCR	9	33%	[43]
Autozygome	16-100	42-52%	[48, 55]
Target Capture	105-179	36-56%	[11, 44-47, 56]
WES	All	44-83%*	[43, 48, 49, 57]
WGS	All	50%	[10]
RD-chip	100	47%	This study

*Higher efficiency percentages are obtained when few families or cases are analysed.
doi:10.1371/journal.pone.0099354.t005

Finally, two X-linked cohorts were successfully diagnosed. The RD chip included markers for cosegregation analysis of the two known X-linked causative loci (*RP2* and *RPGR*), given that X-linked inheritance can only be discarded in pedigrees with male-to-male transmission [36], and as a means to avoid the burdensome task of sequencing the hot-spot ORF15 of *RPGR* whenever cosegregation analysis does not support it.

Discussion

To meet the increasing demand for genetic diagnosis from clinicians and patients, we have devised and optimized an RD chip that allows us to extract maximum genetic informativity from pedigrees, exclude a large number of non-cosegregating candidates and focus on the most probable causative genes. Moreover, the exclusion of all analyzed candidates by the RD chip highlights the families suitable for next generation sequencing (NGS) and subsequent identification of novel RD genes.

To improve the efficiency and the scope of the RD-Chip with respect previous attempts [12,37] we have: i) increased the number of SNPs (7–10) per gene to maximize the genetic informativity, ii) extended the cosegregation study to 100 retinal dystrophy genes, and iii) included some prevalent pathogenic point mutations in the Spanish population for direct genotyping. The RD-chip allows to genotype 768 selected SNPs in a single cost- and time-effective step and is designed to use on families, not on simplex cases.

With this optimized RD-chip version, 17 out of 36 Spanish pedigrees have been fully diagnosed. Twelve new and 12 previously reported pathological variants have been identified in 9 RD genes, adding to the high genetic diversity in retinal disorders. The fact that as much as half of the mutations identified are new underscores the efficiency of our RD chip compared to direct mutational screening, particularly in non-homogenous genetic populations. Concerning the major candidates in our cohort, *CRB1* and *USH2A* explain 10/19 families overall, in accordance with other reports [38,39] and consistent with their contribution to several clinical entities. *CRB1* is responsible for RP and LCA (a more severe form of RP), and more than 150 mutations have been described so far (<http://www.hgmd.org>). In our panel, the LCA pedigree (10RE) carried a novel splicing mutation, whereas the RP pedigrees (12ORG, 23NCE, 25NCE, T5) were all associated to missense variants (Table 1). Our results agree with the *CRB1*-assigned phenotype-genotype correlations, where null alleles are mainly associated to the LCA phenotype [39,40]. Also in agreement with previous reports, p.C948Y is the most prevalent *CRB1* mutation in our family panel (3 of the 5 *CRB1* families) [39].

Five non-syndromic RP families presented 4 new (2 missense, one nonsense and one splicing mutation) and 7 reported (5 missense, one nonsense and one splicing mutation) pathogenic alleles in *USH2A*. In the Usher cohorts, analysis of *USH2A* rendered 2 new missense and 3 known (one frameshift and 2 missense) mutations. In two families, only one of the pathogenic alleles was identified. In fact, some reports support that as much as 35% of the second *USH2A* mutant alleles are duplications, deletions and deep intronic variants, which are extremely difficult to detect by DNA sequencing [27]. On the other hand, no clear phenotype-genotype correlation could be established between RP and Usher cases. The most prevalent *USH2A* mutation in non-syndromic RP, p.C759F [32,41], was also present in three families of our cohort. Notably, double heterozygosis in *USH2A* was unexpectedly found in two consanguineous families. In fact, in pedigree E5, three pathogenic alleles were identified in two generations. In this particular case, the assumption of homozygosity by descent led us to wrongly assume non-cosegregation with all RD genes and undertake WES analysis, which eventually identified an unexpected double heterozygous genotype. A seemingly higher number of mutation carriers had also been reported for other syndromic RPs, such as Bardet-Biedl, with no solid evidence for this finding [42].

The inclusion of X-linked markers in the RD-chip has proved to be extremely useful to diagnose families compatible with both autosomal and X-linked inheritance patterns. In fact, in pedigree 11NCE, the milder affectation of the female patients was already suggestive of a pseudo-dominant effect, as it was indeed confirmed (*RP2* was the causative gene). On the other hand, family 20NCE, with an unassigned mendelian pattern, cosegregated with X-linked markers, which prompted to focus on the X-linked candidates. A deletion comprising the *RP2* locus was identified (Table 1).

Remarkably, the clinical heterogeneity of retinal disorders was highlighted by the identification of *RD3*—up to now associated only to LCA— as causative of RP (Table 1), increasing the phenotypes associated to the gene mutations. This case would have remained unassigned by conventional methods had it been not for the comprehensive analysis of our RD chip, whose main asset is the robustness of genetic information to highlight the most probable candidates, avoiding the yet burdensome task of big data analysis. Particularly, identification of shared (which indicate a common founder effect) or extended haplotypes over closely mapping genes (which strengthen cosegregation) are invaluable clues to directly pinpoint the causative mutation, unveil unexpected candidates, and/or prompt re-evaluation of clinical features.

Recently, a variety of NGS-based procedures have been developed for molecular diagnosis of RDs, from targeted long-

range PCR coupled to NGS [43,44], targeted capture and sequencing of one or several RD genes [45–47], to full WES analysis [11,48,49]. Although powerful tools, they still yield limited complete diagnostic success: from 37%–52% in non-related cohorts to 80% in cohorts with high consanguinity levels [48] (Table 5). Aside high costs, the restraints of NGS-targeted approaches are due to the high genetic heterogeneity of retinal disorders, whereas the main drawbacks of WES are the high sequence coverage requirement and the functional interpretation of the identified variants (WES). Within this context, the RD-chip efficiency ranges from 16% in dominant to 80% in consanguineous recessive pedigrees, with an average of 47%, well within the upper range of the NGS approaches. Besides, the design of this chip is extremely flexible, which allows to incorporate new SNPs to expand the gene repertoire after new discoveries or upon demand. Before NGS paves the future of personalized diagnosis, our cost- and time-effective strategy allows a quick and reliable prioritization of candidates, which is suitable and affordable for middle-size diagnostic labs with moderate to high number of family cases.

References

- Retinal Information Network website Available: <https://sph.uth.edu/RetNet/>.
- Athanasios D, Aguilu M, Bevilacqua D, Novoselov SS, Parfitt DA, et al. (2013) The cell stress machinery and retinal degeneration. *FEBS Lett* 587: 2008–2017.
- Andrade IJ, Andrade R, Franca CS, Bittencourt AV (2009) Pigmentary retinopathy due to Bardet-Biedl syndrome: case report and literature review. *Arq Bras Oftalmol* 72: 694–696.
- Bonnet CEI-Amraoui A (2012) Usher syndrome (sensorineural deafness and retinitis pigmentosa): pathogenesis, molecular diagnosis and therapeutic approaches. *Curr Opin Neurol* 25: 42–49.
- Estrada-Cuzcano A, Roepman R, Cremers FP, den Hollander AI, Mans DA (2012) Non-syndromic retinal ciliopathies: translating gene discovery into therapy. *Hum Mol Genet* 21: R111–124.
- Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shaw K, et al. (2012) The Human Gene Mutation Database (HGMD) and its exploitation in the fields of personalized genomics and molecular evolution. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 1: Unit1 13.
- den Hollander AI, Black A, Bennett J, Cremers FP (2010) Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. *J Clin Invest* 120: 3042–3053.
- Berger W, Kloetckner-Gruissem B, Neidhardt J (2010) The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res* 29: 335–375.
- Koenekoop RK, Lopez I, den Hollander AI, Allikmets R, Cremers FP (2007) Genetic testing for retinal dystrophies and dysfunctions: benefits, dilemmas and solutions. *Clin Experiment Ophthalmol* 35: 473–485.
- Nishiguchi KM, Tearle RG, Liu YP, Oh EC, Miyake N, et al. (2013) Whole genome sequencing in patients with retinitis pigmentosa reveals pathogenic DNA structural changes and NEK2 as a new disease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 16139–16144.
- Neveling K, Collin RW, Gillisen C, van Huet RA, Visser L, et al. (2012) Next-generation genetic testing for retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* 33: 963–972.
- Pomares E, Marfany G, Brion MJ, Carracedo A, Gonzalez-Duarte R (2007) Novel high-throughput SNP genotyping cosegregation analysis for genetic diagnosis of autosomal recessive retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. *Hum Mutat* 28: 511–516.
- Pomares E, Riera M, Permany J, Mendez P, Castro-Navarro J, et al. (2010) Comprehensive SNP-chip for retinitis pigmentosa-Leber congenital amaurosis diagnosis: new mutations and detection of mutational founder effects. *Eur J Hum Genet* 18: 118–124.
- Pomares E, Marfany G, Gonzalez-Duarte R (2012) High-throughput approaches for the genetic diagnosis of retinal dystrophies. *Adv Exp Med Biol* 723: 329–335.
- Ng PC, Henikoff S (2001) Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 11: 863–874.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, et al. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7: 248–249.
- Brunak S, Engelbrecht J, Knudsen S (1991) Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J Mol Biol* 220: 49–65.
- Hebsgaard SM, Korning PG, Tolstrup N, Engelbrecht J, Rouze P, et al. (1996) Splice site prediction in Arabidopsis thaliana pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Res* 24: 3439–3452.
- Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, et al. (2009) Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 37: e67.
- Yeo G, Burge CB (2004) Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol* 11: 377–394.
- Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25: 1754–1760.
- Marco-Sola S, Sammeth M, Guigo R, Ribeca P (2012) The GEM mapper: fast, accurate and versatile alignment by filtration. *Nat Methods* 9: 1185–1188.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, et al. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078–2079.
- DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, et al. (2011) A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* 43: 491–498.
- Cingolani P, Platts A, Wang Jc L, Coon M, Nguyen T, et al. (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 6: 80–92.
- Medina I, De Maria A, Bleda M, Salavert F, Alonso R, et al. (2012) VARIANT: Command Line, Web service and Web interface for fast and accurate functional characterization of variants found by Next-Generation Sequencing. *Nucleic Acids Res* 40: W54–58.
- Steele-Stallard HB, Le Quesne Stabej P, Lenassi E, Luxon LM, Claustres M, et al. (2013) Screening for duplications, deletions and a common intronic mutation detects 35% of second mutations in patients with USH2A monoallelic mutations on Sanger sequencing. *Orphanet J Rare Dis* 8: 122.
- Benaglio P, McGee TL, Capelli LP, Harper S, Berson EL, et al. (2011) Next generation sequencing of pooled samples reveals new SNRP200 mutations associated with retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* 32: E2246–2258.
- Sharon D, Bruns GA, McGee TL, Sandberg MA, Berson EL, et al. (2000) X-linked retinitis pigmentosa: mutation spectrum of the RPGR and RP2 genes and correlation with visual function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 2712–2721.
- den Hollander AI, ten Brink JB, de Kok YJ, van Soest S, van den Born LJ, et al. (1999) Mutations in a human homologue of *Drosophila* crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat Genet* 23: 217–221.
- Brea-Fernandez AJ, Pomares E, Brion MJ, Marfany G, Blanco MJ, et al. (2008) Novel splice donor site mutation in MERTK gene associated with retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 92: 1419–1423.
- Rivolta C, Sweklo EA, Berson EL, Dryja TP (2000) Missense mutation in the USH2A gene: association with recessive retinitis pigmentosa without hearing loss. *Am J Hum Genet* 66: 1975–1978.
- Aller E, Jaijo T, Beneyto M, Najera C, Oltra S, et al. (2006) Identification of 14 novel mutations in the long isoform of USH2A in Spanish patients with Usher syndrome type II. *J Med Genet* 43: e55.
- Garcia-Garcia G, Aparisi MJ, Jaijo T, Rodrigo R, Leon AM, et al. (2011) Mutational screening of the USH2A gene in Spanish USH patients reveals 23 novel pathogenic mutations. *Orphanet J Rare Dis* 6: 65.
- Mendez-Vidal C, Gonzalez-Del Pozo M, Vela-Boza A, Santoyo-Lopez J, Lopez-Domingo EJ, et al. (2013) Whole-exome sequencing identifies novel compound heterozygous mutations in USH2A in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 19: 2187–2195.
- Churchill JD, Bowne SJ, Sullivan LS, Lewis RA, Wheaton DK, et al. (2013) Mutations in the X-linked retinitis pigmentosa genes RPGR and RP2 found in 8.5% of families with a provisional diagnosis of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 1411–1416.
- Permany J, Navarro R, Friedman J, Pomares E, Castro-Navarro J, et al. (2010) Autosomal recessive retinitis pigmentosa with early macular affection caused by premature truncation in PROM1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 2656–2663.
- Hartong DT, Berson EL, Dryja TP (2006) Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368: 1795–1809.

Supporting Information

Figure S1 Cosegregation analysis of the novel mutations identified. M: mutation (TIF)

Acknowledgments

We gratefully acknowledge all patients and their relatives for participating in this study. We are obliged to A. Mayor for sample collection, helpful discussions and constant support to our research. We are indebted to B. Cormand for his guidance and invaluable advice on WES. We also thank P. Méndez and S. Ruiz for technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MdCM EP GM RGD. Performed the experiments: MdCM EP LLM. Analyzed the data: MdCM EP LLM RT JD GM RGD. Contributed reagents/materials/analysis tools: RT JD GM RGD. Wrote the paper: MdCM GM RGD.

39. Bujakowska K, Audo I, Mohand-Said S, Lancelot ME, Antonio A, et al. (2011) CRB1 mutations in inherited retinal dystrophies. *Hum Mutat* 33: 306–315.
40. den Hollander AI, Davis J, van der Velde-Visser SD, Zonneveld MN, Pierrotet CO, et al. (2004) CRB1 mutation spectrum in inherited retinal dystrophies. *Hum Mutat* 24: 355–369.
41. Aller E, Najera C, Millan JM, Oltra JS, Perez-Garrigues H, et al. (2004) Genetic analysis of 2299delG and C759F mutations (USH2A) in patients with visual and/or auditory impairments. *Eur J Hum Genet* 12: 407–410.
42. Hjortshøj TD, Grønskov K, Philp AR, Nishimura DY, Riise R, et al. (2010) Bardet-Biedl syndrome in Denmark—report of 13 novel sequence variations in six genes. *Hum Mutat* 31: 429–436.
43. Licastro D, Mutarelli M, Peluso I, Neveling K, Wieskamp N, et al. (2012) Molecular diagnosis of Usher syndrome: application of two different next generation sequencing-based procedures. *PLoS One* 7: e43799.
44. Fujinami K, Zernant J, Chana RK, Wright GA, Tsunoda K, et al. (2013) ABCA4 Gene Screening by Next-Generation Sequencing in a British Cohort. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 6662–6674.
45. Chen X, Zhao K, Sheng X, Li Y, Gao X, et al. (2013) Targeted sequencing of 179 genes associated with hereditary retinal dystrophies and 10 candidate genes identifies novel and known mutations in patients with various retinal diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 2186–2197.
46. Huang XF, Xiang P, Chen J, Xing DJ, Huang N, et al. (2013) Targeted exome sequencing identified novel USH2A mutations in Usher syndrome families. *PLoS One* 8: e63832.
47. Gloeckle N, Kohl S, Mohr J, Scheurenbrand T, Sprecher A, et al. (2013) Panel-based next generation sequencing as a reliable and efficient technique to detect mutations in unselected patients with retinal dystrophies. *Eur J Hum Genet*.
48. Abu-Safieh L, Alrashed M, Anazi S, Alkuraya H, Khan AO, et al. (2013) Autozygome-guided exome sequencing in retinal dystrophy patients reveals pathogenic mutations and novel candidate disease genes. *Genome Res* 23: 236–247.
49. Corton M, Nishiguchi KM, Avila-Fernandez A, Nikopoulos K, Riveiro-Alvarez R, et al. (2013) Exome sequencing of index patients with retinal dystrophies as a tool for molecular diagnosis. *PLoS One* 8: e65574.
50. Eady JD, Weston MD, Yao S, Hoover DM, Rehm HL, et al. (1998) Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa. *Science* 280: 1753–1757.
51. Seyedahmadi BJ, Rivolta C, Keene JA, Berson EL, Dryja TP (2004) Comprehensive screening of the USH2A gene in Usher syndrome type II and non-syndromic recessive retinitis pigmentosa. *Exp Eye Res* 79: 167–173.
52. Kaiserman N, Obolensky A, Banin E, Sharon D (2007) Novel USH2A mutations in Israeli patients with retinitis pigmentosa and Usher syndrome type 2. *Arch Ophthalmol* 125: 219–224.
53. Najera C, Beneyto M, Blanca J, Aller E, Fontcuberta A, et al. (2002) Mutations in myosin VIIA (MYO7A) and usherin (USH2A) in Spanish patients with Usher syndrome types I and II, respectively. *Hum Mutat* 20: 76–77.
54. Avila-Fernandez A, Cantalapiedra D, Aller E, Vallespin E, Aguirre-Lamban J, et al. (2010) Mutation analysis of 272 Spanish families affected by autosomal recessive retinitis pigmentosa using a genotyping microarray. *Mol Vis* 16: 2550–2558.
55. Alazami AM, Alshammari MJ, Salih MA, Alzahrani F, Hijazi H, et al. (2012) Molecular characterization of Joubert syndrome in Saudi Arabia. *Hum Mutat* 33: 1423–1428.
56. Wang X, Wang H, Sun V, Tuan HF, Keser V, et al. (2013) Comprehensive molecular diagnosis of 179 Leber congenital amaurosis and juvenile retinitis pigmentosa patients by targeted next generation sequencing. *J Med Genet* 50: 674–688.
57. Neveling K, Feenstra I, Gilissen C, Hoefsloot LH, Kamsteeg EJ, et al. (2013) A Post-Hoc Comparison of the Utility of Sanger Sequencing and Exome Sequencing for the Diagnosis of Heterogeneous Diseases. *Hum Mutat* 34: 1721–1726.

PUBLICACIÓ 2

Títol

«*Novel candidate genes and a wide spectrum of structural and point mutations responsible for inherited retinal dystrophies revealed by exome sequencing*»

Resum

Les metodologies de seqüenciació massiva del DNA (NGS) han revolucionat el camp del diagnòstic genètic, particularment el de les patologies que, com les distròfies de retina hereditàries (IDR), poden estar causades per un nombre de gens molt elevat, i no hi ha criteris clínics en la major part de casos que permetin fer una priorització de candidats. Avui dia es coneixen més de 260 gens que causen IDR, entre les formes sindròmiques i les no sindròmiques, que es transmeten seguint tots els patrons d'herència mendelians possibles, i molt probablement resta encara un nombre elevat de nous gens per identificar.

Les metodologies NGS permeten dur a terme estudis del genoma complet (WGS, *Whole Genome Sequencing*), de les regions codificants del genoma (WES, *Whole Exome Sequencing*) o de regions d'interès, principalment regions codificants dels gens que estan directament implicats en entitats clíniques definides (*Customized Targeted Sequencing*).

L'objectiu del treball ha estat abordar el diagnòstic genètic mitjançant WES de 33 famílies afectades de IRD (sindròmiques i no sindròmiques) de les quals 4 presenten herència dominant, 17 herència recessiva (7 amb consanguinitat coneguda) i 12 són casos únics a la família.

Mitjançant anàlisi WES s'han identificat els gens alterats en 18 casos (18/33, un 55%) i en 10 més s'han trobat variants probablement patogèniques en gens candidats (10/33, un 30%). S'han identificat 21 mutacions noves en gens IDR, i 4 grans alteracions estructurals, dues d'elles a la mateixa família, que involucren des de un parell d'exons a més d'un gen. Aquestes dades recolzen els resultats obtinguts per altres autors i per aquest equip en treballs anteriors que demostren que la major part de mutacions puntuals patogèniques són específiques per a cada família (60%) i que les mutacions que impliquen delecions i duplicacions probablement expliquen una fracció important dels casos de diagnòstic molecular

no resultats. En dues famílies, la identificació de la causa molecular per WES ha permès diagnosticar una patologia sindròmica que havia passat desapercibuda clínicament, tot forçant la reavaluació clínica dels pacients.

Finalment, és important destacar que la metodologia WES emprada pel diagnòstic molecular ha permès la identificació de quatre nous gens causals: *SEMA6B*, responsable de CRD, i tres gens relacionats amb la funció ciliar, *CEP250*, *CEP78* i *SCLT1*, causants de RP. Aquestes dades subratllen la potència de la metodologia WES per identificar nous gens responsables de la patologia, i posen de manifest que probablement el nombre de gens implicats en les DR s'incrementarà en el futur. La identificació de nous gens no només millora l'eficàcia del diagnòstic genètic d'aquestes patologies sinó que també contribueix substancialment al coneixement de les bases moleculars de la neurodegeneració de la retina i, per tant, obre vies al desenvolupament de noves aproximacions terapèutiques.

En resum, mitjançant la metodologia WES s'han resolt el 85% dels casos analitzats (ja sigui totalment o amb variants rares en gens candidats), s'ha incrementat el nombre de mutacions i el nombre de gens associats a les DR, i, s'han obert noves perspectives d'estudi de la relació genotip-fenotip en aquest conjunt de patologies.

Referència

Marta de Castro-Miró, Raul Tonda, Paula Escudero-Ferruz, Rosa Andrés, Andrés Mayor-Lorenzo, Joaquín Castro, Marcela Ciccioli, Daniel A. Hidalgo, Juan José Rodríguez-Ezcurra, Jorge Farrando, Juan J. Pérez-Santonja, Bru Cormand, Gemma Marfany and Roser González-Duarte. *Novel Candidate Genes and a Wide Spectrum of Structural and Point Mutations Responsible for Inherited Retinal Dystrophies Revealed by Exome Sequencing*. PLoS One. 2016 Dec 22;11(12):e0168966.

RESEARCH ARTICLE

Novel Candidate Genes and a Wide Spectrum of Structural and Point Mutations Responsible for Inherited Retinal Dystrophies Revealed by Exome Sequencing

Marta de Castro-Miró^{1,2,3}, Raul Tonda^{4,5}, Paula Escudero-Ferruz¹, Rosa Andrés^{1,2}, Andrés Mayor-Lorenzo⁶, Joaquín Castro⁷, Marcela Ciccioli⁸, Daniel A. Hidalgo⁹, Juan José Rodríguez-Ezcurra¹⁰, Jorge Farrando¹¹, Juan J. Pérez-Santonja¹², Bru Cormand^{1,2,3}, Gemma Marfany^{1,2,3}, Roser González-Duarte^{1,2,3*}



1 Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain, **3** Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **4** CNAG-CRG, Centre for Genomic Regulation (CRG), Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), Barcelona, Spain, **5** Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain, **6** Asociación EsRetina Asturias, Oviedo, Asturias, Spain, **7** Servicio de Oftalmología, Unidad de Retina, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain, **8** Stargardt APNES-Retina, Buenos Aires, Argentina, **9** Hospital Interzonal General de Agudos Eva Perón, Buenos Aires, Argentina, **10** Barraquer – Centro de Oftalmología Barcelona, Barcelona, Spain, **11** Institut Oftalmològic Quirón Barcelona, Barcelona, Spain, **12** Department of Ophthalmology, Alicante University General Hospital, Alicante Institute for Health and Biomedical Research (ISABIAL-FISABIO Foundation), Alicante, Spain

* rgonzalez@ub.edu

OPEN ACCESS

Citation: de Castro-Miró M, Tonda R, Escudero-Ferruz P, Andrés R, Mayor-Lorenzo A, Castro J, et al. (2016) Novel Candidate Genes and a Wide Spectrum of Structural and Point Mutations Responsible for Inherited Retinal Dystrophies Revealed by Exome Sequencing. PLoS ONE 11 (12): e0168966. doi:10.1371/journal.pone.0168966

Editor: Namik Kaya, King Faisal Specialist Hospital and Research Center, SAUDI ARABIA

Received: July 25, 2016

Accepted: December 9, 2016

Published: December 22, 2016

Copyright: © 2016 de Castro-Miró et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was supported by grants SAF2013-49069-C2-1-R (Ministerio de Economía y Competitividad), 2014SGR-0932 (Generalitat de Catalunya), and La Marató TV3 (Project Marató 201417-30-31-32) to G.M. and R. G-D and PT13/0001/0044 (Ministerio de Economía y

Abstract

Background

NGS-based genetic diagnosis has completely revolutionized the human genetics field. In this study, we have aimed to identify new genes and mutations by Whole Exome Sequencing (WES) responsible for inherited retinal dystrophies (IRD).

Methods

A cohort of 33 pedigrees affected with a variety of retinal disorders was analysed by WES. Initial prioritization analysis included around 300 IRD-associated genes. In non-diagnosed families a search for pathogenic mutations in novel genes was undertaken.

Results

Genetic diagnosis was attained in 18 families. Moreover, a plausible candidate is proposed for 10 more cases. Two thirds of the mutations were novel, including 4 chromosomal rearrangements, which expand the IRD allelic heterogeneity and highlight the contribution of private mutations. Our results prompted clinical re-evaluation of some patients resulting in assignment to a syndromic instead of non-syndromic IRD. Notably, WES unveiled four new candidates for non-syndromic IRD: *SEMA6B*, *CEP78*, *CEP250*, *SCLT1*, the two latter

Competitividad) to R.T. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

previously associated to syndromic disorders. We provide functional data supporting that missense mutations in *CEP250* alter cilia formation.

Conclusion

The diagnostic efficiency of WES, and strictly following the ACMG/AMP criteria is 55% in reported causative genes or functionally supported new candidates, plus 30% families in which likely pathogenic or VGUS/VUS variants were identified in plausible candidates. Our results highlight the clinical utility of WES for molecular diagnosis of IRD, provide a wider spectrum of mutations and concomitant genetic variants, and challenge our view on syndromic vs non-syndromic, and causative vs modifier genes.

Introduction

Massive sequencing, particularly Whole Exome Sequencing (WES), has completely revolutionized genetic diagnosis of highly heterogeneous monogenic disorders. In the field of inherited retinal disorders (IRD), more than 20 novel genes, mostly identified by WES, have been reported since the beginning of 2014 (an average of one novel gene per month). This success relies on the power of primary sequence DNA data at a genomic scale, the increasing number of suitable up-to-date databases of SNP allelic frequencies in different populations, the relative simplicity of standardized WES protocols and the availability of powerful and increasingly refined bioinformatics tools [1–4].

The molecular diagnosis yield of WES is highly empowered by complementary genetic data (e.g. homozygosity mapping and linkage analysis), which greatly favours the identification of the causative gene in recessive cases. In contrast, finding the pathogenic mutation in dominant cases amidst the high number of heterozygous variants identified by WES is far from trivial, and often requires cosegregation analysis in large pedigrees, which are not always available neither necessarily conclusive [5–8].

Molecular diagnosis of IRD is one of the main aims of our research. Currently, aside WES, other massive sequencing-based approaches have been also implemented in IRD genetic diagnosis laboratories, such as targeted-sequencing of a limited set of causative/candidate genes [9–12]. These approaches have proved useful to study large cohorts in order to identify reported or novel mutations in known genes, but they may fall short when the pathogenic mutation maps in an unreported candidate. Increasing the number of analysed genes greatly redounds in the final diagnostic efficiency, broadens the spectrum of the cellular pathways underlying the retinal pathological state, provides invaluable insights into phenotype-modifier genes and opens new venues for therapy [13,14].

We have used WES to diagnose a cohort of families affected of a wide spectrum of IRD, including syndromic and non-syndromic cases, recessive and dominant families as well as sporadic cases. Initially, a single individual from each family was assessed by WES, followed by Sanger sequencing as well as cosegregation analysis in available members. A total of 18 out of 33 cases were finally diagnosed, 17 showing causative mutations in already reported genes. In other 10 families, plausible candidates complying with some of the ACMG/AMP criteria were identified. Since most of the mutations are novel, including gross deletions and duplications, our results illustrate the high allelic heterogeneity of IRD and highlight the contribution of private mutations. Most important, we propose four new IRD candidates based on the WES data,

genetic cosegregation, *in silico* and functional analyses, thus increasing the genetic factors and cellular pathways underlying neurodegeneration.

Materials and Methods

Subjects

A total of 33 families from Argentina, Saudi Arabia and Spain with patients diagnosed with IRD were recruited from reference ophthalmological institutions or patient's associations. Peripheral blood DNA from patients and available relatives was obtained using the QIAamp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Written informed consent from all patients and relatives was obtained following the tenets of the Declaration of Helsinki. Procedures for patient recruitment and sample collection were previously approved by the Bioethics Committee of the University of Barcelona (Barcelona, Spain).

Library preparation and sequencing

Exome sequencing was performed at the Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG, Barcelona, Spain). Paired-end multiplex libraries were prepared with Illumina TruSeq DNA Sample Prep kit (Illumina, San Diego, California, USA) and enriched with the Agilent SureSelect Human AllExon v5 (Agilent, Santa Clara, California, USA). Libraries were loaded onto Illumina flowcells for cluster generation prior to producing 100 base read pairs on a HiSeq2000 instrument. Base calling, quality control and data processing was performed with the Illumina RTA sequence analysis pipeline as previously described[15]. Detected mutations were verified by Sanger sequencing. Coverage of the target region and the subset of retinitis related genes were assessed with DepthOfCoverage from GATK. Subsets of variants falling in the capture region were obtained using Bedtools[16] and common unix commands.

Prioritization of genetic variants

First, variants that altered the coding region of IRD genes were retrieved when the allelic frequency in public databases (ExAC[17]) was lower than or equal to 1%. Therefore, only infrequent null, missense, frameshift and splicing mutations were considered. The second filter was that the number of identified mutations complied with the expected Mendelian pattern of inheritance. Third, the missense variants were considered pathogenic when at least two of the *in silico* prediction algorithms (MutationTaster[18] SIFT[19], PolyPhen2[20] and CADD[21]) gave a positive score. Selected variants were validated by Sanger sequencing, and confirmed by cosegregation whenever possible. Pathogenicity was considered according to the ACMG/AMP standards and guidelines, which take into account.

Detection of chromosomal rearrangements

Coverage analysis was visualized using IGV[22]. For pedigrees 10NCE and 68ORG, cosegregation of SNPs mapping at the expected deleted region was analysed by PCR amplification and sequencing as aforementioned. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) analysis of *PRPF31* was carried on 23 individuals of family E4, using the MLPA Retinitis Pigmentosa kit SALSA-P235-B2 (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands) with probes for every *PRPF31* exon. MLPA products were separated by capillary electrophoresis and analysed using the software Coffalyser v8 (MRC Holland) to evaluate CNVs, considering a deletion when the probe ratio between sample and control was under 0.7, and duplication when it was over 1.3. The breakpoint of the *CRX* deletion in family 10NCE was mapped using common SNPs between *CRX* and *SULT2A1* for PCR-amplification and Sanger-sequencing to identify

heterozygosity in affected probands (inferring non-deletion) or homozygosity for different alleles in mother and child (inferring deletion). Adjacent regions were aligned using Pairwise Sequence Alignment[23]. In family E4, we considered and finally demonstrated a tandem duplication of *PRPF31* exons 2 to 5, by genomic DNA amplification using specific PCR primers and subsequent sequencing.

Immunodetection of CEP250 in the mouse retina

Adult C57BL/6J mice (IMSR_JAX:000664) were sacrificed in accordance with National and European regulations. For immunocytochemistry, eyes from adult C57BL/6J mice (IMSR_JAX:000664) were removed and fixed in 0.1 M phosphate buffer, containing 4% formaldehyde for 4 hr at RT. Tissues were cryopreserved overnight in 30% sucrose, embedded in OCT (Sakura Finetek, Leiden, The Netherlands) and snap-frozen. Cryosections (12 μ m) were incubated with 0.3% Triton X-100 and 2% sheep serum in PBS at 4°C with the corresponding primary antibodies: anti-CEP250 1:100 (AB_2076918, Proteintech, Chicago, USA), anti-rhodopsin 1D4 1:200 (AB_304874, Abcam, Cambridge, UK) and anti-acetylated α -tubulin 1:3000 (AB_477585, Sigma, St. Louis, Missouri, USA). After incubation with Alexa Fluor 488 and 568 secondary antibodies and DAPI (5 μ g/ml) (Sigma) for 2 h at room temperature, slides were mounted with Mowiol. Confocal images were obtained using a TCS SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, 63 \times objective, 1.4 NA).

Expression of wt and mutant CEP250 constructs in ARPE19 cells

The mammalian expression vector (pCMV6 backbone) containing the human Wt-CEP250 full-length coding region was obtained from OriGene. Site-directed mutagenesis was then performed on the Wt-CEP250 sequence to generate the A609V mutant (Mt-CEP250). The IT6 epitope (Antibody BCN, Cerdanyola del Vallès, Spain) sequence was fused at the C-terminus of each coding region. All constructs were sequenced to confirm integrity. Human ARPE-19 cells (1.5×10^5 /well) were plated (40% confluence) onto poly-L-lysine coated coverslips in 1:1 Ham's F10 and DMEM containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin. After 24 h, cells were transfected with 0.8 μ g/well of either wild-type or mutant CEP250-IT6 expression constructs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Heidelberg, Germany). On reaching confluence, cells were deprived of serum for 48 h and then fixed with paraformaldehyde for 30 min at room temperature. Coverslips were washed 3 times with PBS and processed for immunofluorescence staining. Labelling was performed with anti-IT6 antibody 1:100 (kindly provided by Antibody BCN), anti-acetylated α -tubulin 1:3000 (AB_477585, Sigma) and DAPI nuclear counterstaining. Confocal images were acquired sequentially using a TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, 100 \times objective, 1.4 NA). Cilia length was measured using Fiji implementation of Image J[24] and statistical analysis was carried on with GraphPad Prism.

Results

WES results and genetic analysis of pedigrees

A total of 33 families affected by syndromic and non-syndromic IRD were recruited and analysed by WES for genetic diagnosis after clinical evaluation. Fourteen patients were simplex cases with no reported genetic precedent. Four families showed a dominant Mendelian pattern of inheritance, whereas fourteen were compatible with recessive inheritance. We were able to identify the genetic cause of the disease in 18 families (out of 33). Moreover, credible candidates are proposed for 10 more cases. Therefore, the strict global diagnostic efficiency was 55%

to which an additional 30%, based on the identification of plausibly pathogenic variants, could be added.

For all tested samples (46 individuals belonging to the 33 pedigrees), median coverage in the whole capture region was 54.90 ± 11.26 (mean 60x) with more than 96% of the targeted bases covered by 10 or more reads. Equivalent coverage results were observed when looking only at the IRD genes (based on RetNet[25]). We designed systematic filtering steps for the selection and prioritization of variants, within the framework proposed by ACMG/AMP standards and guidelines for evaluating pathogenicity. Only 5 cases remained undiagnosed because no clear disease-causing candidate was(were) identified.

Overall, the results of the WES analysis globally revealed a mean of 43597 variants in the whole exome per individual, of which 958 were located in known IRD genes. In several families, patients were carriers of additional IRD-pathogenic recessive mutations in heterozygosis, which could certainly add to the phenotypic severity and variability.

Detailed genotype analysis

The results of WES are shown in Table 1. Concerning the syndromic cases, only one pedigree (79ORG), affected by Usher, had a correct clinical diagnosis. The two other pedigrees, previously diagnosed as non-syndromic IRD cases, turned out to be syndromic after WES-mediated identification of the causative genes and mutations. A young patient (simplex case, 64ORG) carried two mutations in the *PHYH* gene, encoding a peroxisomal enzyme associated to the Refsum syndrome. Retinitis Pigmentosa (RP) is an early-onset symptom of this syndrome followed later on by other pathological traits (e.g. deafness, skin alterations, peripheral neuropathy and ataxia). One allele was a frameshift mutation leading to protein truncation, and the second allele (P223R) caused a damaging missense substitution in a conserved residue embedded in a highly evolutionarily conserved PhyH domain (S1 Fig). Clinical and metabolic re-evaluation of the pre-symptomatic patient (phytanic acid levels in serum measured by gas chromatography were 32 times the normal threshold values) totally confirmed the Refsum syndrome diagnosis, which had been previously unnoticed, and allowed to implement a preventive treatment for late-onset Refsum disorder traits, by decreasing the ingestion of phytanic acid. According to the clinician, the patient has since greatly improved in some phenotypic traits, mainly reducing the ichthyosis bursts and the anosmia. Similarly, two novel mutations in the *C21orf2* gene, a frameshift and a damaging missense substitution in a highly conserved position within the leucine-rich repeats (S1 Fig), re-classified a non-syndromic cone-rod dystrophy to the recently reported spondylometaphyseal dysplasia syndrome (SMD), where RP is associated to severe thoracic abnormalities. Patients in this family (A10) showed both RP and skeletal dysplasia, initially considered as unlinked traits. Again, our results prompted clinical re-evaluation, and supported *C21orf2* association to this syndrome[26].

With respect non-syndromic cases, WES identified the causative mutations in IRD reported genes in 21 cases/families (Table 1). Mild mutations in syndromic genes have already been reported as causative for non-syndromic phenotypes. This is also the case in our cohort for mutations in *BBS2* (pedigree A18), *CEP290* (pedigree 65ORG) and *USH2A* (51ORG and 73ORG). The *BBS2* and *CEP290* mutations are novel, contrary to those of *USH2A*. Mutations in *CEP290* are associated to severe ciliopathies, except for a prevalent intronic mutation that affects the splicing pattern and decreases the pool of full-length molecules. Remarkably, the two mutations here identified in heterozygosis expand the panoply of non-syndromic *CEP290* mutations. Since one allele is null (Table 1), the missense substitution H50Y, residing in a non-strictly conserved peptide stretch within the homo/heterodimerization domain, should be relatively mild (S1 Fig).

Table 1. Disease-causing mutations and presumptive pathogenic variants identified by WES in our cohort of IRD patients.

Family	Disease	Gene	Mutation	Zygo- sity	Co-seg- regation available	Polyphen2		SIFT		MutationTaster		CADD	Allele frequency	Reported	ACMG classi- fication		
						Effect	Score	Effect	Score	Effect	Score					ExAC	
A) Syndromic Causative Genes																	
A10	axial SMD	C21orf2	c.286G>A p.E96K	Het	Yes	Probably D.	1	Tolerated	NA	Disease C.	1	36	Not present	Novel	Likely P.		
			c.631_632del p.R211Hfs*46	Het		-	-	Disease C.	1	-	-	Disease C.	1	-	Not present	Novel	Pathog.
			c.668C>G p.P223R	Het	Yes	Probably D.	1	Tolerated	0.06	-	-	Disease C.	1	22.7	Not present	Novel	Likely P.
640RG	ar/Retsum	PHYH	c.663dupG p.V229Sfs*2	Het		-	-	-	-	Disease C.	1	-	2/121412*	[27]	Pathog.		
			c.2299delG p.E787Sfs*21	Het	Yes	-	-	-	-	-	-	-	-	96/121284	[28]	Pathog.	
790RG	ar/USH	USH2A	c.9119G>A p.W3040*	Het		-	-	Tolerated	1	Disease C.	1	52	Not present	[29]	Pathog.		
B) Non-syndromic Causative Genes																	
770RG	ar/CD	ABCA4	c.3386G>T p.R1129L	Het	Yes	Probably D.	0.961	Damaging	0	Disease C.	1	28.01	30/121388*	[30]	Likely P.		
			c.4539+2064C>T	Het		-	-	-	-	-	Polymorphism	0	-	-	Not Covered	[31]	VUS
A18	ar/PP	BES2	c.3341>C p.F112L	Hom	Yes	Probably D.	1	Damaging	0.01	Disease C.	1	28.8	1/121022*	Novel	VUS		
550RG	ar/CD	C2orf71	c.1067_1068del p.N356Rfs*101	Hom	No	-	-	-	-	Disease C.	1	-	Not present	Novel	Pathog.		
650RG	ar/LCA	CEP290	c.148C>T p.H50Y	Het	No	Possibly D.	0.952	Damaging	0.05	Disease C.	1	25	Not present	Novel	VUS		
			c.1322T>A p.L441*	Het		-	-	-	-	-	Disease C.	1	41	Not present	Novel	Pathog.	
670RG	ar/PP	CERKL	c.613+5_613+6del	Hom	Yes	-	-	-	-	Disease C.	1	-	Not present	Novel	VUS		
750RG	ar/Ahr	CNG43	c.1768G>A p.E590K	Hom	Yes	Probably D.	0.954	Damaging	0.05	Disease C.	1	22.8	1/121004*	[32]	VUS		
800RG	ar/PP	CNGB1	c.2762_2765delACGA p.Y921Cfs*15	Hom	Yes	-	-	-	-	-	-	-	Not present	Novel	Pathog.		
710RG	ar/Ahr	CNGB3	c.1148delC p.T383Ifs*13	Hom	Yes	-	-	-	-	Disease C.	1	-	224/120952*	[33]	Pathog.		
			c.2688T>A p.C896*	Het	No	-	-	-	-	-	Disease C.	1	23.2	2/121386*	[34]	Pathog.	
20RG	ar/PP	CRB1	c.2842T>C p.C948R	Het		Probably D.	0.996	Damaging	0	Disease C.	1	15.2	Not present	Novel	Likely P.		
10NCE	ad/PP	CRX	Deletion exons 3-4	Het	Yes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Pathog.		
680RG	ar/PP	EYS	c.2380C>T p.R794*	Het	Yes	-	-	-	-	Disease C.	1	37	1/19764*	Novel	Pathog.		
580RG	ar/LCA	GLUCY2D	Deletion 10 initial exons	Het		-	-	-	-	-	-	-	-	-	Pathog.		
			c.914delA p.H305Pfs*90	Hom	Yes	-	-	-	-	-	Disease C.	1	-	Not present	Novel	Pathog.	
690RG	ar/GF	NRL	c.339C>G p.Y113*	Hom	Yes	-	-	-	-	Disease C.	1	-	Not present	Novel	Pathog.		
810RG	ad/OA	OPA1	c.800_801delAA p.K267Rfs*4	Het	Yes	-	-	-	-	Disease C.	1	37	Not present	Novel	Pathog.		
E4	ad/PP	PRPF31	Partial deletion & duplication	Het	Yes ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Pathog.		
			c.762_777delinsCA p.T255Rfs*23	Hom	Yes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Not present	Novel	Pathog.
820RG	ad/PP	UNC119	c.7delG p.V3*	Het	No	-	-	-	-	-	-	-	Not present	Novel	Likely P.		
510RG	ar/PP	USH2A	c.1724G>A p.C575Y	Het	Yes	Probably D.	1	Damaging	0	Disease C.	1	16.57	1/121370*	[35]	Likely P.		
			c.2276G>T p.C759F	Het		Probably D.	0.999	Damaging	0	-	Disease C.	1	23.1	95/121178*	[36]	Likely P.	
730RG	ar/PP	USH2A	c.2276G>T p.C759F	Het	Yes	Probably D.	0.999	Damaging	0	Disease C.	1	23.1	95/121178*	[36]	Likely P.		
			c.13010C>T p.T4337M	Het		Probably D.	0.986	Damaging	0	-	Disease C.	1	24.8	Not present	[37]	Likely P.	
C) Uncertain cases																	
220RG	RP	CNGB3	c.1672G>T p.G558C	Het	Yes ²	Probably D.	1	Damaging	0	Disease C.	1	26.8	4/119080*	[33]	VUS		
			c.1702C>T p.H568Y	Het		Probably D.	0.997	Tolerated	1	-	Disease C.	1	16.43	Not present	[38]	VUS	
390RG	RP	FOXI1	c.668G>A p.R223Q	Het	Yes ²	Probably D.	0.999	Tolerated	0.09	Disease C.	1	36	17/121408*	Novel ³	VUS		
			c.928-9_940dup p.Y314Cfs*50	Het		-	-	-	-	-	-	-	-	Not present	[39]	Pathog.	
			c.1246G>T p.A416S	Het		Probably D.	0.998	Tolerated	0.1	-	Disease C.	1	24.5	1/17396*	Novel	VUS	
D) New Candidates / New phenotypes for reported syndromic genes																	
A3	ar/PP	CEP250	c.1826C>T p.A609V	Hom	Yes	Probably D.	NA	Damaging	NA	Neutral	NA	20.6	33/121314*	Novel	Likely P.		
			CEP78	ar/PP	c.1056delT p.T353Lfs*5	Hom	Yes	-	-	-	Disease C.	1	-	Not present	Novel	VUS	
620RG	ar/PP	SCLT1	c.778-2A>T	Het	Yes	-	-	-	-	Disease C.	1	19.45	Not present	Novel	Pathog.		
			c.827G>A p.R276H	Het		Probably D.	0.998	-	-	-	Disease C.	1	20.6	3/121324*	Novel	VUS	

(Continued)

Table 1. (Continued)

Family	Disease	Gene	Mutation	Zygo- sity	Cosegre- gation available	Computational prediction						Reported	ACMG classi- fication			
						Polyphen2		SIFT		MutationTaster				CADD		Allele frequency
						Effect	Score	Effect	Score	Effect	Score	Effect	Score			
66ORG	arCRD	SEMA6B	c.493G>A;p.G165R	Hom	Yes	Possibly D.	0.814	Damaging	0.03	Disease C.	0.995	14.13	14.13	1/118664*	Novel	VGUS

Phenotype, inheritance mode], causative gene and mutation, zygosity, co-segregation analysis, *in silico* pathogenicity predictions, allelic frequency in control population and ACMG classification of variants are indicated per each family. 1: Two different mutations segregate in the pedigree; 2: Assuming incomplete penetrance of the mutation; 3 Mutation p. R223W has been previously reported in a dominant patient (Xu et al 2014);

*All individuals carried the variant in heterozygosity;
One individual carries the variant in homozygous state.
GF: Goldmann-Favre; SMD: Spondylometaphyseal Dysplasia; D: Damaging; Disease C: Disease Causing; NA:no available. PATH: pathogenic; VUS: Variant of uncertain significance.; VGUS: Clearly disruptive variant in a gene of uncertain significance
Families with secure genetic diagnosis are highlighted in bold.

doi:10.1371/journal.pone.0168966.t001

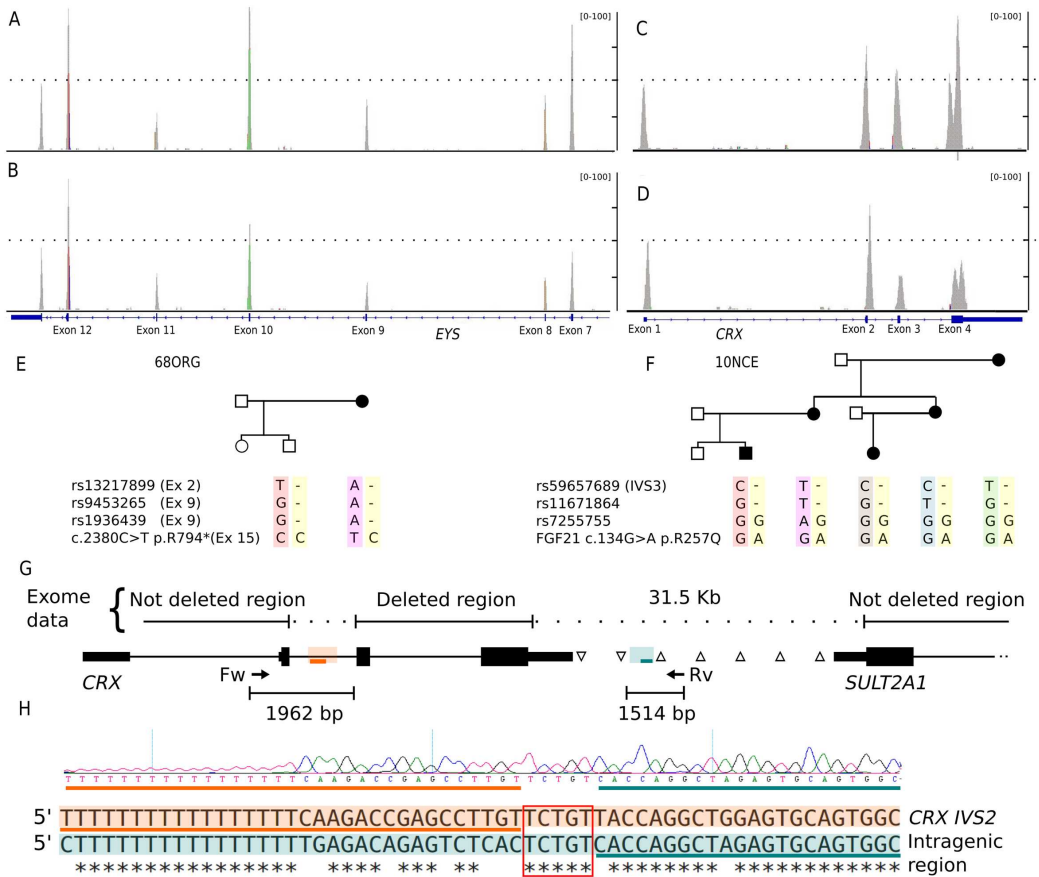


Fig 2. Identification of *EYS* and *CRX* deletions. A-F) Two different gross heterozygous deletions in genes *EYS* and *CRX* were respectively identified as the causative mutation in families 68ORG and 10NCE. The probands (B and D) showed a reduction in the coverage of some exons compared to the respective controls (A and C). The segregation of SNPs located in the expected deleted region showing that mother and child were homozygous for different alleles is indicated below. (E and F). G) Chromosomal deletion in family 10NCE is defined by genotyping common SNPs between *CRX* and *SULT2A1* genes in the affected probands. Heterozygous SNPs are indicated by Δ , whereas SNPs where mother and child were homozygous for different alleles are indicated by ∇ . Adjacent breakpoint regions with high sequence similarity are boxed in orange and green and preserved sequences in the rearranged allele are indicated with orange and green lines. H) Sequence chromatogram of the rearranged allele is shown below. Alignment of the highly similar sequences of *CRX* intron 2 (*CRX* IVS2) and the intragenic region involved in the rearrangement is also indicated. Again, orange and green lines are the adjacent sequences to the breakpoint, which is indicated by a red square.

doi:10.1371/journal.pone.0168966.g002

Large deletions and chromosomal rearrangements were identified by WES in three families. In the arRP 68ORG family, a single nonsense pathogenic allele in the *EYS* gene was first identified. A careful coverage analysis along all the *EYS* exons unveiled a novel deletion encompassing the initial 10 exons as a second allele. This deletion was confirmed by homozygous SNP haplotype in the affected mother and carrier son (Fig 2). In two very large dominant pedigrees, WES did not render any plausible candidate. In family 10NCE, a very rare and mild polymorphism mapping in a gene adjacent to *CRX*, cosegregated with the disease. A careful coverage

analysis of *CRX* in the patients identified a heterozygous deletion encompassing exons 3 and 4 (Fig 2), which was finely mapped by genomic DNA PCR and Sanger sequencing. The flanking regions shared high sequence similarity probably account for illegitimate homologous recombination. This result prompted us to re-evaluate the WES coverage data in all dominant unsolved pedigrees. Remarkably, the large E4 pedigree showed an unusual chromosomal rearrangement (Fig 3), since one side of the family showed increased exon coverage in the *PRPF31* gene, whereas the other side of the family showed a decrease. To confirm and map the exons involved, a complete *PRPF31* MLPA analysis was performed and two rearranged pathogenic alleles segregating in the same family were identified: an internal duplication affecting exons 2 to 5 (inclusive) and a gross deletion involving exon 1 to 13 of *PRPF31*. Since WES coverage in the upstream genes was also decreased, this deletion could include nearby genes, at least *TFPT*, *NDUFA3*, and a part of *OSCAR*.

New candidates

When no pathogenic variants were identified in IRD genes, we expanded the mutational search to all the WES data. Following the ACMG/AMP guidelines, four novel recessive candidates were proposed based on the mutational effect at the molecular level, the predicted *in silico* pathogenicity and the assigned gene function. These four candidates are *SEMA6B* and three members of the centrosomal/ciliary protein family *CEP78*, *CEP250*, *SCLT1*. In all these cases, the clinical assessment of the patients was only RP (S2 Fig).

SEMA6B, mutated in homozygosis in a simplex case, is highly expressed in the development of the murine retina and belongs to a family of transmembrane proteins with multiple roles in signalling and axon guidance[40,41]. The G165R missense variant is located within the semaphorin domain, close to the plexin binding sites. This substitution changes the size and charge of a conserved amino acid in vertebrates (S1 Fig), and is predicted *in silico* as pathogenic (Table 1). Moreover, the mutation strictly cosegregates with the disease in the family (Fig 1).

CEP78 encodes a centrosomal protein of unknown function. Our rationale behind proposing this gene as probably causative of arRP is: i) affected individuals are homozygous for the mutation, which causes a frameshift that generates a truncated protein, ii) mutations on several centrosomal protein genes cause IRD, and finally, iii) cosegregation with the disease in the family (Fig 1).

SCLT1 was also proposed to be causative of early-onset RP since: i) this gene causes orofacial-digital syndrome type IX, a very rare and severe ciliopathy with congenital eye defects; ii) patients are heterozygotes for one missense and one splicing altering mutations; and indeed iii) the variants cosegregate with the disease in the family (Fig 1). The missense mutation, R276H, alters a relevant residue in the Smc multidomain (chromosome segregation ATPase domain) shared with many other proteins, many of them centrosomal, involved in cell cycle control[42]. Therefore, we here describe a new phenotype for a previously reported ciliopathy gene.

Concerning *CEP250*, previously associated to atypical Usher syndrome, the homozygous missense A609V is a seemingly mild amino acid substitution embedded in a long evolutionarily conserved stretch of the Smc domain. Its presumed pathogenicity was based on *in silico* prediction algorithms and cosegregation with the disease. However, since this substitution only affected size but not the charge or other chemical properties of the amino acid, we decided to test *CEP250* expression in the retina, and assay the phenotypic effects of the mutation. Endogenous *CEP250* in mouse retinal cryosections (P60) was mostly detected in the outer photoreceptor segment (Fig 4A), supporting its localization in the photoreceptor axoneme (Fig 4B). Other centrosomal proteins that cause IRD, such as *OFD1*, share a similar

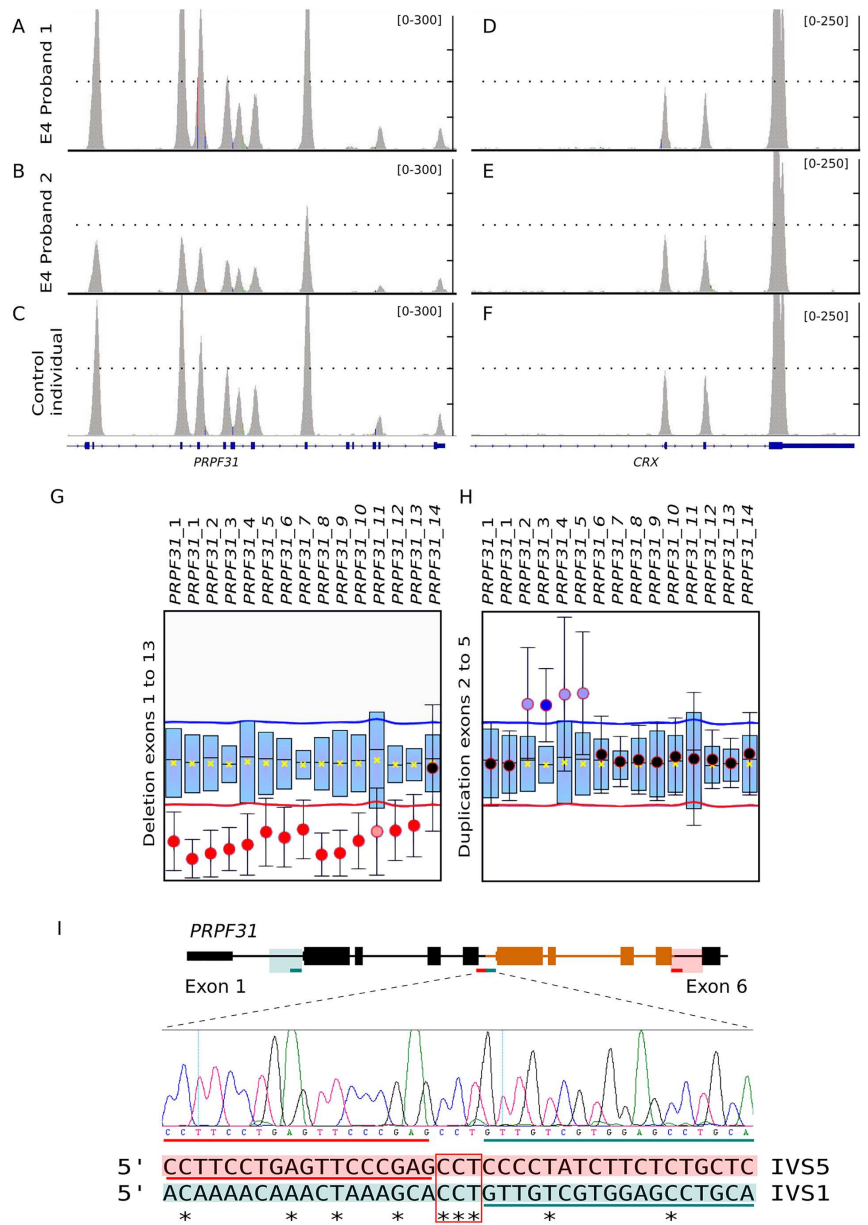


Fig 3. Identification of independent *PRPF31* deletion and duplication segregating in pedigree E4. Exome data indicated significant coverage differences of *PRPF31* exons in the E4 family, pointing to chromosomal rearrangements. Some patients (A) showed higher coverage in exons 2–5 compared to a control sample (C) whereas patients from another family branch showed a significant decrease of exons 1–13 (B). *CRX*, located a few Mb away from *PRPF31* gene, was used as a control gene (D–F). MLPA analysis confirmed a nearly full deletion of *PRPF31* (exons 1 to 13) in some patients of the family (G) and an internal duplication involving exons 2 to 5 in other affected members (H) (shown in grey in Fig 1). I) Chromosomal region of *PRPF31* involved in the duplication, where the duplicated exons are coloured in orange. Green and red lines below indicate the extent of the duplication. Chromatogram of the rearranged allele is shown below. Alignment of the flanking sequences (boxed in orange and

green) involved in the rearrangement shows no clear homology. Orange and green lines are the adjacent sequences to the breakpoint, which is indicated by a red square.

doi:10.1371/journal.pone.0168966.g003

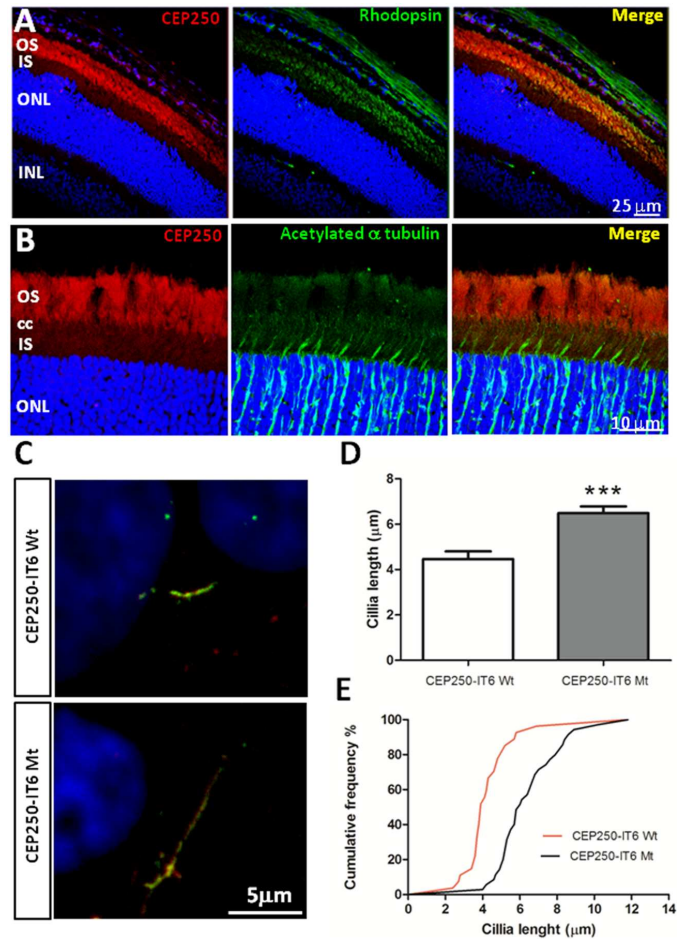


Fig 4. Immunodetection of endogenous CEP250 in mouse retinal cryosections. Immunostaining of CEP250 with rod photoreceptor marker rhodopsin (A) and acetylated α -tubulin (B). CEP250 stained mainly the outer segment of photoreceptors (CEP250 is in red, Rhodopsin and acetylated- α -tubulin in green, nuclear counterstaining by DAPI in blue). **Cells expressing A609V CEP250-IT6 show longer cilia.** (C) Wild-type (Wt) and mutant (Mt) CEP250-IT6 (green) co-localize with acetylated α -tubulin (red) to primary cilia in serum-starved ARPE-19 cells. Immunolabelling of CEP250 and acetylated α -tubulin show longer cilia in cells transfected with the mutant A609V CEP250-IT6 compared to Wt-CEP250-IT6. (D) Cilia length quantification in Wt- and Mt- CEP250-IT6 transfected cells. Graph shows that cilia from cells expressing mutant CEP250 were one third longer than cilia from cells expressing Wt-CEP250 ($n > 30$). Mean and error are shown. *** indicates high statistical significance by the t-Student test, $p < 0.001$. (E) Distribution of cilium length represented as a cumulative frequency chart of the percentage of total cilia. OS—photoreceptor outer segments; CC—connecting cilium; IS—photoreceptor inner segments; ONL—outer nuclear layer; INL—inner nuclear layer; GCL—ganglion cell layer.

doi:10.1371/journal.pone.0168966.g004

localization pattern in the retina[43]. Furthermore, localization of the wild-type and A609V CEP250 proteins was studied in transfected human ARPE19 cells where cilia formation was promoted after serum-starvation. To avoid steric hindrance we used a new epitope specifically designed for innocuous protein tagging (IT6, Antibody BCN). The endogenous CEP250 expression was not silenced, but the use of the IT6 antibody allowed us to identify transfected cells. Remarkably, cells expressing the A609V CEP250 (Mt-CEP250) protein consistently showed elongated primary cilia compared to Wt-CEP250 transfected cells (Fig 4C). Cilium length was measured and quantified. On average, Mt-CEP250 cilia were one third longer than the wild-type counterparts, with high statistical significance (Fig 4D and 4E). Overall, our results support involvement of CEP250 in retinal ciliogenesis, and highlight this gene as a new IRD candidate.

In many patients, besides the causative variants, additional rare variants, predicted as damaging by at least two *in silico* algorithms, were identified in known IRD genes. These variants were mostly unreported in the Human Gene Mutation Database[44]. We did not consider them as causative on the grounds of heterozygosity in recessive probands, lack of cosegregation in dominant cases, relative frequency of homozygotes in the reported normal population (ExAC), and because of the identification of two mutations in a more plausible pathogenic candidate in the proband. We deem these variants (S1 Table) are likely modifiers of the phenotypic traits of the patients.

Discussion

The WES analysis (mean coverage around 60x) of our cohort of 33 unrelated families has identified the causative gene in 18 cases and proposed a plausible candidate in 10 additional cases. Only five cases (15%) remained unsolved. Overall, we have identified 21 unreported mutations in known IRD genes and additionally proposed four novel candidates, *CEP250*, *CEP78*, *SEMA6B* and *SCLT1*. Functional support for the pathogenicity of the homozygous A609V missense mutation in *CEP250* is also provided. Our prioritized analysis of WES is very efficient and comparable to other NGS-based methods, such as NGS-customized targeted sequencing [45]. However, syndromic genes which would be rarely included in gene panels can be easily analyzed. Besides, when no mutations in the prioritized genes are found, the search for pathogenic variants in new candidates can be performed using the same data by changing the search parameters. This new search can: 1) highlight presymptomatic patients of severe late-onset disorders, 2) uncover new phenotype-genotype associations in milder alleles of syndromic genes, 3) propose new IRD candidates.

Concerning clinical re-evaluation, pathogenic variants in *PHYH* (a syndromic gene usually absent in customized targeted panels) were identified in patient 64ORG, which questioned the initial diagnosis of RP, informing the clinician and the patient of the disease before other Refsum syndrome traits appeared and most importantly, leading to a preventive treatment. In family A10, the mutations in *C21orf2* also changed the initial CRD diagnosis to axial spondylo-metaphyseal dysplasia, associating RP to previously unrelated skeletal traits. Besides, WES also uncovered new mutations in very low prevalence genes, not usually included in targeted panels, e.g. *UNC119*, in our cohort [11,46,47].

The ever increasing number of novel mutations—even in previously reported genes—highlighted by massive sequencing is changing the scenario of established genotype-phenotype correlations and patterns of mendelian inheritance[48] and calls for an in-depth re-evaluation of our genetic knowledge[49]. Double heterozygosity of private mutations may be more frequent than expected in recessive cases of “rare-but-not-so-rare” diseases (prevalence 1:3000), barring the cases of highly consanguineous populations, where homozygosity mapping has

been the basic genetic tool. On the other hand and concerning dominant cases, two previously reported dominant mutations affected a single member of the family in contrast to a larger number of asymptomatic carriers. These contradictory results might be explained by either misassignment of the pathogenicity of the genetic variant or incomplete gene screening in past reports.

We have identified several pathogenic duplications and deletions of large chromosomal regions in already reported genes in two dominant (affecting *CRX* and *PRPF31*) and in one recessive pedigree (altering *EYS*). Remarkably, in the E4 dominant pedigree (Fig 1), both a deletion and a duplication in *PRPF31* were identified in two branches of the same family. *PRPF31* pathogenic alleles due to internal deletions/duplications are not infrequent and amount up to 20% [50]. The remarkable finding is that two of such highly disruptive chromosomal rearrangements segregated in two branches of the same family. The rearranged genomic regions differed in size, involved different exons, and did not share any apparent flanking sequence, which would suggest independent genetic events (Fig 3). These structural mutations are still difficult to identify in heterozygosis unless specific dosage analysis tests or careful evaluation of coverage are performed. However, our results strongly support the relevant contribution of structural variation to disease (50% of our dominant cases). We deem it likely that the list of pathogenic alleles involving chromosomal rearrangements will increase in the following years.

Four new candidates for non-syndromic IRD were also highlighted by WES. Remarkably, three of them are related to cilia and ciliogenesis (*SCLT1*, *CEP250* and *CEP78*). Severe gene mutations involved in ciliogenesis are either lethal or cause severe syndromic ciliopathies, whereas milder alleles show a more restricted phenotype and affect only particular ciliated organs (retina, cochlea, renal tubules. . .)[51], e.g. *CEP290* cause Leber Congenital Amaurosis [52], and *OFD1* is responsible for severe X-linked RP[53] as well as oro-facial-digital syndrome I, characterized by craniofacial, oral and skeletal abnormalities[54] or other syndromic diseases[55]. We have identified a mild missense substitution and a mutation in the consensus acceptor splicing site (intron 10) of *SCLT1*, another member of the oro-facial-digital syndrome gene family[56]. These previous reports highlight *SCLT1* as a new arRP candidate, and illustrate the tenuous line between genes involved in syndromic and non-syndromic disorders.

Our WES results further support the involvement of two CEP proteins in IRD. A homozygous frameshift mutation in *CEP78* in two siblings of a consanguineous family pointed directly to this gene as a plausible new candidate for arRP. Concerning *CEP250* involvement in retinal neurodegeneration, previous reports described a close interaction with *NEK2* (a centrosomal RP gene)[57,58], and it was also suggested as a modifier gene in an atypical Usher syndrome family where nonsense mutations in *CEP250* in homozygosis and in *C2orf71* in heterozygosis showed an additive effect[59]. Our results support that a homozygous missense mutation in *CEP250* may cause arRP by altering the structure and length of cilia. Of note, in this family another arRP mutation segregated in heterozygosis, the reported C948Y *CRB1* mutation (frequent in the Spanish population[60,61]), which could also contribute to the severity of the phenotype.

WES data allows the identification of the causative mutations plus incidental findings in other relevant retinal genes. When focusing solely on IRD genes, many patients are heterozygous carriers of both, known pathogenic recessive alleles (average of 0.3 mutations per patient), and rare predicted pathogenic variants (average of 5.25 variants per patient). Similar values of heterozygous carriers of pathogenic variants in IRD genes have been identified in control individuals (1:4) after NGS-analysis[62]. Most of these recessive alleles correspond to

prevalent mutations in the geographical population of origin and thus, heterozygous carriers should be expected among controls. Therefore, databases of human genetic variation of healthy individuals used as controls for new pathogenic variants may in fact contain true mutations. Indeed, caution should be recommended in genetic diagnosis to avoid misinterpretation of these findings. On the other hand, when drawing genotype-phenotype correlations in relation with the clinical prognosis, these additional recessive genetic variants might act as hypomorphic alleles that induce or enhance the phenotypic effects of the causative mutations, accounting for the phenotypic differences within carriers of the same mutations. For instance, the 22ORG pedigree showed heterozygous variants in *CRB1* and *ROM1* besides the reported dominant mutation in *CNGB3*. The patient bears the *CNGB3* mutation together with the *ROM1* mutation, whereas the non-penetrant sibling only carries the *CNGB3* mutation (Fig 1). Similarly, the patient in family 39ORG carried a heterozygous mutation in *USH2A* additionally to the previously reported dominant mutation in *PDE6B*, in contrast to several non-penetrant members of the family who only carried the *PDE6B* pathogenic variant. Therefore, the definition of modifier or susceptibility genes may be widened to include heterozygous mutations in already known causative genes, which probably underlie reduced penetrance and variable expressivity, and calls for reconsideration of the concepts of causative, susceptibility and modifier genes.

Overall, our work supports WES as a highly informative and effective approach for patient molecular diagnosis in retinal dystrophies provided there is qualified genetic counselling. Besides, our data contributes to the databases that aim to address personalized genotype-phenotype correlations. Genomic data from carefully clinically diagnosed patients are required to build a comprehensive human genomic landscape and elucidate how the interactions and complex tradeoffs between mutations, additional genetic variants—and environmental factors—tip the scales towards pathogenicity or resilience to disease.

Supporting Information

S1 Fig. Conservation of missense mutations. Clustalw alignment of protein sequences of different species: Human, Macaque, Rabbit, Mouse, Opossum, Chicken, *X. tropicalis*, Stickleback, Zebrafish, *D. melanogaster* and *C. elegans* (when available) are shown. The position of the mutated amino acid is highlighted with a red box.

(PDF)

S2 Fig. Fundus eye photographs. Right and left fundus eye images are shown from affected members of families A3 (A and B), 62ORG (C and D) and 56ORG (E and F) with mutations in *CEP250*, *SCLT1* and *CEP78*, respectively. All these patients have been diagnosed with Retinitis Pigmentosa.

(PDF)

S3 Fig. Cosegregation analysis of the mutations identified by WES in our cohort (complementary to Fig 1). Probands sequenced by WES are indicated with an asterisk (*).

(PDF)

S1 Table. Summary of exome data per sample. For each sample, total coverage as well as data restricted to IRD genes is shown. For IRD genes, the number of known heterozygous recessive mutations (excluding the causative mutations in the family) and the number of unreported heterozygous variants predicted as pathogenic at least by two different algorithms, are indicated. C10 and C30 are the percentage of bases with a minimum coverage of 10x and 30x, respectively.

(XLS)

S2 Table. Criteria used to classify pathogenic variants according ACMG guidelines.
(XLS)

Acknowledgments

We gratefully acknowledge all patients and their relatives for their enthusiastic participation, particularly A3 and E4 families. We acknowledge Jarek Hernecki for the recruitment of patients and his valuable contribution in the clinical diagnosis. We also thank Jordi Andilla and Pablo Loza (Institut de Ciències Fotòniques, ICFO) for their valuable advice and collaboration in obtaining high quality confocal images.

Author Contributions

Conceptualization: MdC-M RT BC GM RG-D.

Data curation: MdC-M RT.

Formal analysis: MdC-M PE-F RA GM RG-D.

Funding acquisition: GM RG-D.

Investigation: MdC-M RT PE-F RA AM-L JC MC DAH JJR-E JF JJP-S.

Methodology: MdC-M RT BC.

Project administration: RG-D.

Resources: BC GM RG-D.

Software: MdC-M RT.

Supervision: BC GM RG-D.

Validation: MdC-M PE-F RA DAH JJR-E JF JJP-S.

Visualization: MdC-M PE-F RA JC DAH JJP-S.

Writing – original draft: MdC-M GM RG-D.

Writing – review & editing: MdC-M RT PE-F RA AM-L JC MC DAH JJR-E JF JJP-S BC GM RG-D.

References

1. Marfany G, González-Duarte R. Clinical applications of high-throughput genetic diagnosis in retinal dystrophies: present challenges and future directions. *World J Med Genet.* 2015; 5: 14–22.
2. Ratnapriya R, Swaroop A. Genetic architecture of retinal and macular degenerative diseases: the promise and challenges of next-generation sequencing. *Genome Med.* 2013; 5: 84. doi: [10.1186/gm488](https://doi.org/10.1186/gm488) PMID: [24112618](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24112618/)
3. Lee K, Berg JS, Milko L, Crooks K, Lu M, Bizon C, et al. High Diagnostic Yield of Whole Exome Sequencing in Participants With Retinal Dystrophies in a Clinical Ophthalmology Setting. *Am J Ophthalmol.* 2015; 160: 354–363.e9. doi: [10.1016/j.ajo.2015.04.026](https://doi.org/10.1016/j.ajo.2015.04.026) PMID: [25910913](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25910913/)
4. Tiwari A, Bahr A, Bähr L, Fleischhauer J, Zinkernagel MS, Winkler N, et al. Next generation sequencing based identification of disease-associated mutations in Swiss patients with retinal dystrophies. *Sci Rep.* 2016; 6: 28755. doi: [10.1038/srep28755](https://doi.org/10.1038/srep28755) PMID: [27353947](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27353947/)
5. Abu-Safieh L, Alrashed M, Anazi S, Alkuraya H, Khan AO, Al-Owaini M, et al. Autozygome-guided exome sequencing in retinal dystrophy patients reveals pathogenetic mutations and novel candidate disease genes. *Genome Res.* 2013; 23: 236–47. doi: [10.1101/gr.144105.112](https://doi.org/10.1101/gr.144105.112) PMID: [23105016](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23105016/)

6. Littink KW, den Hollander AI, Cremers FPM, Collin RWJ. The power of homozygosity mapping: discovery of new genetic defects in patients with retinal dystrophy. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 723: 345–51. doi: [10.1007/978-1-4614-0631-0_45](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0631-0_45) PMID: [22183352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22183352/)
7. Coppieters F, Van Schil K, Bauwens M, Verdin H, De Jaegher A, Syx D, et al. Identity-by-descent-guided mutation analysis and exome sequencing in consanguineous families reveals unusual clinical and molecular findings in retinal dystrophy. *Genet Med.* 2014; 16: 671–80. doi: [10.1038/gim.2014.24](https://doi.org/10.1038/gim.2014.24) PMID: [24625443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24625443/)
8. Abu Safieh L, Aldahmesh MA, Shamseldin H, Hashem M, Shaheen R, Alkuraya H, et al. Clinical and molecular characterisation of Bardet-Biedl syndrome in consanguineous populations: the power of homozygosity mapping. *J Med Genet.* 2010; 47: 236–41. doi: [10.1136/jmg.2009.070755](https://doi.org/10.1136/jmg.2009.070755) PMID: [19858128](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19858128/)
9. Fernandez-San Jose P, Corton M, Blanco-Kelly F, Avila-Fernández A, Lopez-Martinez MA, Sanchez-Navarro I, et al. Targeted Next-Generation Sequencing Improves the Diagnosis of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa in Spanish Patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015; 56: 2173–82. doi: [10.1167/iovs.14-16178](https://doi.org/10.1167/iovs.14-16178) PMID: [25698705](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25698705/)
10. Ge Z, Bowles K, Goetz K, Scholl HPN, Wang F, Wang X, et al. NGS-based Molecular diagnosis of 105 eyeGENE[®] probands with Retinitis Pigmentosa. *Sci Rep.* 2015; 5: 18287. doi: [10.1038/srep18287](https://doi.org/10.1038/srep18287) PMID: [26667666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26667666/)
11. Glöckle N, Kohl S, Mohr J, Scheurenbrand T, Sprecher A, Weisschuh N, et al. Panel-based next generation sequencing as a reliable and efficient technique to detect mutations in unselected patients with retinal dystrophies. *Eur J Hum Genet.* 2013; 1–6.
12. Saudi Mendeliome Group. Comprehensive gene panels provide advantages over clinical exome sequencing for Mendelian diseases. *Genome Biol.* 2015; 16: 134. doi: [10.1186/s13059-015-0693-2](https://doi.org/10.1186/s13059-015-0693-2) PMID: [26112015](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26112015/)
13. Ellingford JM, Barton S, Bhaskar S, Williams SG, Sergouniotis PI, O'Sullivan J, et al. Whole Genome Sequencing Increases Molecular Diagnostic Yield Compared with Current Diagnostic Testing for Inherited Retinal Disease. *Ophthalmology.* Elsevier; 2016;
14. Beryozkin A, Shevah E, Kimchi A, Mizrahi-Meissonnier L, Khateb S, Ratnapriya R, et al. Whole Exome Sequencing Reveals Mutations in Known Retinal Disease Genes in 33 out of 68 Israeli Families with Inherited Retinopathies. *Sci Rep.* 2015; 5: 13187. doi: [10.1038/srep13187](https://doi.org/10.1038/srep13187) PMID: [26306921](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26306921/)
15. Metzger J, Karwath M, Tonda R, Beltran S, Águeda L, Gut M, et al. Runs of homozygosity reveal signatures of positive selection for reproduction traits in breed and non-breed horses. 2015;
16. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* 2010; 26: 841–2. doi: [10.1093/bioinformatics/btq033](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033) PMID: [20110278](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20110278/)
17. Exome Aggregation Consortium (ExAC), Cambridge, MA [Internet]. [cited 1 Jun 2016]. <http://exac.broadinstitute.org>
18. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* Nature Publishing Group; 2014; 11: 361–2.
19. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* 2001; 11: 863–74. doi: [10.1101/gr.176601](https://doi.org/10.1101/gr.176601) PMID: [11337480](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11337480/)
20. Adzhubei I a, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* Nature Publishing Group; 2010; 7: 248–9.
21. Kircher M, Witten DM, Jain P, O’Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet.* Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2014; 46: 310–5.
22. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* 2011; 29: 24–6. doi: [10.1038/nbt.1754](https://doi.org/10.1038/nbt.1754) PMID: [21221095](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21221095/)
23. Pairwise Sequence Alignment [Internet]. http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html
24. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* Nature Publishing Group; 2012; 9: 676–682.
25. Retnet [Internet]. <https://sph.uth.edu/retnet/>
26. Wang Z, Iida A, Miyake N, Nishiguchi KM, Fujita K, Nakazawa T, et al. Axial Spondylometaphyseal Dysplasia Is Caused by C21orf2 Mutations. *PLoS One.* 2016; 11: e0150555. doi: [10.1371/journal.pone.0150555](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150555) PMID: [26974433](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26974433/)
27. Jansen GA, Waterham HR, Wanders RJA. Molecular basis of Refsum disease: sequence variations in phytanoyl-CoA hydroxylase (PHYH) and the PTS2 receptor (PEX7). *Hum Mutat.* 2004; 23: 209–18. PMID: [14974078](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14974078/)

28. Eudy JD, Weston MD, Yao S, Hoover DM, Rehm HL, Ma-Edmonds M, et al. Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa. *Science*. 1998; 280: 1753–7. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9624053> PMID: 9624053
29. Dreyer B, Brox V, Tranebjaerg L, Rosenberg T, Sadeghi AM, Möller C, et al. Spectrum of USH2A mutations in Scandinavian patients with Usher syndrome type II. *Hum Mutat*. 2008; 29: 451.
30. Cideciyan A V, Swider M, Aleman TS, Tsybovsky Y, Schwartz SB, Windsor EAM, et al. ABCA4 disease progression and a proposed strategy for gene therapy. *Hum Mol Genet*. 2009; 18: 931–41. doi: [10.1093/hmg/ddn421](https://doi.org/10.1093/hmg/ddn421) PMID: 19074458
31. Zernant J, Xie YA, Ayuso C, Riveiro-Alvarez R, Lopez-Martinez M-A, Simonelli F, et al. Analysis of the ABCA4 genomic locus in Stargardt disease. *Hum Mol Genet*. 2014; 23: 6797–806. doi: [10.1093/hmg/ddu396](https://doi.org/10.1093/hmg/ddu396) PMID: 25082829
32. Nishiguchi KM, Sandberg MA, Gorji N, Berson EL, Dryja TP. Cone cGMP-gated channel mutations and clinical findings in patients with achromatopsia, macular degeneration, and other hereditary cone diseases. *Hum Mutat*. 2005; 25: 248–58. PMID: 15712225
33. Sundin OH, Yang JM, Li Y, Zhu D, Hurd JN, Mitchell TN, et al. Genetic basis of total colourblindness among the Pingelapese islanders. *Nat Genet*. 2000; 25: 289–93. PMID: 10888875
34. Hanein S, Perrault I, Gerber S, Tanguy G, Barbet F, Ducroq D, et al. Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. *Hum Mutat*. 2004; 23: 306–17. PMID: 15024725
35. Bonnet C, Grati M, Marlin S, Levilliers J, Hardelin J-P, Parodi M, et al. Complete exon sequencing of all known Usher syndrome genes greatly improves molecular diagnosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2011; 6: 21. doi: [10.1186/1750-1172-6-21](https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-21) PMID: 21569298
36. Rivolta C, Sweklo EA, Berson EL, Dryja TP. Missense mutation in the USH2A gene: association with recessive retinitis pigmentosa without hearing loss. *Am J Hum Genet*. 2000; 66: 1975–8. doi: [10.1086/302926](https://doi.org/10.1086/302926) PMID: 10775529
37. Aller E, Jaijo T, Beneyto M, Nájera C, Oltra S, Ayuso C, et al. Identification of 14 novel mutations in the long isoform of USH2A in Spanish patients with Usher syndrome type II. *J Med Genet*. 2006; 43: e55. doi: [10.1136/jmg.2006.041764](https://doi.org/10.1136/jmg.2006.041764) PMID: 17085681
38. Corton M, Nishiguchi KM, Avila-Fernández A, Nikopoulos K, Riveiro-Alvarez R, Tatu SD, et al. Exome sequencing of index patients with retinal dystrophies as a tool for molecular diagnosis. *PLoS One*. 2013; 8: e65574. doi: [10.1371/journal.pone.0065574](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065574) PMID: 23940504
39. Manes G, Cheguru P, Majumder A, Bocquet B, Sénéchal A, Artemyev NO, et al. A truncated form of rod photoreceptor PDE6 β -subunit causes autosomal dominant congenital stationary night blindness by interfering with the inhibitory activity of the γ -subunit. *PLoS One*. 2014; 9: e95768. doi: [10.1371/journal.pone.0095768](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095768) PMID: 24760071
40. Andermatt I, Wilson NH, Bergmann T, Mauti O, Gesemann M, Sockanathan S, et al. Semaphorin 6B acts as a receptor in post-crossing commissural axon guidance. *Development*. 2014; 141: 3709–20. doi: [10.1242/dev.112185](https://doi.org/10.1242/dev.112185) PMID: 25209245
41. Matsuoka RL, Sun LO, Katayama K, Yoshida Y, Kolodkin AL. Sema6B, Sema6C, and Sema6D expression and function during mammalian retinal development. *PLoS One*. 2013; 8: e63207. doi: [10.1371/journal.pone.0063207](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063207) PMID: 23646199
42. Conserved Domains [Internet]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>
43. Wang J, Chen X, Wang F, Zhang J, Li P, Li Z, et al. OFD1, as a Ciliary Protein, Exhibits Neuroprotective Function in Photoreceptor Degeneration Models. *PLoS One*. 2016; 11: e0155860. doi: [10.1371/journal.pone.0155860](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155860) PMID: 27196396
44. Stenson PD, Mort M, Ball E V, Shaw K, Phillips A, Cooper DN. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet*. 2014; 133: 1–9. doi: [10.1007/s00439-013-1358-4](https://doi.org/10.1007/s00439-013-1358-4) PMID: 24077912
45. Ellingford JM, Barton S, Bhaskar S, O'Sullivan J, Williams SG, Lamb JA, et al. Molecular findings from 537 individuals with inherited retinal disease. *J Med Genet*. 2016; jmedgenet–2016–103837.
46. Bravo-Gil N, Méndez-Vidal C, Romero-Pérez L, González-del Pozo M, Rodríguez-de la Rúa E, Dopazo J, et al. Improving the management of Inherited Retinal Dystrophies by targeted sequencing of a population-specific gene panel. *Sci Rep*. 2016; 6: 23910. doi: [10.1038/srep23910](https://doi.org/10.1038/srep23910) PMID: 27032803
47. Perez-Carro R, Corton M, Sánchez-Navarro I, Zurita O, Sanchez-Bolivar N, Sánchez-Alcudia R, et al. Panel-based NGS Reveals Novel Pathogenic Mutations in Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa. *Sci Rep*. 2016; 6: 19531. doi: [10.1038/srep19531](https://doi.org/10.1038/srep19531) PMID: 26806561

48. Chen R, Shi L, Hakenberg J, Naughton B, Sklar P, Zhang J, et al. Analysis of 589,306 genomes identifies individuals resilient to severe Mendelian childhood diseases. *Nat Biotechnol.* 2016; 34: 531–538. doi: [10.1038/nbt.3514](https://doi.org/10.1038/nbt.3514) PMID: [27065010](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27065010/)
49. Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, Tyler-Smith C, Kehrer-Sawatzki H. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum Genet.* 2013; 132: 1077–130. doi: [10.1007/s00439-013-1331-2](https://doi.org/10.1007/s00439-013-1331-2) PMID: [23820649](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23820649/)
50. Rose AM, Bhattacharya SS. Variant haploinsufficiency and phenotypic non-penetrance in PRPF31-associated retinitis pigmentosa. *Clin Genet.* 2016; 90: 118–26. doi: [10.1111/cge.12758](https://doi.org/10.1111/cge.12758) PMID: [26853529](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26853529/)
51. Rachel RA, Li T, Swaroop A. Photoreceptor sensory cilia and ciliopathies: focus on CEP290, RPGR and their interacting proteins. *Cilia.* 2012; 1: 22. doi: [10.1186/2046-2530-1-22](https://doi.org/10.1186/2046-2530-1-22) PMID: [23351659](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23351659/)
52. Den Hollander AI, Koeneke RK, Yzer S, Lopez I, Arends ML, Voeseke KEJ, et al. Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet.* 2006; 79: 556–61. doi: [10.1086/507318](https://doi.org/10.1086/507318) PMID: [16909394](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16909394/)
53. Webb TR, Parfitt DA, Gardner JC, Martinez A, Bevilacqua D, Davidson AE, et al. 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; 21: 3647–54. doi: [10.1093/hmg/ddt194](https://doi.org/10.1093/hmg/ddt194) PMID: [22619378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22619378/)
54. Bisschoff IJ, Zeschnigk C, Horn D, Wellek B, Rief A, Wessels M, et al. Novel mutations including deletions of the entire OFD1 gene in 30 families with type 1 orofaciocigital syndrome: a study of the extensive clinical variability. *Hum Mutat.* 2013; 34: 237–47. doi: [10.1002/humu.22224](https://doi.org/10.1002/humu.22224) PMID: [23033313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23033313/)
55. Thauvin-Robinet C, Thomas S, Sinico M, Aral B, Burglen L, Gigot N, et al. *OFD1* mutations in males: phenotypic spectrum and ciliary basal body docking impairment. *Clin Genet.* Blackwell Publishing Ltd; 2013; 84: 86–90.
56. Adly N, Alhashem A, Ammari A, Alkuraya FS. Ciliary genes TBC1D32/C6orf170 and SCLT1 are mutated in patients with OFD type IX. *Hum Mutat.* 2014; 35: 36–40. doi: [10.1002/humu.22477](https://doi.org/10.1002/humu.22477) PMID: [24285566](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24285566/)
57. Fry AM, Mayor T, Meraldi P, Stierhof YD, Tanaka K, Nigg EA. C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J Cell Biol.* 1998; 141: 1563–74. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2133000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> PMID: [9647649](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9647649/)
58. Nishiguchi KM, Tearle RG, Liu YP, Oh EC, Miyake N, Benaglio P, et al. Whole genome sequencing in patients with retinitis pigmentosa reveals pathogenic DNA structural changes and NEK2 as a new disease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;
59. Khateb S, Zelinger L, Mizrahi-Meissonnier L, Ayuso C, Koeneke RK, Laxer U, et al. A homozygous nonsense CEP250 mutation combined with a heterozygous nonsense C2orf71 mutation is associated with atypical Usher syndrome. *J Med Genet.* 2014; 51: 460–9. doi: [10.1136/jmedgenet-2014-102287](https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102287) PMID: [24780881](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24780881/)
60. De Castro-Miró M, Pomares E, Lorés-Motta L, Tonda R, Dopazo J, Marfany G, et al. Combined genetic and high-throughput strategies for molecular diagnosis of inherited retinal dystrophies. *PLoS One.* 2014; 9: e88410. doi: [10.1371/journal.pone.0088410](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088410) PMID: [24516651](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24516651/)
61. Corton M, Tatu SD, Avila-Fernandez A, Vallespin E, Tapias I, Cantalapedra D, et al. High frequency of CRB1 mutations as cause of Early-Onset Retinal Dystrophies in the Spanish population. *Orphanet J Rare Dis.* 2013; 8: 20. doi: [10.1186/1750-1172-8-20](https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-20) PMID: [23379534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23379534/)
62. Nishiguchi KM, Rivolta C. Genes associated with retinitis pigmentosa and allied diseases are frequently mutated in the general population. *PLoS One. Public Library of Science;* 2012; 7: e41902.

Supplementary material for: de Castro-Miró et al. *Novel candidate genes and a wide spectrum of structural and point mutations responsible for inherited retinal dystrophies revealed by exome sequencing.* PLoS One. 2016 Dec 22;11(12):e0168966.

S1 Fig. Conservation of missense mutations.

Clustalw alignment of protein sequences of different species: Human, Macaque, Rabbit, Mouse, Opossum, Chicken, *X. tropicalis*, Stickleback, Zebrafish, *D. Melanogaster* and *C. Elegans* (when available) are shown. The position of the mutated amino acid is highlighted with a red box.

S2 Fig. Fundus eye photographs.

Right and left fundus eye images are shown from affected members of families A3 (A and B), 62ORG (C and D) and 56ORG (E and F) with mutations in *CEP250*, *SCLT1* and *CEP78*, respectively. All these patients have been diagnosed with Retinitis Pigmentosa.

S3 Fig. Cosegregation analysis of the mutations identified by WES in our cohort (complementary to Fig 1).

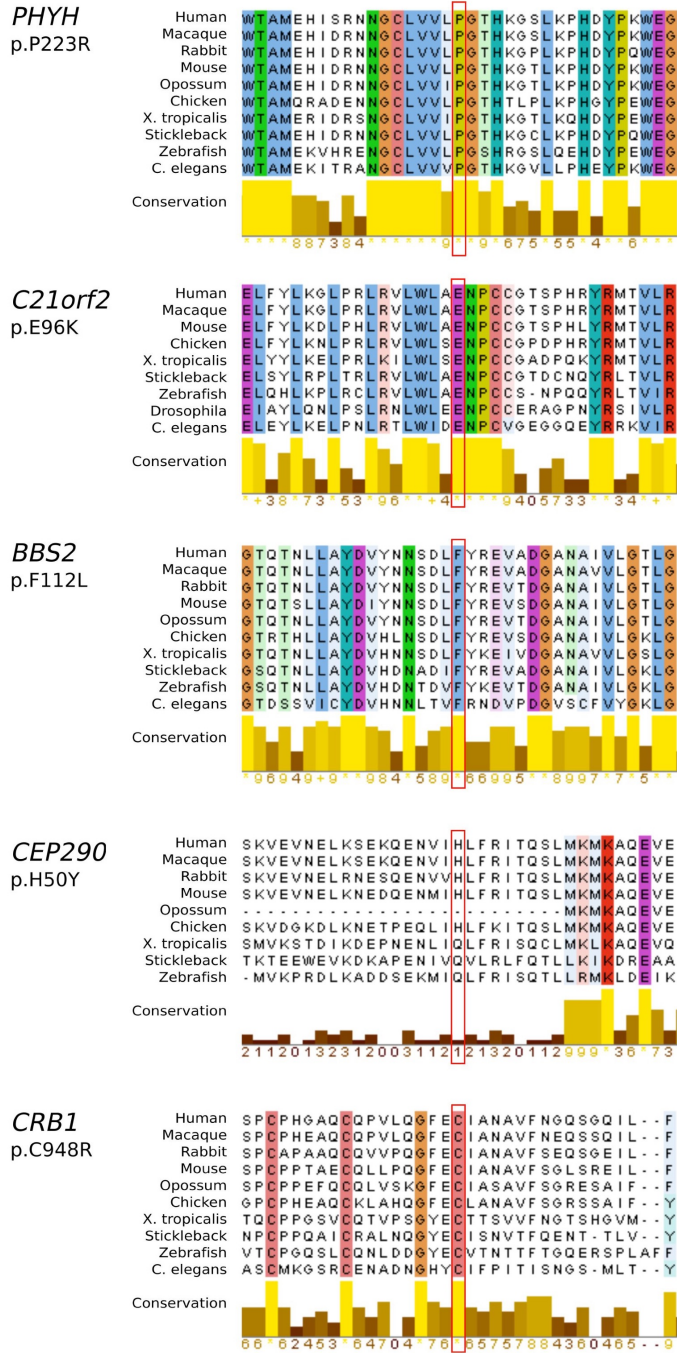
Probands sequenced by WES are indicated with an asterisk (*).

S1 Table. Summary of exome data per sample.

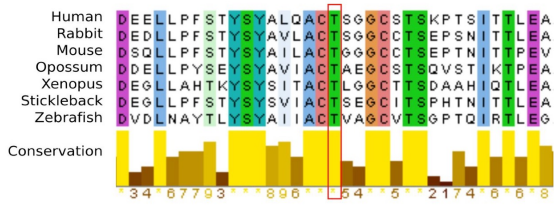
For each sample, total coverage as well as data restricted to IRD genes is shown. For IRD genes, the number of known heterozygous recessive mutations (excluding the causative mutations in the family) and the number of unreported heterozygous variants predicted as pathogenic at least by two different algorithms, are indicated. C10 and C30 are the percentage of bases with a minimum coverage of 10x and 30x, respectively.

S2 Table. Criteria used to classify pathogenic variants according ACMG guidelines.

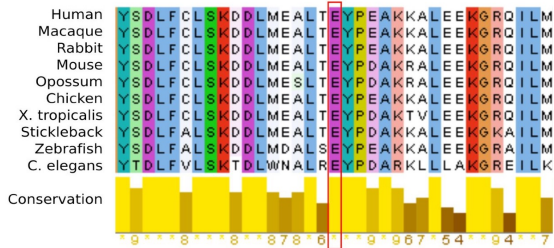
S1 Fig



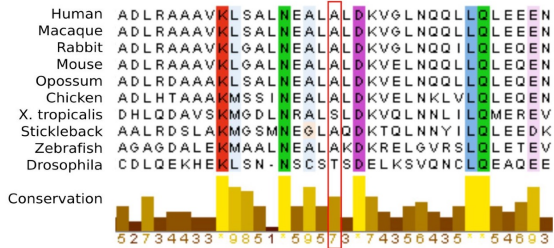
USH2A
p.T4337M



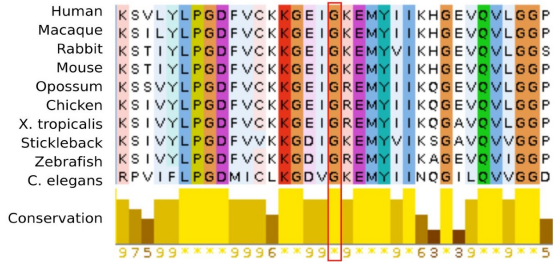
CNGA3
p.E590K



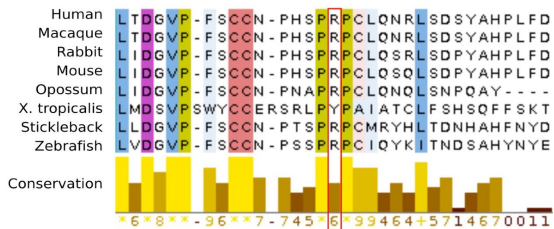
CEP250
p.A609V



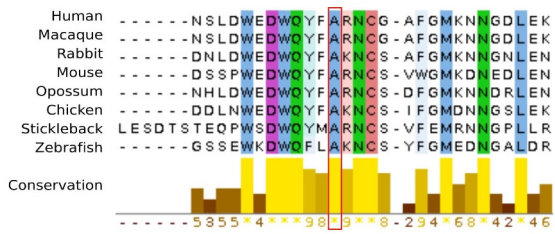
CNGB3
p.G558C



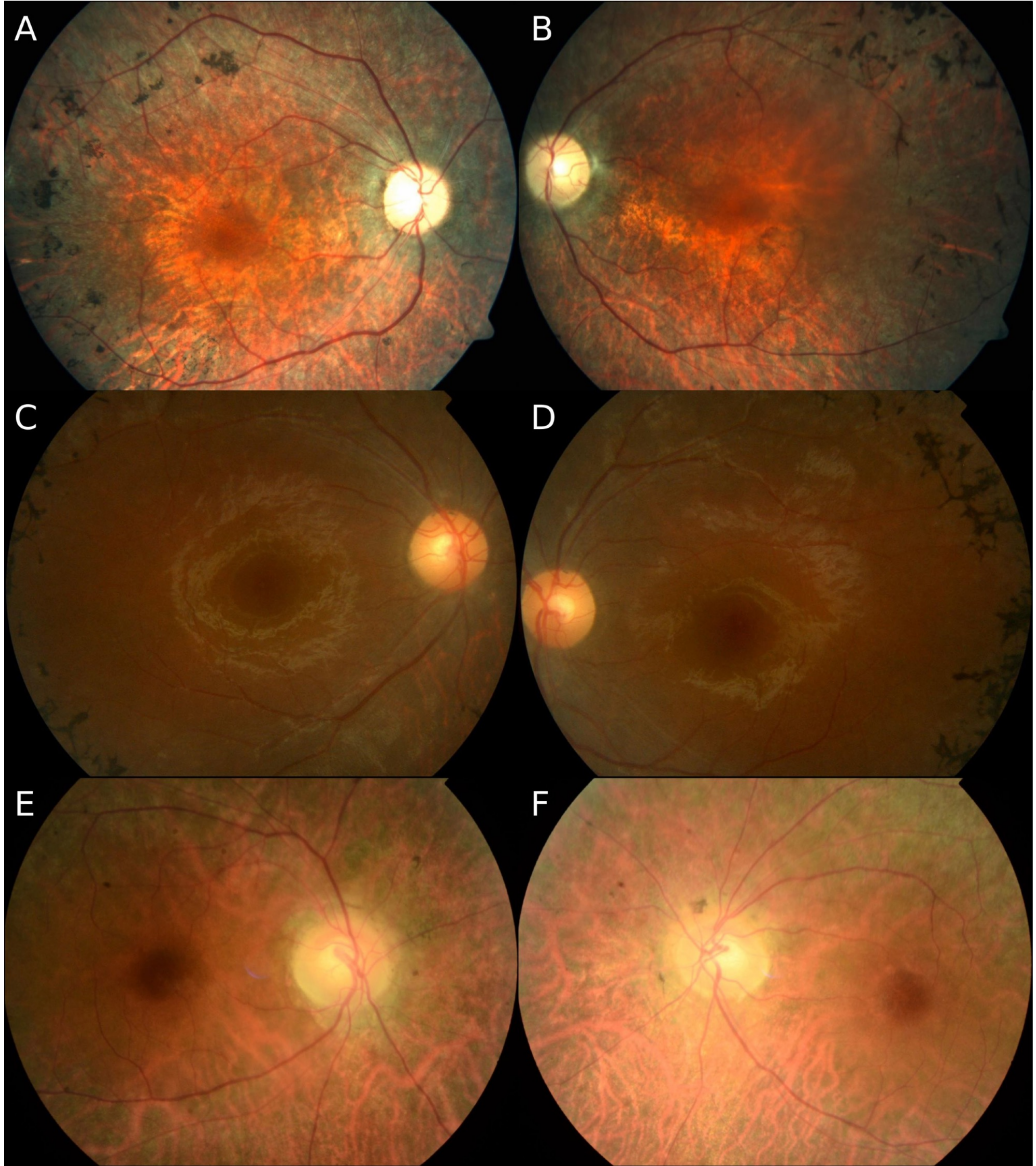
ROM1
p.R223Q



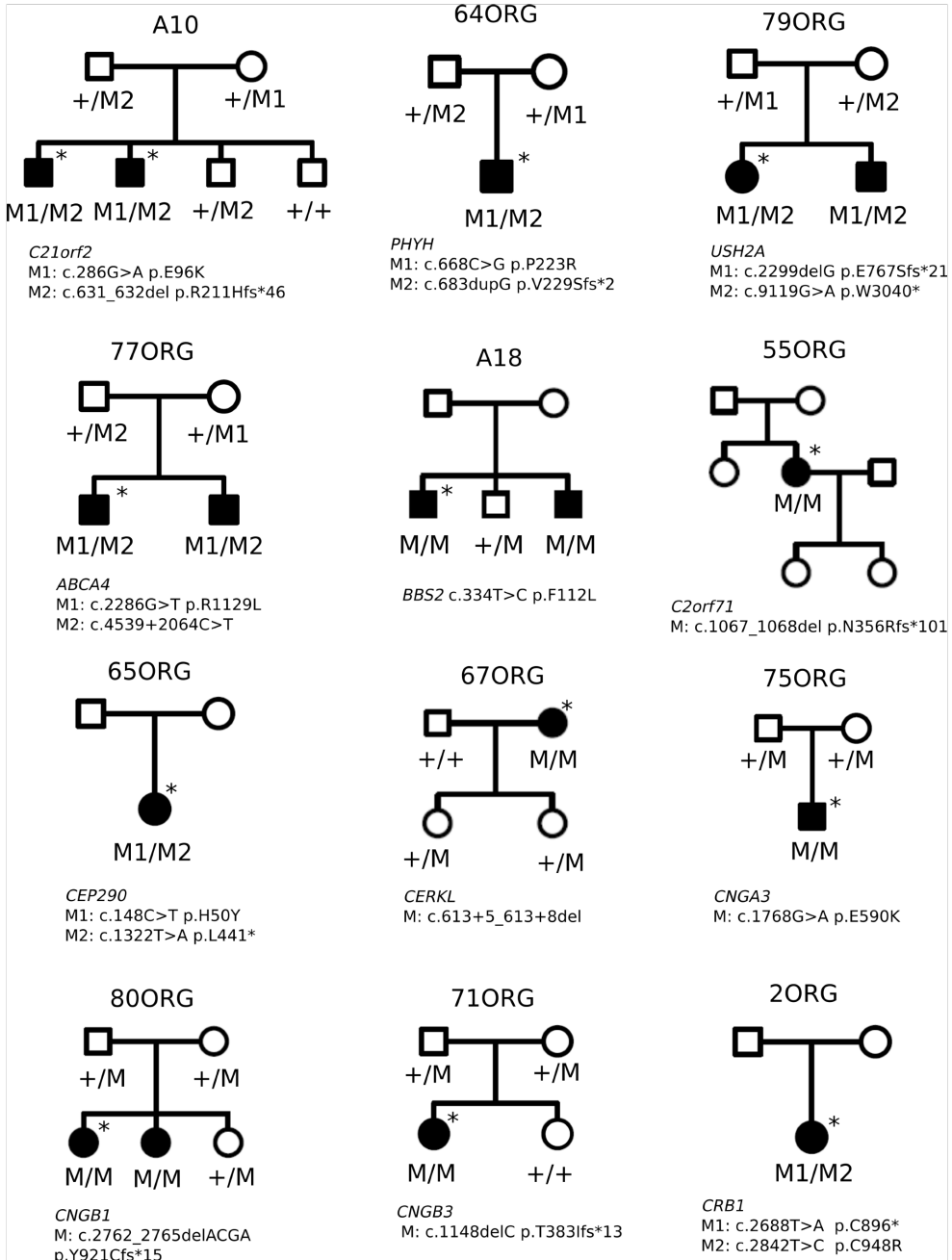
USH2A
p.A416S

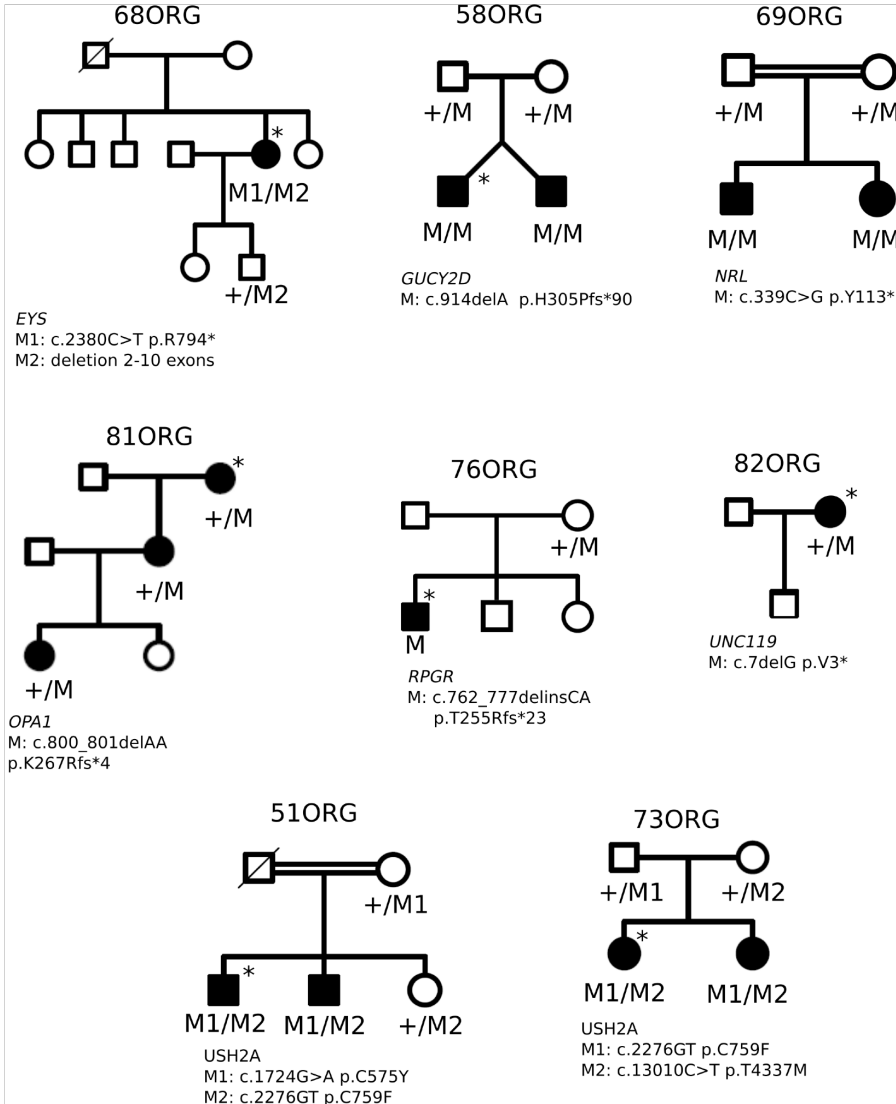


S2 Fig



S3 Fig





Supplementary Table S1: Summary of exome data per sample.

Sample	Capture region					IRD genes					Rare changes predicted as pathogenic	
	Number of variants	Mean	Median	C10	C30	Number of variants	Mean	Median	C10	C30		Known mutations
V506	56826	49,27	44	91,5	69,5	1184	49,09	45,40	94,35	70,80	1	6,00
V507	56520	46,13	41	91,4	66,7	1147	45,25	41,96	93,84	67,35	1	10,00
V508	58225	65,06	57	93,1	80,6	1245	58,10	53,22	95,85	80,52	1	6,00
V509	57909	53,86	49	93,1	75,8	1246	53,72	49,51	95,62	77,74	1	5,00
V510	55580	47,87	43	91,8	69	1127	47,72	44,08	94,50	70,53	0	10,00
V511	55224	49,84	45	92	71,2	1131	49,88	46,08	94,91	72,91	0	5,00
V512	55049	58,16	52	93,1	78,3	1146	63,89	58,72	95,57	82,38	0	7,00
V513	56058	54,67	49	92,4	75,2	1178	54,83	50,57	95,15	76,94	0	5,00
V514	55603	52,26	47	92,3	73,5	1137	52,27	48,40	95,17	75,24	0	3,00
V515	39934	55,61	50	96,5	76,6	892	55,58	52,05	97,74	76,79	0	2,00
V518	40592	53,17	48	96	74	917	53,72	50,00	97,45	74,74	0	3,00
V519	40130	54,35	49	96,2	74,9	905	54,57	51,31	97,33	75,32	1	4,00
V520	39951	54,39	49	96	74,5	874	54,39	50,82	97,13	74,89	1	2,00
V521	40046	52,75	47	96,1	73,7	888	53,06	49,67	97,30	73,99	1	4,00
V522	38471	51,8	47	95,8	72,7	875	52,09	48,44	96,94	73,21	0	5,00
V525	40942	53	48	96	74,1	952	53,76	49,98	97,32	75,00	0	3,00
V526	41929	52,25	47	95,8	73,2	966	52,83	49,32	97,18	74,16	1	6,00
V527	41183	52,9	48	95,9	73,6	937	53,12	50,04	97,04	74,14	0	6,00
V528	40680	54,34	49	96,1	75	860	54,94	51,45	97,55	76,41	0	4,00
V529	40222	52,99	48	95,9	73,8	888	53,57	49,98	97,26	74,94	0	7,00
V530	39769	50,8	46	95,8	72,3	862	51,53	48,15	97,49	73,49	0	10,00
V531	41214	53,96	48	95,9	74,7	914	54,41	50,35	97,30	75,95	0	5,00
V532	40650	52,79	47	95,7	73,6	925	53,60	50,02	97,32	75,04	0	7,00
V533	41079	49,55	45	95,4	70,9	879	50,14	46,35	97,03	71,66	0	3,00
V534	41012	70,44	64	97,4	85	893	70,43	65,94	98,55	85,56	0	3,00
V535	42726	74,83	68	97,6	86,7	949	74,64	69,90	98,69	87,41	0	1,00
V536	41923	92,2	83	97,9	91,3	946	93,00	86,81	99,01	93,04	0	7,00
V537	41759	71,6	65	97,4	85,4	901	71,52	66,96	98,44	85,72	1	1,00
V538	40674	54,65	50	96,2	75,7	857	54,81	51,62	97,54	75,78	0	7,00
V539	41423	56,76	52	96,5	78	948	57,29	54,08	98,07	79,33	0	7,00
V541	41353	77,64	69	96,9	85,9	924	78,06	72,18	98,18	87,69	0	9,00

Supplementary Table S1: Summary of exome data per sample.

Sample	Capture region						IRD genes					
	Number of variants	Mean	Median	C10	C30	Number of variants	Mean	Median	C10	C30	Known mutations	Rare changes predicted as pathogenic
V542	39653	61,45	55	96,2	78,8	850	62,10	57,47	97,58	80,28	0	4,00
V543	40930	59,81	53	96,1	77,8	918	60,01	55,78	97,18	78,45	1	7,00
V544	40641	63,96	57	96,4	80,1	906	63,92	59,44	97,70	80,95	0	4,00
V545	40599	59,9	53	96,1	78,1	966	60,53	56,03	97,73	79,42	0	4,00
V546	40420	63,97	57	96,3	80,2	912	63,81	58,90	97,39	80,74	1	6,00
V547	40887	63,35	57	96,2	80,1	892	63,92	58,96	97,67	81,46	2	6,00
V550	40733	61,74	55	96,2	79,4	910	62,03	57,55	97,80	80,68	0	4,00
V551	40607	58,3	53	96,1	77,8	932	58,81	54,42	97,55	78,99	0	5,00
V552	40914	107,19	95	97,7	92,3	956	108,06	99,66	98,84	94,03	0	7,00
min	38471	47,87	43	91,8	69	850	47,72	44,08	94,50	70,53	0,00	1,00
max	58225	107,19	95	97,9	92,3	1246	108,06	99,66	99,01	94,03	2,00	10,00
mean	43597,21	59,85	53,79	95,63	77,47	958,00	60,12	55,90	97,21	78,57	0,29	5,11
sd	6150,86	11,97	10,58	1,61	5,42	109,72	12,02	11,11	1,08	5,52	0,52	2,20

S2 Table. Criteria used to classify pathogenic variants according ACMG guidelines

Gene	Mutation	ACMG classification	ACMG criteria for classifying pathogenic variants					
			PM2	PM3	PP3	PP5	PP2	PP1
<i>C21orf2</i>	c.286G>A p.E96K	Likely P.	PM2	PM3	PP3		PP1	
	c.631_632del p.R211Hfs*46	Pathog.	PVS1	PM2	PP3		PP1	
<i>PHYH</i>	c.668C>G p.P223R	Likely P.	PM2	PM3	PP3		PP2	
	c.683dupG p.V229Sfs*2	Pathog.	PVS1	PM2	PP3	PP5		
<i>USH2A</i>	c.2299delG p.E767Sfs*21	Pathog.	PVS1	PM2	PM3		PP5 PP1	
	c.9119G>A p.W3040*	Pathog.	PVS1	PM2		PP3 PP5	PP1	
<i>ABCA4</i>	c.3386G>T p.R1129L	Likely P.	PM2		PP3 PP5	PP2	PP1	
	c.4539+2064C>T	VUS				PP5	PP1	
<i>BBS2</i>	c.334T>C p.F112L	VUS	PM2		PP3	PP2	PP1	
<i>C2orf71</i>	c.1067_1068del p.N356Rfs*101	Pathog.	PVS1	PM2	PP3			
<i>CEP290</i>	c.148C>T p.H50Y	VUS	PM2		PP3		PP2	
	c.1322T>A p.L441*	Pathog.	PVS1	PM2	PP3			
<i>CERKL</i>	c.613+5_613+8del	VUS	PM2					
<i>CNGA3</i>	c.1768G>A p.E590K	VUS	PM2		PP3 PP5	PP2		
<i>CNGB1</i>	c.2762_2765delACGA p.Y921Cfs*15	Pathog.	PVS1	PM2			PP1	
<i>CNGB3</i>	c.1148delC p.T383Ifs*13	Pathog.	PVS1	PM2		PP5		
<i>CRB1</i>	c.2688T>A p.C896*	Pathog.	PVS1	PM2	PP3	PP5		
	c.2842T>C p.C948R	Likely P.	PM5	PM2	PP3		PP2	
<i>CRX</i>	Deletion exons 3-4	Pathog.	PVS1	PM2			PP1*	
<i>EYS</i>	c.2380C>T p.R794*	Pathog.	PVS1	PM2	PP3			
	Deletion 10 initial exons	Pathog.	PVS1	PM2	PM3			
<i>GUCY2D</i>	c.914delA p.H305Pfs*90	Pathog.	PVS1	PM2	PP3		PP1	
<i>NRL</i>	c.339C>G p.Y113*	Pathog.	PVS1	PM2	PP3		PP1	
<i>OPAI</i>	c.800_801delAA p.K267Rfs*4	Pathog.	PVS1				PP1 PP4	
<i>PRPF31</i>	Partial deletion & duplication	Pathog.	PVS1	PM2			PP1	
<i>RPGR</i>	c.762_777delinsCA p.T255Rfs*23	Pathog.	PVS1	PM2	PM1			
<i>UNC119</i>	c.7delG p.V3*	Likely P.	PVS1	PM2				
<i>USH2A</i>	c.1724G>A p.C575Y	Likely P.	PM2		PP3 PP5	PP2	PP1	
	c.2276G>T p.C759F	Likely P.	PM2		PP3 PP5	PP2	PP1	
<i>USH2A</i>	c.2276G>T p.C759F	Likely P.	PM2		PP3 PP5	PP2	PP1	
	c.13010C>T p.T4337M	Likely P.	PM2		PP3 PP5	PP2	PP1	
<i>CNGB3</i>	c.1672G>T p.G558C	VUS			PP3 PP5	PP2		
<i>CRB1</i>	c.1702C>T p.H568Y	VUS	PM2		PP3 PP5	PP2		
<i>ROM1</i>	c.668G>A p.R223Q	VUS	PM5		PP3			
<i>PDE6B</i>	c.928-9_940dup p.Y314Cfs*50	Pathog.	PVS1	PM2		PP5		
<i>USH2A</i>	c.1246G>T p.A416S	VUS	PM2		PP3	PP2		
<i>CEP250</i>	c.1826C>T p.A609V	Likely P.	PS3	PM2	PP3			
<i>CEP78</i>	c.1056delT p.T353Lfs*5	VGUS	PVS1	PM2	PP3			
<i>SCLT1</i>	c.778-2A>T	Pathog.	PVS1	PM2	PP3			
	c.827G>A p.R276H	VUS	PM2	PM3	PP3			
<i>SEMA6B</i>	c.493G>A p.G165R	VGUS	PM2		PP3			

*Consider as stronger evidence as the huge number of affected members in the family

VUS: Variant of uncertain significance; VGUS: Variant in a gene of uncertain significance

PUBLICACIÓ 3

Títol

«Novel mutations in the choroideremia gene and a complex severe phenotype due to additional mutations in ocular genes in two Spanish families »

Resum

Les distròfies de retina (DR) representen un grup de patologies causants d'alteracions visuals amb una gran heterogeneïtat clínica i genètica, la qual cosa complica molts cops el diagnòstic, sobretot en estadis avançats de la malaltia. La determinació de la causa molecular en aquests casos pot ser crucial per complementar el diagnòstic clínic i per oferir un consell genètic i una prognosi de la patologia adequades.

En aquest treball s'han estudiat dues famílies inicialment diagnosticades amb retinosi pigmentària on no es va identificar cap mutació patogènica després d'una anàlisi exhaustiva mitjançant un xip de cosegregació que incloïa els 100 gens majoritaris causants de DR no sindròmica. A continuació es van analitzar diversos membres afectats de cada família mitjançant seqüenciació de l'exoma (WES), tot identificant una mutació nova en cada família en el gen *CHM*, responsable de coroiderèmia i amb herència lligada al sexe. Aquest gen no estava inclòs en el xip. Per tal de confirmar aquest diagnòstic, es van reavaluar fenotípicament els individus afectats i les dones portadores de la mutació, i es va demostrar que, tot i que elles no manifestaven la patologia, sí que presentaven alteracions corioretinianes que variaven entre els diferents individus, presumiblement a causa de la inactivació aleatòria del cromosoma X.

A més, una de les dones portadores de la mutació al gen *CHM* presentava un fenotip molt més sever que la resta de dones. Aquesta dona era portadora de dues mutacions patogèniques més, en el gen *PAX6*, responsable d'anirídia i a *PDE6B*, causant de ceguesa nocturna estacionària congènita.

D'aquesta manera es fa palesa la utilitat del WES en el diagnòstic de patologies molt heterogènies, ja que permet analitzar de forma simultània un gran nombre

de gens, tot ajudant a resoldre casos en què hi ha més d'un gen que contribueix al fenotip.

Referència

Marta de Castro-Miró, Raul Tonda, Gemma Marfany, Ricardo P. Casaroli-Marano and Roser González-Duarte. *Novel mutations in the choroideremia gene and multi-mendelian phenotypes in Spanish families.*

Novel mutations in the choroideremia gene and multi-mendelian phenotypes in Spanish families

Marta de Castro-Miró^{1,2,3}; Raul Tonda, PhD^{4,5}; Gemma Marfany, PhD^{1,2,3}; Ricardo P. Casaroli-Marano, MD, PhD^{6*}; Roser González-Duarte, PhD^{1,2,3*}

1. Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

2. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain.

3. Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

4. CNAG-CRG, Centre for Genomic Regulation (CRG), Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), Barcelona, Spain.

5. Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain.

6. Department of Surgery, School of Medicine & Hospital Clinic de Barcelona (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain

*Corresponding authors

Financial support:

The study was supported by the 2013 CNAG Call “300 EXOMES TO ELUCIDATE RARE DISEASES”. This activity was sponsored by grants SAF2013-49069-C2-R-1 (Ministerio de Economía y Competitividad/FEDER), 2014SGR-0932 (Generalitat de Catalunya), La Marató TV3 (Project Marató 201417-30-31-32) to GM and RGD. RT is funded by PT13/0001/0044 (ISCHII Ministerio de Economía y Competitividad).

Running head:

New CHM mutations and multi-mendelian phenotypes.

Conflict of interest statement:

No conflicting relationship exists for any author

ABSTRACT

Purpose: We aimed to perform the genetic diagnosis of families with patients clinically diagnosed of generic retinitis pigmentosa (RP) showing complex phenotypes, for accurate disease assignment.

Methods: Whole Exome Sequencing (WES) of selected patients within each family was undertaken, followed by Sanger sequencing and cosegregation analysis to validate the genetic findings. Accurate clinical reevaluation was also performed by electrophysiology and visual field records, as well as new imaging techniques, such as swept source -optic coherence tomography (SS-OCT) and fundus autofluorescence (FAF).

Results: Bioinformatics analysis of WES results highlighted two novel causative mutations in the X-linked choroideremia gene (*CHM*). These findings prompted a reevaluation of the clinical traits, which confirmed the choroideremia diagnosis. Carrier females showed affection at different degrees, even in twin sisters,

probably due to the lyonization effect. A severe multi-mendelian phenotype was associated to dominant pathogenic mutations in other genes besides *CHM*, namely, *PAX6* and *PDE6B*, segregating in one family.

Conclusions: Genetic diagnosis by massive sequencing proves to be invaluable to identify causative mutations in retinal dystrophies and identify additional genetic variants that impact on the phenotype, thereby securing clinical diagnosis. Exome analysis will increasingly unveil multi-mendelian phenotypes previously ascribed to rare syndromic features. Besides, the implementation of new non-invasive clinical imaging techniques facilitates early diagnosis and follow-up of alterations in the neurosensory retina and the retinal pigment epithelium-choriocapillary-choroid complex. Overall, the combination of powerful genetic and clinical diagnostic strategies is instrumental for efficient patient management and prioritization for the upcoming gene-specific therapies.

INTRODUCTION

Choroideremia (CHM), first described by Mauthner in 1872¹, is an X-linked retinal disorder characterized by progressive degeneration of the choriocapillaries, photoreceptors and retinal pigmented epithelium (RPE), with a distinctive atrophic fundus characterized by visualization of the sclera through a depigmented RPE and choroid. CHM estimated prevalence is 1:50,000 to 1:100,000². Unlike the high genetic heterogeneity reported for retinitis pigmentosa (RP) and many other inherited retinal dystrophies (IRD), CHM is caused by mutations in a single gene, *CHM*. The *CHM* gene encodes a ubiquitously expressed intracellular protein named Rab escort protein-1 (REP-1), which is a component of the post-translational modification machinery of lipid-containing proteins involved in intracellular vesicular trafficking. Rab escort proteins are cytosolic chaperones that promote post-translational Rab prenylation, which in turn enable reversible anchoring of Rab proteins to the cell membranes³. The majority of the mutations reported in *CHM* include large deletions and nucleotide substitutions causing nonsense, frameshift and splicing variants, generally associated to absence of the gene product, or dysfunction caused by premature

truncation. Nonetheless, the ethiopathological mechanisms of retinal degeneration due to *CHM* mutations are still poorly characterized. Clinical diagnosis is based on fundus examination, electrophysiology and optical coherence tomography (OCT). Affected males show similar clinical phenotypes and usually develop night blindness at early age, progressive loss of peripheral vision in the second and third decades of life and finally reach a stage of total blindness⁴. While all male carrying mutations in *CHM* develop the disease, female carriers are mostly clinically asymptomatic, with no serious visual impairment and normal visual fields, although they usually show eye fundus changes, patchy depigmentation of the RPE and scattered pigmented areas in the peripheral retina, whose extension depends on lyonization (random X chromosome inactivation) in retinal cells. Proper clinical diagnosis of CHM has been hampered by the overlapping features with other retinal disorders, mainly, recessive or X-linked forms of RP. As it happens with other retinal dystrophies, genetic diagnosis secures the clinical diagnosis and is crucial for eligibility criteria for gene therapy trials that are currently underway. To that end, high-throughput whole exome sequencing

(WES) strategies have allowed to identify new *CHM* disease-causing mutations in patients that otherwise would have remained undetected⁵⁻⁷. Our WES results highlight the contribution of concomitant mutations in IRD genes that may add to the severity of the phenotype, and most important, may impair the successful outcome of CHM single gene therapy trials.

METHODS

Family pedigrees and samples

Samples from healthy and affected members of two Spanish families (2NCE and 8NCE) initially diagnosed with RP were collected for genetic testing. Pedigrees were generated after each family history. In family 2NCE, 5 affected members and 7 non-affected were studied. After a molecular diagnosis was achieved, three more non-affected women were added to the study. In family 8NCE, samples of 8 individuals were available and included in the study. After a genetic diagnosis was achieved, 5 more family samples were analyzed to confirm cosegregation. The tenets of the Declaration of Helsinki were followed and informed consent was obtained from all individuals who participated in this study prior to donation of blood samples. All research procedures were approved by the Bioethics

Committee of the Universitat de Barcelona (Barcelona, Spain). Peripheral blood DNA was obtained using the MoleStrips DNA Blood kit with the GeneMole instrument (Mole Genetics, Mole, Lysaker, Norway) or using the QIAamp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen).

RD chip analysis

A custom high-throughput single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping chip (RD-chip) that included 760 SNPs located close or within 100 retinal dystrophy genes were used to exclude non-cosegregating candidates from further mutational analysis in the two families. Information on selected SNPs, genes and other technical details are described elsewhere⁸.

Library preparation and sequencing

Exome sequencing was performed at the Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica (CNAG, Barcelona, Spain). Paired-end multiplex libraries were prepared according to manufacturer's instructions with Illumina TruSeq DNA Sample Prep kit (Illumina, San Diego, California, USA) and enriched using the he NimbleGen SeqCap EZ Human Exome Library v3.0 that targets ~64 Mb, which correspond to ~20,000 genes. Libraries were loaded onto Illumina flowcells for cluster generation prior to producing 100

base read pairs on a HiSeq2000 instrument following the Illumina protocol. Base calling and quality control was performed with the Illumina RTA sequence analysis pipeline according to manufacturer's instructions.

Data analysis

Sequencing reads were trimmed from the end of the read up to the first base with a quality of at least 10. Resulting reads of at least 40 nt long were mapped to the Human genome version 37 with decoy sequences from Broad Institute using the GEM toolkit⁹ allowing up to 4 mismatches when necessary. Alignment files (BAM format) containing only properly paired, uniquely mapping reads were processed using Picard tools version 1.110¹⁰ to add read groups and remove duplicates. The Genome Analysis Tool Kit (GATK) version 3.1¹¹ was used for local realignment. Processed BAM files were submitted to variant calling for single nucleotide variants and small insertions and deletions using Samtools version 0.1.19¹². Functional annotations were added to the resulting VCF using snpEff¹³ with the GRCh37.75 database. Human dbSNP version 137 IDs, population frequencies from the 1000 Genomes Project¹⁴ and Exome Variant Server¹⁵, and several conservation and pathogenicity prediction algorithms from dbNSFP¹⁶

were annotated using snpSift¹⁷.

In house bash scripts were used to select shared variants in all affected members which: 1) showed a MAF < 0,01, 2) were predicted to produce high or moderate impact in coding regions, including non-synonymous, non-sense and frame-shift variants, intron-exon junctions, and short coding insertions/deletions (indels).

Mutation analysis

Variants mapping to already reported IRD genes were selected for further validation by PCR and Sanger sequencing. A direct mutational screening of *PAX6* was undertaken by Sanger sequencing of all exons in patient III-8 (pedigree 8NCE). Additionally, a Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) assay was also performed in this patient to assess structural rearrangements of *PAX6* using the commercial kit SALSA MLPA P219 *PAX6* (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands) with probes for every *PAX6* exon. The gene *CHM* was also amplified and sequenced by Sanger in 21 additional probands. PCR and sequencing primers are available upon request. Pathogenicity scores for identified variants were evaluated by MutationTaster¹⁸, PolyPhen2¹⁹, SIFT²⁰ and NetGene2²¹. Pathogenicity was also assessed by cosegregation analysis in the family.

Clinical examination

Complete ophthalmological examination was performed in all available individuals. All medical records assessed the following clinical features: age at onset of visual disturbance, clinical ophthalmological history, best-corrected visual acuity (BCVA), refractive error (auto-refractometry), fundus examination (macular, mid-periphery and peripheral retina, and optic disc appearance) with pharmacological pupil dilatation, anterior segment slit-lamp biomicroscopy with Goldmann tonometry. Fundus color photographs were acquired with non-mydratic retinography (TOPCON TRC-NW8, Tokyo, Japan). Macular optical coherence tomography (OCT) scans were evaluated with swept-source Atlantis (TOPCON DRI OCT-1, Tokyo, Japan). Visual fields were examined with the Humphrey Field Analyzer HFA II 750 (Carl Zeiss, Mediatech, Dublin, CA, USA) with the 24-2 FASTPAC or 24-2 SITA standard program. Ultra-wide-field photography and autofluorescence analysis of ocular fundus were carried out using Optomap (Optos plc, Scotland, UK). Electroretinography (ERG) and electrooculography (EOG) were performed according to the standards of the International Society for Clinical Electrophysiology of

Vision²².

RESULTS

An accurate genetic diagnosis was requested for two families clinically diagnosed with RP. They were first genotyped using the RD-chip⁸ based on SNP-cosegregation analysis of 100 major non-syndromic IRD genes. Dominant inheritance was assumed in family 2NCE, since three daughters (IV-3, IV-4 and IV-5) of proband III-8 showed slight retinal alterations without visual impairment (Figure 1A). Thirteen members of this family (numbers in bold in the pedigree) were genotyped, and under autosomal dominant assumption most genes but five were directly excluded by lack of cosegregation. These remaining genes were also excluded after Sanger sequencing.

Eight members of family 8NCE (numbers in bold in the pedigree, Figure 1B) were genotyped with the RD-chip assuming autosomal recessive inheritance based on suspected consanguinity and geographical proximity. Again, most genes but five were directly excluded by lack of cosegregation, and subsequent Sanger sequencing allowed to exclude the remaining candidates.

As a next step to identify the causative gene, WES was undertaken in 4 probands of family 2NCE and 3 of

family 8NCE (marked with * in Figure 1A and B, respectively). WES data was analyzed following the commonly adopted criteria for variant filtering (Figure 2): i) alteration of a protein-coding sequence; ii) minimum allele frequency (MAF) <0.01 in control population; iii) cosegregation in sequenced patients of the same family; iv) localization in one of the 300 reported IRD genes (see Material and Methods for details). As indicated in Figure 2, these criteria allowed to substantially decrease the number of initial identified variants (around 200,000 per family) down to a manageable 2 variants in family 2NCE, and 4 in family 8NCE. Surprisingly, the two families carried a different unreported but clearly pathogenic mutation in the *CHM* gene, mapping at the X chromosome, thereby prompting the reassignment of autosomal to X-linked inheritance.

The new *CHM* pathogenic variants identified were: c.1769C>T p.Q590* in family 2NCE, a nonsense mutation that generates a premature stop codon; and c.116+1G>C in family 8NCE, a nucleotide substitution that disrupts the splicing donor consensus site and generates an aberrant splicing event (Figure 3). In fact, mutations in this position have already been reported in other patient cases (c.116+1G>A and

c.116+1G>T^{23,24}). Indeed, the pathogenicity of the identified variants was fully supported by both, *in silico* prediction algorithms and full cosegregation with the disease in each family (Figures 1A and B).

Therefore, after these molecular results, the initial clinical diagnosis of RP was reassessed and the diagnosis of CHM was confirmed. Table 1 shows the clinical features of affected males and carrier women of the two families. The identification of *CHM* as the causative gene led us to redefine the inheritance pattern and thus identify carrier women (III-12, IV-3, IV-4, IV-5, IV-6 and IV-7 in family 2NCE; and III-1 and IV-2 in family 8NCE), which could transmit the disease to their male progeny. When carefully examined, these carrier women show several degrees of mild retinal alterations although without any detectable reduction in the visual field. Random X-inactivation in the retina may account for these alterations in carrier women, similarly to what has been described for other X-linked retinal dystrophies^{25,26}. Detailed images of the three obligate carrier daughters of proband III-8 (family 2NCE) with different retinal symptoms are shown below.

Special mention deserves patient IV.3 in family 8NCE, where additional –

already reported– mutations in two autosomal dominant genes add to a more severe phenotype. In fact, her mother (III-8), diagnosed with aniridia, carries the pathogenic *PAX6* c.1310A>T p.*437L²⁷, as well as a dominant mutation in *PDE6B* (c.928-9_940dup p.Y314Cfs*50) associated to Congenital Stationary Night Blindness (CSNB),²⁸ (Figure 3). Her sister IV-2, instead, only carries the *CHM* pathogenic variant.

Detailed clinical study

Male patients in pedigree 2NCE, although initially diagnosed with RP, were clinically re-evaluated after the genetic diagnosis. A detailed assessment of the least affected male, proband III-8, is shown in Figure 4. The eye fundus, FAF and OCT observations revealed characteristic phenotypic traits of CHM, such as profound chorioretinal atrophic areas (Figure 4a and b) with extensive loss of retinal pigmented epithelium (Figure 4c and d) with no affection of either the central macula or peripapillary retina. A central thinned choroid remnant was detected by OCT (Figures 4e and f), all together supporting the residual retinal function observed by conserved central visual acuity and constricted visual field with a restricted central island (Table 1). The oldest brother, patient III-2, showed similar

peripheral affection and very poor vision (Table 1). After reassignment, the clinical traits were in agreement with the genetic diagnosis of CHM, an X-linked condition. The milder phenotype in the daughter carrier females and the variability in the macular affection, even between the twin sisters (Table 1 and Figure 5), could be now attributed to random X chromosome inactivation. For a detailed comparison of the ocular phenotype of the three daughter probands (IV-3, IV-4, and IV-5), see Figure 5 and the corresponding figure legend. Proband IV-5 was considerably less affected than her sisters, although some partial symptoms were revealed by OCT, with some slight and regionally restricted choroid narrowing (Figure 5e and f).

Notably, the genetic diagnosis in pedigree 8NCE was instrumental to reveal both, segregation of different gene mutations and assignment to distinct clinical entities in the different family branches. Fundus images and OCT of affected males, III-5 and III-7, showed severely atrophic chorioretinal areas, with pigment clusters in the macula, and vascular narrowing (Table 1, and Figure 6, showing the images from proband III-7). All these traits clearly supported the genetic diagnosis of CHM instead of the initial clinical diagnosis of RP.

Of note, the unexpected differences between the clinical traits of obligate female carriers IV-2 (non-affected) and IV-3 (extremely affected) (Figure 7), prompted us to undertake a more exhaustive genetic study. Proband IV-3 presented nystagmus, strabismus and iris alterations, symptoms that were not present in her sister that carried the same *CHM* mutation. WES revealed that patient IV-3, not only carried the pathogenic *CHM* mutation, but had also inherited two dominant mutations causative of aniridia (*PAX6*) and congenital stationary night blindness (*PDE6B*). This proband showed severe affection of the retina as well as congenital relatively mild bilateral Axenfeld anomaly and sectorial iris atrophy (Figure 8). Indeed, the additive or synergic contribution of the three mutations accounted for the severity of this blended retinal phenotype in this proband. The two additional mutations had been transmitted by her mother (as ascertained by Sanger sequencing), whose severe aniridia condition precluded an accurate fundus examination and masked the progressive retinal degeneration associated with the *PDE6B* mutation. Deletions in *PAX6* (which are a frequent cause of aniridia) were discarded by MLPA assays. Therefore, the identified variant *PAX6*

c.1310A>T p.*437L (reported elsewhere²⁷) was the sole cause of the aniridia disorder in this family. Differences in the severity of the aniridic phenotype between mother and daughter (sharing the same genetic defect) can be attributed to variable expressivity, a common feature of dominant congenital conditions.

DISCUSSION

Probands of two different families with a clinical diagnosis of RP demanded genetic diagnosis. Our initial analysis using an RD-chip based on RP and Leber congenital amaurosis genes was inconclusive because the *CHM* gene, causative of choroideremia (CHM), had not been included. WES was undertaken using several patients from each family (marked with an asterisk in Figure 1), and pathological mutations (previously unreported) in the *CHM* gene were unambiguously identified as the cause of the disease in male patients, supported by both the pathogenic molecular effect of the mutations and cosegregation within each family. Therefore, genetic diagnosis clearly pointed to patients being affected of CHM instead of RP, and the clinical re-evaluation fully confirmed this reassignment. Although the two visual disorders are considered different clinical entities,

the overlapping retinal phenotypic traits often lead to a wrong assignment, more even so since some carrier females show mild phenotypic traits that blur the X-linked inheritance pattern. These results prompted us to directly screen *CHM* in search of mutations in 21 RP families compatible with an X-linked inheritance, which remained undiagnosed after the mutational screening of known RP genes. Indeed, we identified a reported pathogenic variant in *CHM* in one family, c.715C>T p.R239*²⁹, also supported by cosegregation in the family (See Supplementary Figure S1). Our results further support the claims from several authors that suggest a higher prevalence of *CHM* than previously considered, and more cases will be unveiled once massive sequencing approaches are being increasingly incorporated for clinical genetic diagnosis^{5,6}. Indeed, accurate imaging assessment in patients at early stages of the disease will greatly contribute to define specific early-onset features and stages of *CHM* (e.g. thickening of the fovea, followed by widespread pigment clumping at the retinal pigmented epithelium, eventually evolving to chorioretinal and peripapillary atrophy), which will help the clinician to secure diagnosis, establish the key steps of disease progression, and define potential

biomarkers for future therapeutic trials^{4,30,31}. In fact, in *CHM* patients, choroid atrophy precedes the thinning of the neurosensory retina, which is also prior to neurodegeneration and total loss of visual acuity. The advent of new non-invasive imaging techniques, such as spectral domain-OCT, swept source-OCT and FAF, early diagnosis and the evolutionary follow-up of alterations in the neurosensory retina and the RPE-choriocapillar-choroid complex make accurate prognosis feasible. Indeed, early diagnosis, when central vision is still preserved, is essential to an optimal outcome in gene/cell therapy trials.

Aside X-inactivation effects, different affection in *CHM* patients of the same pedigree (thus bearing the same mutation) can be attributed to the contribution of modifier genes, with an impact on age of onset, disease progression and phenotypic severity. In this context, it is worth noting that WES has allowed us to identify additional pathogenic variants in family 8NCE, which would otherwise have remained unknown. These mutations most probably contributed to the severe multi-mendelian phenotype displayed by female IV-3, who was an obligate *CHM* mutation carrier and also had inherited both a dominant RP mutation in *PDE6B* plus a dominant heterozygous *PAX6*

aniridia mutation (the latter affecting iris, cornea and optic nerve development). *PAX6* mutations usually show reduced penetrance and variable expressivity. Particularly, C-terminal extension pathogenic variants (as that identified in this family), which generate a longer protein product, are associated to a moderate-severe aniridic phenotype with poor vision, keratopathy and cataracts^{32,33}. In this pedigree, the mother III-8 showed an extremely severe aniridia phenotype (which precluded the diagnosis of RP), whereas her daughter IV.3 presented a milder aniridia phenotype that did not compromise retinal fundus imaging. Notably, to our knowledge this is the first case of a CHM patient bearing two additional dominant pathogenic mutations showing multi-mendelian instead of rare syndromic phenotype. As has been claimed lately by several authors, the implementation of massive sequencing techniques will increasingly reveal blended phenotypes caused by several concomitant single gene disorders^{34,35}.

Finally, one of the remaining challenges in IRDs is the establishment of genotype-phenotype correlations. Even in the same family, different patients show distinct traits. WES data would become instrumental to relate incidental genetic variants in

other IRD genes with the severity of private phenotypic traits and disease progression. Since gene augmentation trials for therapy of visual disorders is being underway for specific genes and mutations, among them *CHM*, WES data should be included among the patient eligibility and prioritization criteria for successful gene therapy.

Acknowledgments

We are grateful to Bru Cormand for valuable comments and suggestions. We acknowledge the generous and helpful participation of all patients and their relatives. The study was supported by the 2013 CNAG Call “300 EXOMES TO ELUCIDATE RARE DISEASES”. This activity was sponsored by grants SAF2013-49069-C2-R-1 (Ministerio de Economía y Competitividad/FEDER), 2014SGR-0932 (Generalitat de Catalunya), La Marató TV3 (Project Marató 201417-30-31-32) to GM and RGD. RT is funded by PT13/0001/0044 (ISCIII Ministerio de Economía y Competitividad).

REFERENCES

1. Barnard AR, Groppe M, MacLaren RE. Gene therapy for choroideremia using an adeno-associated viral (AAV) vector. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;5(3):a017293.

doi:10.1101/cshperspect.a017293.

2. MacDonald IM, Russell L, Chan C-C. Choroideremia: new findings from ocular pathology and review of recent literature. *Surv Ophthalmol.* 2009;54(3):401-407. doi:10.1016/j.survophthal.2009.02.008.
3. Leung KF, Baron R, Seabra MC. Thematic review series: Lipid Posttranslational Modifications. Geranylgeranylation of Rab GTPases. *J Lipid Res.* 2005;47(3):467-475. doi:10.1194/jlr.R500017-JLR200.
4. Aleman TS, Han G, Serrano LW, et al. Natural History of the Central Structural Abnormalities in Choroideremia. *Ophthalmology.* 2017;124(3):359-373. doi:10.1016/j.ophtha.2016.10.022.
5. Li S, Guan L, Fang S, et al. Exome sequencing reveals CHM mutations in six families with atypical choroideremia initially diagnosed as retinitis pigmentosa. *Int J Mol Med.* 2014;34(2):573-577. doi:10.3892/ijmm.2014.1797.
6. Guo H, Li J, Gao F, Li J, Wu X, Liu Q. Whole-exome sequencing reveals a novel CHM gene mutation in a family with choroideremia initially diagnosed as retinitis pigmentosa. *BMC Ophthalmol.* 2015;15:85. doi:10.1186/s12886-015-0081-4.
7. Sánchez-Alcudia R, García-Hoyos M, López-Martínez MA, et al. A Comprehensive Analysis of

Choroideremia: From Genetic Characterization to Clinical Practice. Janecke AR, ed. *PLoS One.* 2016;11(4):e0151943.

doi:10.1371/journal.pone.0151943.

8. de Castro-Miró M, Pomares E, Lorés-Motta L, et al. Combined genetic and high-throughput strategies for molecular diagnosis of inherited retinal dystrophies. *PLoS One.* 2014;9(2):e88410. doi:10.1371/journal.pone.0088410.
9. Marco-Sola S, Sammeth M, Guigó R, Ribeca P. The GEM mapper: fast, accurate and versatile alignment by filtration. *Nat Methods.* 2012;9(12):1185-1188. doi:10.1038/nmeth.2221.
10. Picard Tools - By Broad Institute. <http://broadinstitute.github.io/picard/>. Accessed March 8, 2017.
11. McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-1303. doi:10.1101/gr.107524.110.
12. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078-2079. doi:10.1093/bioinformatics/btp352.
13. Cingolani P, Platts A, Wang LL, et al. A program for annotating

- and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012;6(2):80-92. doi:10.4161/fly.19695.
14. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491(7422):56-65. doi:10.1038/nature11632.
15. Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA. <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>.
16. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(1):308-311. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11125122>. Accessed June 27, 2016.
17. Cingolani P, Patel VM, Coon M, et al. Using *Drosophila melanogaster* as a Model for Genotoxic Chemical Mutational Studies with a New Program, SnpSift. *Front Genet*. 2012;3:35. doi:10.3389/fgene.2012.00035.
18. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014;11(4):361-362. doi:10.1038/nmeth.2890.
19. Adzhubei I a, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-249. doi:10.1038/nmeth0410-248.
20. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-1081. doi:10.1038/nprot.2009.86.
21. Hebsgaard SM, Korning PG, Tolstrup N, Engelbrecht J, Rouzé P, Brunak S. Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Res*. 1996;24(17):3439-3452. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146109&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed November 4, 2015.
22. Marmor MF, Holder GE, Seeliger MW, Yamamoto S, International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. Standard for clinical electroretinography (2004 update). *Doc Ophthalmol*. 2004;108(2):107-114. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15455793>. Accessed August 8, 2016.
23. Esposito G, De Falco F, Tinto N, et al. Comprehensive mutation analysis (20 families) of the choroideremia gene reveals a missense variant that prevents the binding of REP1 with Rab geranylgeranyl transferase. *Hum*

- Mutat. 2011;32(12):1460-1469. doi:10.1002/humu.21591.
24. Fujiki K, Hotta Y, Hayakawa M, et al. REP-1 gene mutations in Japanese patients with choroideremia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1999;237(9):735-740. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10447648>. Accessed December 2, 2015.
25. Pomares E, Riera M, Castro-Navarro J, Andrés-Gutiérrez A, González-Duarte R, Marfany G. Identification of an intronic single-point mutation in RP2 as the cause of semidominant X-linked retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(11):5107-5114. doi:10.1167/iovs.08-3208.
26. Beltran WA, Cideciyan A V, Lewin AS, Hauswirth WW, Jacobson SG, Aguirre GD. Gene Augmentation for X-Linked Retinitis Pigmentosa Caused by Mutations in RPGR. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(2):a017392-a017392. doi:10.1101/cshperspect.a017392.
27. Singh S, Chao LY, Mishra R, Davies J, Saunders GF. Missense mutation at the C-terminus of PAX6 negatively modulates homeodomain function. *Hum Mol Genet*. 2001;10(9):911-918. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309364>. Accessed December 2, 2015.
28. Manes G, Cheguru P, Majumder A, et al. A truncated form of rod photoreceptor PDE6 β -subunit causes autosomal dominant congenital stationary night blindness by interfering with the inhibitory activity of the γ -subunit. *PLoS One*. 2014;9(4):e95768. doi:10.1371/journal.pone.0095768.
29. Francis PJ, Fishman GA, Trzupke KM, MacDonald IM, Stone EM, Weleber RG. Stop mutations in exon 6 of the choroideremia gene, CHM, associated with preservation of the electroretinogram. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 2005;123(8):1146-1149. doi:10.1001/archopht.123.8.1146.
30. Jacobson SG, Cideciyan A V, Sumaroka A, et al. Remodeling of the human retina in choroideremia: rab escort protein 1 (REP-1) mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(9):4113-4120. doi:10.1167/iovs.06-0424.
31. Khan KN, Islam F, Moore AT, Michaelides M. Clinical and Genetic Features of Choroideremia in Childhood. *Ophthalmology*. 2016;123(10):2158-2165. doi:10.1016/j.optha.2016.06.051.
32. Hingorani M, Williamson KA, Moore AT, van Heyningen V. Detailed ophthalmologic evaluation of 43 individuals with PAX6 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(6):2581-2590. doi:10.1167/iovs.08-2827.

33. Aggarwal S, Jinda W, Limwongse C, Atchaneeyasakul L, Phadke SR. Run-on mutation in the PAX6 gene and chorioretinal degeneration in autosomal dominant aniridia. *Mol Vis.* 2011;17:1305-1309.
34. Li Y, Salfelder A, Schwab KO, et al. Against all odds: blended phenotypes of three single-gene defects. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(9):1274-1279.
35. Chong JX, Buckingham KJ, Jhangiani SN, et al. The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. *Am J Hum Genet.* 2015;97(2):199-215.

Table 1. Clinical characteristics of choroideremia patients and carrier women

Main																			
ID	Gene	Age (onset)	Refraction	BCVA	IOP (mmHg)	Lens	Other ocular associations	Scotoma perception	Macular features	Pericentral features	Peripheral features	Optic nerve	Retinal vessels	FAF	Visual field (stimulus)	ERG (scotopic)	ERG (photopic)	ERG (scotopic)	ERG (photopic)
2NCE III-2	M	54(5)	RE: +1.25-0.50 x 0 LE: +0.75	RE: NLP LE: NLP	RE: 16 LE: 16	BE: nl LE: 16	none	none	atrophy with pigment clusters RPE patches	general atrophy with depigmentation	general atrophy	paired with marked peripapillary atrophy	general vascular narrowing	foveal patches hypoAF	RE: (V, white) NR LE: (V, white) NR	BE: null	BE: null	RE: 73 LE: 83	BE: null
2NCE III-8	M	50(10)	RE: +1.25-1.75 x 80 LE: +1.25-1.75 x 90	RE: 20/60 LE: 20/40	RE: 18 LE: 18	BE: nl LE: 18	none	RE: peripheral ring LE: peripheral ring	atrophy with pigment clusters RPE patches	general atrophy with depigmentation	general atrophy	paired with peripapillary atrophy	arteriolar narrowing	foveal patches hyperAF	RE: (V, white) LE: (V, white)	BE: null	BE: null	RE: 83 LE: 86	BE: null
2NCE III-12	W	47	without	RE: +3.00-0.75 x 75 LE: +3.00-1.00 x 75	RE: 15 LE: 15	BE: nl LE: 15	none	none	granular pattern milar drusen-like spots	mild atrophy with depigmentation with rough pigment clusters granular pattern spots	alterations with rough peripapillary atrophy	mild-paled with peripapillary atrophy	ni	speckled pattern (hyperAF) reticular pattern (hyperAF) marked peripapillary hypoAF	RE: (III, white) nr LE: (III, white) nr	BE: nl	BE: nl	RE: 193 LE: 121	BE: nl
2NCE IV-3	W	18	without	RE: -0.25 LE: +0.75	RE: 20/20 LE: 20/20	RE: 16 LE: 16	none	none	granular pattern	mild atrophy with depigmentation with rough pigment clusters granular pattern spots	alterations with rough peripapillary atrophy	mild-paled with peripapillary atrophy	ni	speckled pattern (hyperAF) reticular pattern (hyperAF)	RE: (III, white) nr LE: (III, white) nr	BE: nl	BE: reduced amplitude	RE: 174 LE: 157	BE: nl
2NCE IV-4	W	16	without	RE: -0.50 LE: -0.50-0.50 x 0	RE: 20/20 LE: 20/22	RE: 13 LE: 13	none	none	granular pattern	mild atrophy with depigmentation with rough pigment clusters granular pattern	alterations with rough peripapillary atrophy	ni with peripapillary atrophy	mild arteriolar narrowing	speckled pattern (hyperAF) reticular pattern (hyperAF)	RE: (III, white) nr LE: (III, white) nr	BE: nl	BE: reduced amplitudes	RE: 181 LE: 174	BE: nl
2NCE IV-5	W	16	without	RE: -0.25 LE: -0.25	RE: 20/20 LE: 20/20	RE: 14 LE: 14	none	none	unaffected	ni	discrete localized	ni	ni	very few flecks hypoAF	RE: (III, white) nr LE: (III, white) nr	BE: nl	BE: reduced amplitudes with	RE: 149 LE: 147	BE: nl
2NCE IV-6	W	14	without	RE: -0.50-0.25 x 85 LE: -1.00-0.25 x 135	RE: 20/20 LE: 20/20	RE: 13 LE: 13	none	none	mild granular pattern	mild atrophy with depigmented areas	alterations with rough granular pattern	ni with peripapillary atrophy	ni	very few flecks hypoAF	RE: (III, white) nr LE: (III, white) nr	BE: nl	BE: nl	RE: 158 LE: 163	BE: nl
8NCE III-5	M	37(9)	myopia peripheral field defect	RE: -8.00-0.25 x 100 LE: -8.50-0.25 x 75	RE: 11 LE: 12	RE: 11 LE: 12	RE: cataractal SRM + yuxtafoveal fibrosis	RE: central ring	perifoveal atrophy altered RPE	general atrophy with depigmentation	general atrophy	paled	arteriolar narrowing	foveal patches hypo and hyperAF	RE: (V, white) NR LE: (V, white) NR	BE: null	BE: null	RE: 103 LE: 139	BE: null
8NCE III-7	M	40(3)	myopia peripheral field defect	RE: -4.75-0.50 x 5 LE: -5.00-0.25 x 15	RE: 12 LE: 13	BE: incipient SCP	LE: esotropia	none	atrophy with pigment clusters altered RPE	general atrophy with depigmentation	general atrophy	paired with marked peripapillary atrophy	general vascular narrowing	foveal patch hypoAF	RE: (V, white) NR LE: (V, white) NR	BE: null	BE: null	NR	NR
8NCE III-8	W	40 (birth)	anisotropia	RE: LP LE: LP	RE: 20 LE: 21	RE: 20 LE: 21	BE: biophthorthisis; corneal opacification; LE: pseudo-limbic deficiency; Salzmann's nodular corneal degeneration; RE: vitreous opacities	none	depigmented	depigmented	alterations paled	alterations paled	mild	NR	RE: (V, white) NR LE: (V, white) NR	NR	NR	NR	NR
8NCE IV-2	W	18	without	RE: -0.75 LE: -0.25-0.50 x 115	RE: 20/20 LE: 20/20	RE: 11 LE: 11	none	none	unaffected	mild pigment alterations	alterations with rough granular pattern	ni with peripapillary atrophy	ni	speckled pattern (hypoAF)	RE: (V, white) nr LE: (V, white) nr	BE: null	BE: null	RE: 79 LE: 77	BE: reduced amplitudes with
8NCE IV-3	W	16	myopia photophoby anisotropia + torticollis	RE: -0.50-2.50 x 0 LE: -0.25-2.25 x 3	RE: 20/200 LE: 20/400	RE: 12 LE: 12	BE: posis BE: Axenfield anomaly	none	granular pattern	mild atrophy with depigmented areas	isolated areas of atrophy with rough granular pattern	ni with peripapillary atrophy	ni	spots and patches of hypo and hyperAF	RE: (IV, white) nr LE: (IV, white) nr	BE: null	BE: null	RE: 100 LE: 95	BE: null

M, main; W, woman; RE, right eye; LE, left eye; BE, both eyes; BCVA, best corrected visual acuity; NLP, not light perception; SCP, subcapsular posterior cataract; IOP, intraocular pressure; FAF, fundus autofluorescence; ERG, electroretinogram; reference for normal AI > 150); SRMWM, subretinal neovascular membrane; RPE, retinal pigment epithelium; AF, autofluorescence; NR, not recordable or not registrable; nl, normal; Visual field was carried out with 24.2 FASTPAC or 24.2 SITO-FAST

FIGURES

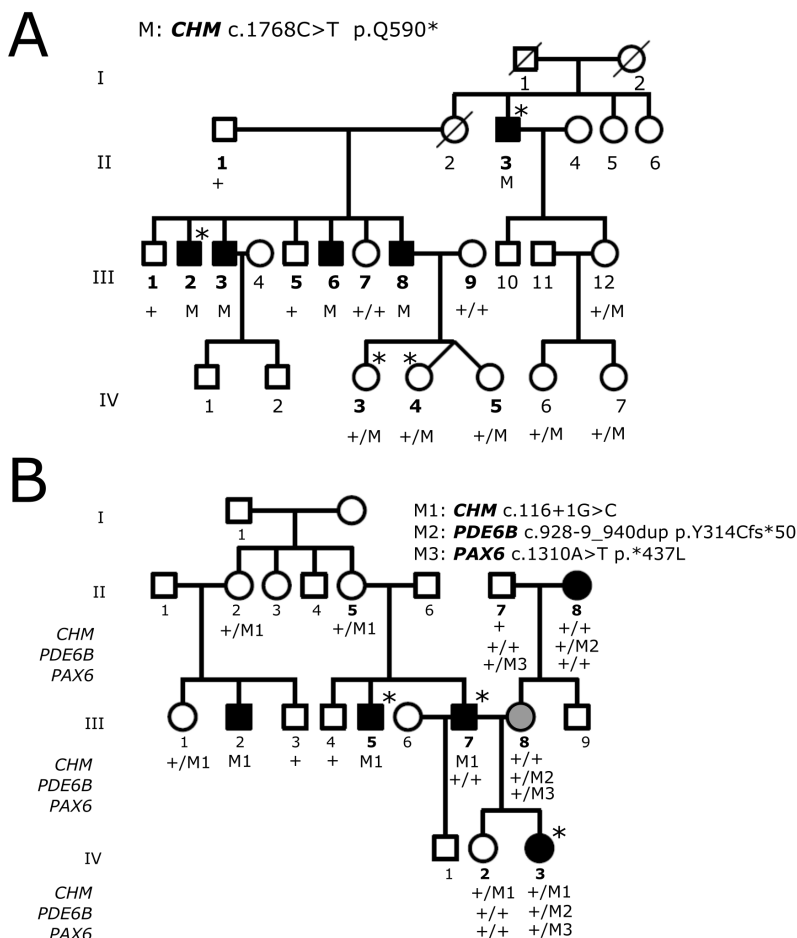


Figure 1. Pedigrees of two Spanish families affected with choroideremia. A. Family 2NCE showed cosegregation of the variant c.1768C>T with the disease; all affected males (II-3, III-2, III-3, III-6, III-8) were hemizygous for this mutation, whereas non-affected males bore the WT allele (III-1, III-5). Non-affected females were either homozygous for the WT allele (III-7, III-9) or heterozygous for the pathogenic variant (III-12, IV-3, IV-4, IV-5, IV-6, IV-7). **B** Family 8NCE showed cosegregation of the *CHM* splice variant, c.116+1G>C with the disease. All affected males (III-2, III-5, III-7) were hemizygous for the mutation whereas the non-affected males (III-3, III-4) were hemizygous for the WT allele. Females were either heterozygous for the mutated (III-1) or homozygous for the WT (III-8) variants. Female II-8 carried a mutation, c.928-9_940dup, in the *PDE6B* gene. Daughters, IV-2 and IV-3, were obligate carriers of the c.116+1G>C mutation in *CHM*. Moreover, patient IV-3 also inherited the dominant pathogenic *PAX6* c.1310A>T p.*437L (aniridia) plus the *PDE6B* c.928-9_940dup (RP) variants. Individuals in bold were genotyped with the RD chip. Patients marked with * were sequenced by WES.

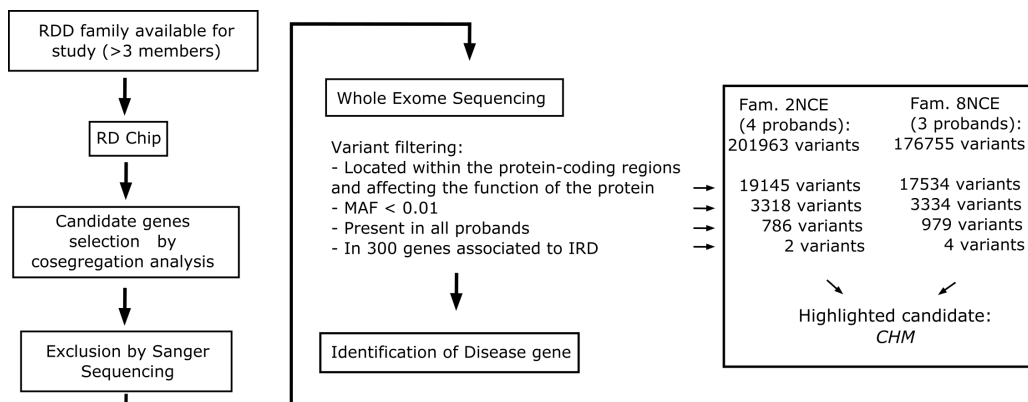


Figure 2. Workflow of the combined genetic and exome sequencing (WES) strategies for the identification of the IRD causative gene in two Spanish families. After a comprehensive cosegregation analysis by an RD-chip based on SNP genotyping of the 100 major RD-causing genes (de Castro-Miró et al. 2014), and direct Sanger sequencing of the non-discarded candidates, WES analysis was undertaken. Pathogenic variants from WES data were highlighted following a series of filtering steps. In both families, pathogenic mutations were identified in the *CHM* gene, later confirmed by Sanger sequencing.

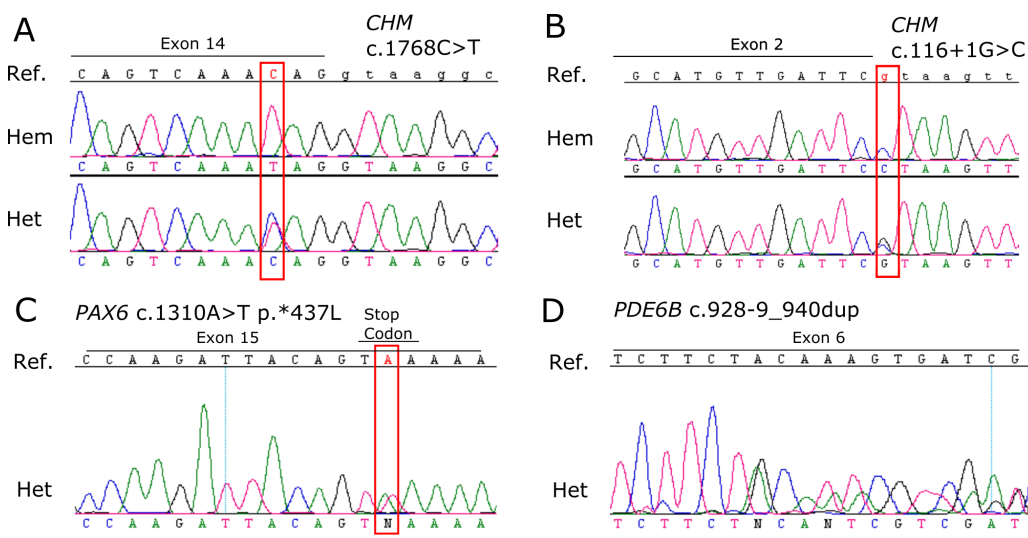


Figure 3. Electropherograms of the pathogenic mutations in *CHM*, *PAX6* and *PDE6B* in the two choroideremia Spanish families. In family 2NCE, the sequencing data shows a nonsense mutation, c.1768C>T in *CHM*. Identified pathogenic variants (boxed or underlined in red) in family 8NCE were the splicing-altering mutation c.116+1G>C in intron 2 in *CHM*, the c.1310A>T p.*437L mutation in *PAX6*, and the duplication c.928-9_940dup in *PDE6B*. For clarity, only the beginning of the duplicated sequence is shown (from nucleotide c.941).

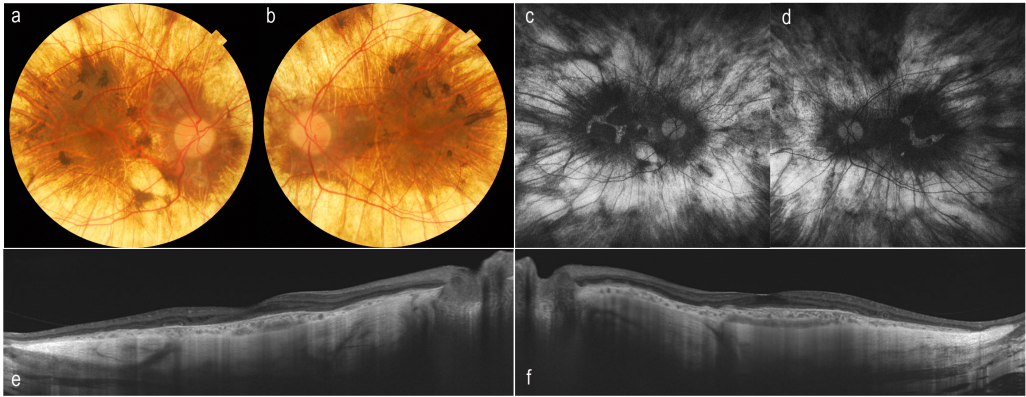


Figure 4. Fundus photograph, fundus autofluorescence (FAF) and optic coherence tomography (OCT) of the male patient III-8 in family 2NCE. Patient III-8 (50-years-old patient). Color macular retinography (a and b) showed symmetrical profound chorioretinal atrophic areas with preservation of central macula and peripapillary retina, narrowed retinal vessels and prevalent large choroidal vessels. FAF (c and d) revealed widespread chorioretinal atrophy associated with extensive loss of retinal pigment epithelium. Central and peripapillary area showed hypo-autofluorescence, although a central residual irregular area of hyper-autofluorescence was still observed on the foveal region. Swept-source OCT (e and f) showed a narrow central residual area of choriocapillaries and choroid. Right eye: a, c and e. Left eye: b, d and f.

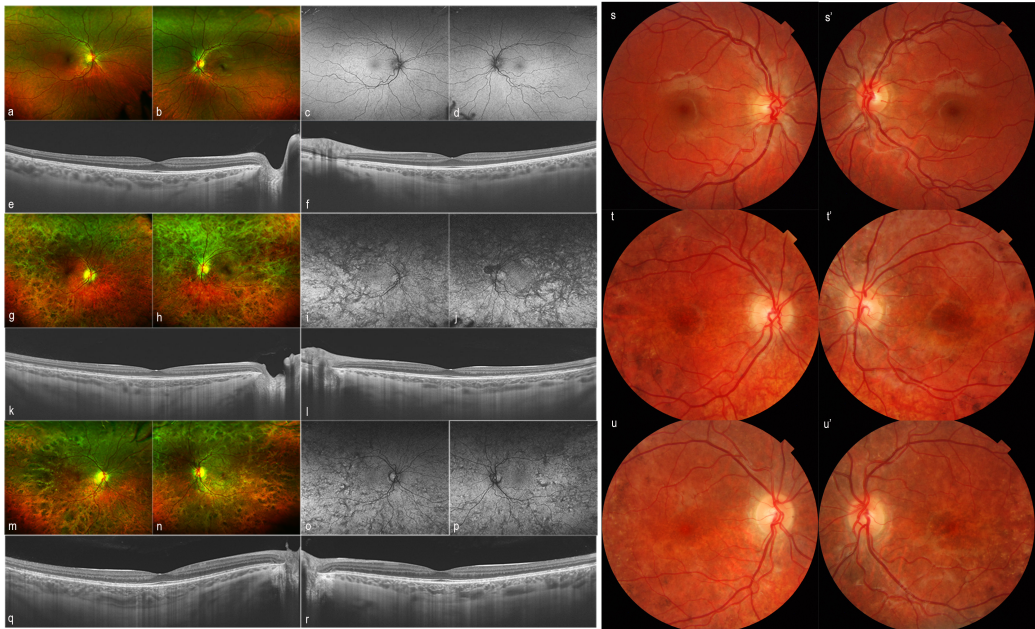


Figure 5. Fundus photograph, fundus autofluorescence (FAF) and optic coherence tomography (OCT) of the carrier daughters IV-3, IV-4 and IV-5 in family 2NCE. Color macular retinography of both eyes (a, b and s, s') in a 16-years-old carrier female (IV-5) (with scanty or very few/little) fundus macular affection. In contrast, her non-identical twin sister (IV-4, g, h and t, t'), and their older sister (IV-3, 18-years-old, m, n and u, u') both showed macular affection (in detail: t, t', u, u'). Affected macular regions showed a characteristic granular pattern of pigmentation with scattered clumps of pigment in the posterior pole, mild pale optic disk with some degree of peripapillary atrophy. Particularly, proband IV-4 showed fundus macular affection, with extensive areas of atrophy with depigmentation and rough granular pattern on the upper retinal regions of both eyes by wide-field retinography (g, h and t, t'). Clumps of pigment in the lower retinal regions of mid-periphery fundus were also seen in both eyes. Proband IV-3, with fundus macular affection, showed similar features to her sister (IV-4) by wide-field retinography (m, n and u, u'). Concerning FAF, a very fine reticular pattern (flecks) of hypo-autofluorescence in the temporal side of the macular regions was observed in affected sisters IV-4 (i and j) and IV-3 (o and p), but is seemingly non-affected in sister IV-5 (c and d). Nonetheless, swept-source OCT of this same proband showed some phenotypic symptoms, since a slight choroid narrowing in the nasal side of the macular region (e and f), particularly in the left eye (f) could be observed. Swept-source OCT of probands IV-4 and IV-3 showed a diffuse narrowing of central area of choriocapillaries and choroid, affecting mainly the large vessels layer. Notably, OCT neurosensory retina macular profiles appeared normal in all cases. Right eye: a, c, e, g, i, k, m, o, q, s, t and u. Left eye: b, d, f, h, j, l, n, p, r, s', t' and u'.

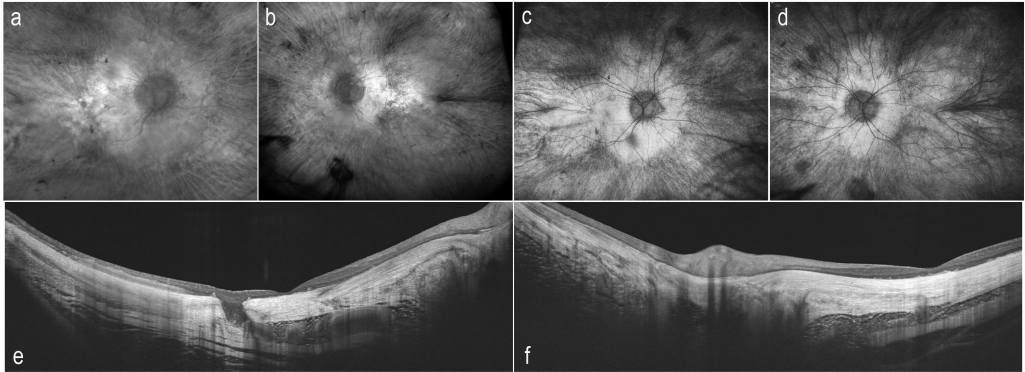


Figure 6. Fundus photograph, fundus autofluorescence (FAF) and optic coherence tomography (OCT) in proband III-7 of family 8NCE. Wide-field red-free retinography (a and b) showed severe chorioretinal atrophy of posterior pole and macular region associated to severe narrowing of retinal vessels. FAF (c and d) revealed total loss of retinal pigment epithelium. Swept-source OCT (e and f) showed absence of choriocapillaries and choroid, with an extended thinning of the neurosensory retina. Right eye: a, c and e. Left eye: b, d and f.

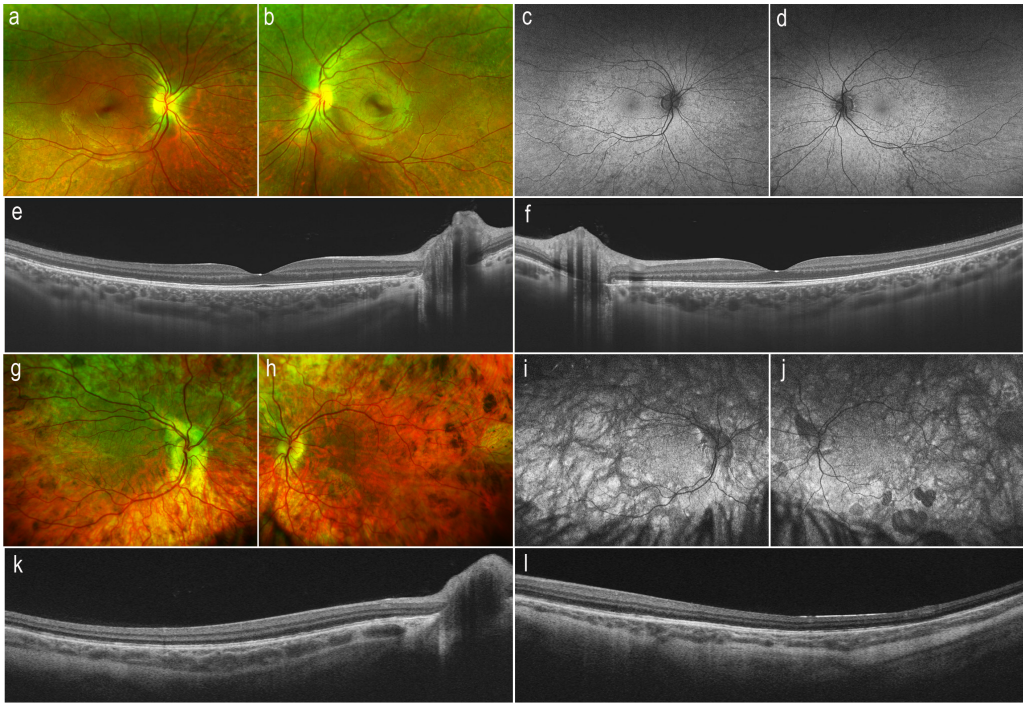


Figure 7. Fundus photograph, fundus autofluorescence (FAF) and optic coherence tomography (OCT) in female carriers of family 8NCE. (a to f) Proband IV-2, a 18-years-old carrier female, with very discrete fundus macular affectation. Wide-field retinography (a and b) showed scattered alterations of the retinal pigment epithelium in posterior pole and mid-periphery of both eyes, with a mild granular pattern. FAF (c and d) revealed a speckled pattern of hypo-autofluorescence scattered in posterior pole and mid-periphery regions of both eyes. Swept-source OCT (e and f) showed apparently normal features of central area of choriocapillaries and choroid with a normal profile of neurosensorial retina. (g to l) Proband IV-3, a 16-years-old carrier female with fundus macular affectation. Wide-field retinography (g and h) showed extensive area of atrophy and depigmentation of retinal pigment epithelium with rough granular pattern on the upper retinal region, particularly in her right eye (g). Clumps of pigment were seen in posterior pole and mid-periphery fundus of both eyes. FAF (i and j) exhibited spots and patches of hypo- and hyper-autofluorescence. Swept-source OCT (k and l) showed a diffuse narrowing of choriocapillaries in her right eye (k) and choroid, affecting mainly the large vessels layer, particularly in her left eye (l). OCT images of Proband IV-3 are not centered in the foveal region due to severe nystagmus (k and l). Right eye: a, c, e, g, i and k. Left eye: b, d, f, h, j and l.

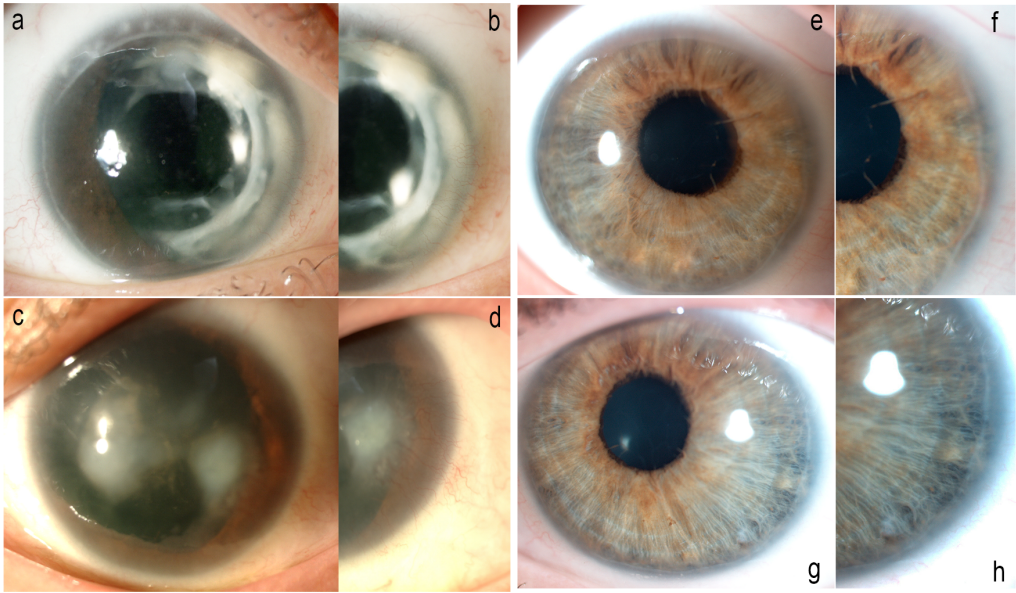
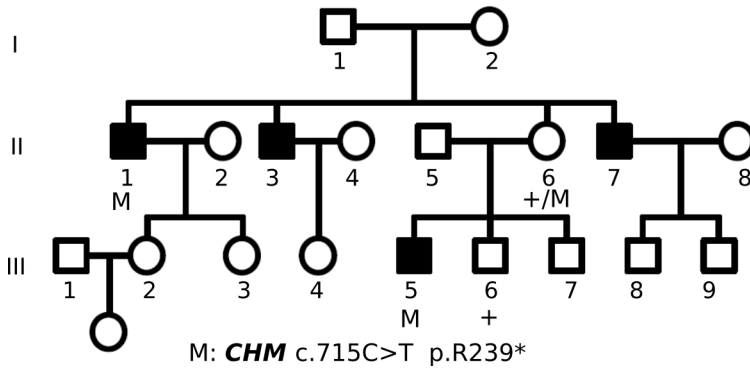


Figure 8. Biomicroscopy of the ocular anterior segment of two aniridia-affected females in family 8NCE. Patient III-8 (a-d) presented clear aniridia features with bilateral corneal haze and iris hypoplasia, affecting de nasal sector of the eye anterior segment in approximately 180°. Note bilateral Salzmann’s nodular corneal degeneration. Right eye (aphakic; a and b) and left eye (pseudophakic; c and d) exhibited partial limbic deficiency with fine corneal neovessels formation (b and d) and abnormal corneal epithelium. Her daughter IV-3 (e-h) showed milder aniridia traits with bilateral Axenfeld anomaly, posterior embryotoxon (details in f and h) associated with corectopia (e and g), sectorial atrophy of iris (e, g and detail in h), and iris remnants/bridges in pupil (detail in f).

Supplementary Figure S1. Segregation of CHM mutation in family 50ORG.



Discussió

Diagnòstic de les distròfies de retina: del xip DR a l'exoma

Les distròfies de retina (DR) són un grup de malalties, en la seva majoria degeneratives, que porten el pacient a una ceguesa, parcial o total, i irreversible. Una de les característiques més significatives d'aquest grup de patologies és la seva enorme heterogeneïtat genètica, amb més de 250 gens causals descrits fins ara (aproximadament un 1% dels gens del genoma), possiblement amb diversos gens per identificar encara. També és important destacar que a nivell clínic les DR presenten una gran heterogeneïtat fenotípica, amb trets solapats que compliquen molt el diagnòstic en estats avançats de la malaltia. A més, un mateix gen, segons el tipus de mutació, pot causar patologies substancialment diferents.

En els darrers anys s'ha avançat molt en l'estudi d'aquestes patologies, i s'han identificat un gran nombre de gens causals. D'entrada, això té una gran importància pel pacient, ja que el diagnòstic genètic fixa el diagnòstic clínic, permet identificar els portadors asimptomàtics, ajuda a establir un pronòstic fiable i obre les portes a l'accés de les futures generacions de les famílies tant al consell genètic com a possibles vies de teràpia gènica, actualment en desenvolupament per a alguns gens (com per exemple *RPE65* (Bainbridge et al. 2015), *CHM* (Barnard, Groppe, and MacLaren 2014), *MERTK* (Ghazi et al. 2016) i la malaltia de LHON (Yang et al. 2016)). A més, permet aprofundir en els mecanismes moleculars i bioquímics subjacents a la malaltia, tot contribuint a la comprensió dels processos que tenen lloc i de les vies metabòliques implicades. Aquesta informació pot ajudar a identificar noves dianes terapèutiques.

Tot i això, avui dia les malalties que presenten una gran heterogeneïtat genètica, com les DR, segueixen constituint un gran repte en el camp del diagnòstic genètic: la gran quantitat de possibles gens i canvis causals, cap d'ells majoritari, complica la identificació de l'alteració, única, responsable del trastorn. Actualment, la seqüenciació massiva va deixant de banda els mètodes de cribratge tradicionals (com ara la cerca de mutacions en candidats funcionals mitjançant seqüenciació manual Sanger o l'anàlisi directa de mutacions ja conegudes per altres mètodes), que són substituïts per mètodes de seqüenciació altament processius i totalment automatitzats que permeten inspeccionar el genoma o l'exoma sencer d'un individu en poc temps. No obstant, aquests mètodes encara presenten certes limitacions: en primer lloc, el cost, però també la capacitat d'analitzar bioinformàticament les grans quantitats de dades que es generen i de separar el gra de la palla, és a dir, els canvis patogènics d'aquells que no ho són.

El desenvolupament d'estratègies per intentar facilitar l'abordatge del diagnòstic de les DR és un tema recurrent. Per això, en el grup es va dissenyar i desenvolupar un mètode d'anàlisi indirecta, basat en l'estudi de cosegregació amb marcadors SNP, que permetia, per una banda, analitzar simultàniament els 100 gens més prevalents causants de DR no sindròmiques, amb herència dominant, recessiva o lligada al sexe, i de l'altra, descartar aquells que no eren causants de la malaltia, per dirigir a continuació l'estudi als gens no descartats mitjançant seqüenciació Sanger. Per això es van seleccionar entre 7 i 10 polimorfismes d'un únic nucleòtid (SNP, de l'anglès, *Single Nucleotide Polymorphism*) per cada gen, tenint en compte que havien d'estar situats dins del gen o en regions properes per tal de minimitzar les probabilitats de recombinació entre el polimorfisme i la mutació i, per tant, les probabilitats d'error en el diagnòstic. A més, les variants havien de ser el més informatives possible (és a dir, que tinguessin una freqüència de l'al·lel minoritari o MAF el més propera possible a 0,5) i pertànyer a diferents blocs haplotípics per evitar redundàncies genètiques.

Com a resultat d'utilitzar el xip DR seguit de seqüenciació Sanger a un conjunt de 36 famílies, es van diagnosticar el 47% dels casos. La taxa d'èxit d'aquesta eina varia molt segons el tipus de famílies que s'analitzen, tant per la seva grandària com pel patró d'herència. L'anàlisi de cosegregació és tant més informativa com més mostres de la família hi hagi disponibles, afectats o no, ja que això facilita l'establiment de les diferents fases a cada generació i per tant, la determinació dels al·lells heretats per cada individu. També se simplifica l'anàlisi si es poden aplicar restriccions genètiques, referides al tipus d'herència esperada o a l'existència de consanguinitat. Així, per exemple, és relativament fàcil descartar gens en casos de famílies recessives amb consanguinitat, on esperem trobar la mutació i els marcadors que la flanquegen en homozigosi i només en els individus afectats. En canvi, si l'herència és dominant la tasca es complica perquè els pacients només comparteixen un al·lel i no dos (calen, per tant el doble d'individus que en una malaltia recessiva per obtenir la mateixa informació) i, a més, tot sovint hi ha individus que són portadors de la mutació però no manifesten símptomes de la patologia (penetrants incomplets).

La principal limitació d'aquesta eina, però, és que només es pot aplicar en casos familiars, ja que perquè l'aproximació tingui èxit, cal analitzar el resultat de diverses meiosis i per tant de diversos individus. A més, tot i ser una eina molt útil per fer una primera aproximació diagnòstica, segueix requerint un pas posterior de seqüenciació de tots els gens no descartats, que en alguns casos són

molt grans i en d'altres molt nombrosos. El xip, en general, no permet descartar tots els gens analitzats: en el nostre estudi, tot i que en la majoria de famílies es van descartar com a mínim el 90% dels gens, en cinc casos quedaven entre 15 i 55 gens sense descartar (sobretot en famílies dominants amb pocs membres afectats) i no es va procedir a la cerca de mutacions per seqüenciació Sanger.

L'adveniment de les tècniques de seqüenciació massiva de nova generació ha revolucionat el camp del diagnòstic de les malalties mendelianes genèticament heterogènies com les distròfies de retina. La capacitat de generar dades de seqüenciació amb una cobertura profunda en un termini de temps curt està substituïnt els enfocaments centrats en regions específiques per a la identificació de gens i mutacions. En concret, la seqüenciació d'exomes (*Whole-Exome Sequencing*, WES) permet analitzar els prop de 180.000 exons de tots els gens, que representen aproximadament un 1% del genoma i on fins ara s'han identificat el 85% de les mutacions causants de patologies, a un preu cada cop més assumible pels laboratoris. D'aquesta manera és redueix molt el temps i el cost que requeria analitzar tots els possibles gens candidats en un individu amb DR sense cap tipus de pista que ajudés a acotar les dianes de l'estudi.

En el nostre cas vam aplicar la seqüenciació WES a un total de 33 famílies, identificant la variant patogènica en 18 d'elles, un 55% dels casos, percentatge similar o superior a l'obtingut en molts treballs en què es fa servir una estratègia basada en NGS, on l'èxit diagnòstic varia entre el 30 i el 60% (Bernardis et al. 2016; Ellingford, Barton, Bhaskar, O'Sullivan, et al. 2016; Ge et al. 2015; Glöckle et al. 2013; Li et al. 2014; Neveling et al. 2012; Wang et al. 2014; Zhao et al. 2014). A més, en 10 famílies més es proposa un candidat molt probable com a responsable de la patologia. Si es confirma la relació d'aquests gens amb el fenotip, hauríem resolt 28 de les 33 famílies en estudi, un 85% del total. Així, doncs, el percentatge d'èxit obtingut en la nostra anàlisi de l'exoma se situaria entre el 55% i el 85%, tot superant en 12-38 punts el que s'obtenia amb la combinació del xip DR i seqüenciació Sanger, un 47%.

En conjunt, sumant les dues estratègies emprades (Figura 10), s'han analitzat 69 famílies, en 37 de les quals (53,6%) s'ha assolit un diagnòstic molecular definitiu, i s'ha proposat un candidat en 10 més (14,5%) amb la identificació de la mutació causal en un gen prèviament descrit com a responsable de la patologia. S'ha de tenir en compte que de les 19 famílies no diagnosticades pel xip DR només en 9 s'ha seqüenciat l'exoma, i en 8 d'elles s'ha identificat la mutació causal. Cinc d'aquestes alteracions moleculars estan situades en gens que no es trobaven

inclosos en el xip DR: *BBS2* i *C21orf2* no s'havien relacionat encara amb les DR no sindròmiques quan es va dissenyar el xip; *CHM* causa una patologia *a priori* diferenciada de les altres DR, la coroiderèmia, i per aquest motiu no es va incloure al xip; i *CEP250* és un nou gen candidat.

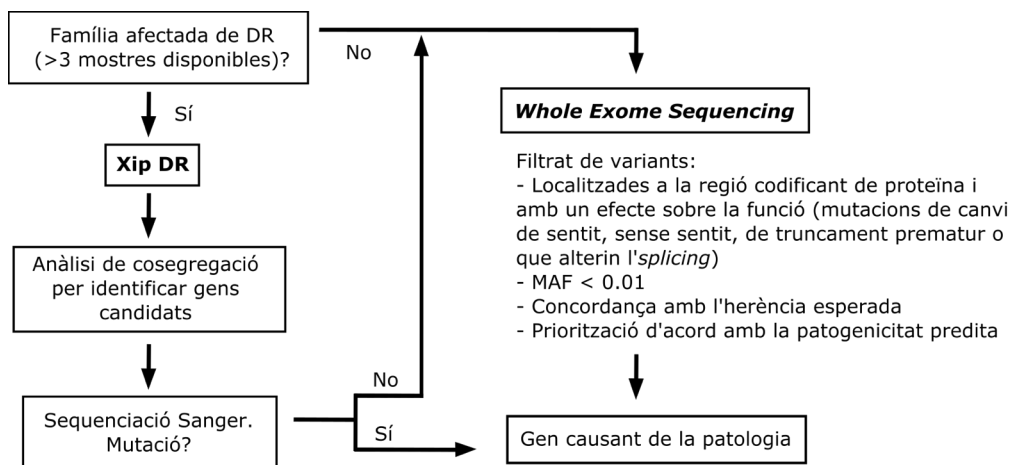


Figura 10. Protocol utilitzat en el diagnòstic de les famílies afectades de DR.

Els altres tres casos sí que estan causats per gens inclosos en el xip DR. La causa per la qual es va descartar el gen en cada cas és diferent. En la família 9RE (amb mutació dominant a *GUCY2D*, Figura 2 de la Publicació 1) es va descartar el gen per manca de cosegregació d'un dels marcadors donat que en un membre de la família s'havia produït una recombinació entre el marcador rs3027213 i la mutació, separats per 105 Kb. A priori, la probabilitat de recombinació, assumint la relació 1 Mb = 1% recombinació (valor mitjà en el genoma, subjecte a variacions regionals) era inferior a 1/1000, però en aquest cas s'ha produït l'entrecreuament. En el cas de la família E5 (Figura 3 de la Publicació 1), amb tres mutacions a *USH2A*, es va assumir erròniament que hi havia consanguinitat entre els progenitors del pacient i per això es va descartar aquest gen per manca d'homozigositat a la regió. Al final, no hi havia consanguinitat i el pacient era portador de mutacions en heterozigosi. Per últim, la família 10NCE, de la qual només es van analitzar cinc individus amb el xip DR, presentava la deleció parcial del gen en heterozigosi, motiu pel qual la informació obtinguda amb la genotipació de SNPs no es va interpretar correctament. En tractar-se d'una deleció

en heterozigosi, els SNPs localitzats dins la regió suprimida no estan genotipats en l'al·lel patogènic, i per tant són assumits erròniament com a posicions homozigotes per la variant de l'al·lel no patogènic que sí que hi és present. En resum, aquests tres casos il·lustren perfectament algunes limitacions de la metodologia emprada, que es basa en l'anàlisi de cosegregació: la possible presència de recombinacions, l'ambigüitat que hi ha a vegades en la determinació del model genètic subjacent, i l'ocurrència de determinades alteracions moleculars, com les delecions, que poden conduir a interpretacions errònies dels resultats.

Totes dues estratègies, anàlisi de cosegregació seguit de seqüenciació Sanger per una banda i seqüenciació d'exomes per l'altra, tenen la gran avantatge que permeten analitzar de forma simultània una gran quantitat de gens. Això, en un grup de patologies com les DR, genèticament molt heterogènies i que a més presenten solapament fenotípic entre elles, resulta molt útil. De fet, en molts casos no és fins que s'assoleix el diagnòstic genètic que s'acaba de definir el diagnòstic clínic del pacient.

En certs casos, el diagnòstic genètic pot ser crucial per a la prognòsis del pacient, és a dir, per anticipar l'evolució de la patologia. Tot i que la degeneració neurològica té difícil tractament, la coexistència de les DR amb moltes síndromes que inclouen patologies que sí que es poden beneficiar de certes intervencions terapèutiques, fa que l'assignació d'un diagnòstic concret pugui tenir conseqüències positives per al pacient. L'individu 64ORG n'és un bon exemple. Fou referit al nostre laboratori amb un diagnòstic de retinosi pigmentària. La seqüenciació del seu exoma va permetre identificar dues variants patogèniques recessives al gen *PHYH*, responsable de la malaltia de Refsum, que cursa amb símptomes neurològics i cardíacs importants (Wanders, Waterham, and Leroy 2015). Afortunadament, el desenvolupament de la patologia es pot aturar mitjançant l'eliminació de la ingesta de l'àcid fitànic, l'acumulació del qual als teixits, a causa de la inactivitat de l'enzim peroxisomal PHYH, és responsable del trastorn. Com aquest cas, hi ha d'altres patologies que cursen amb DR i que poden ser controlades mitjançant l'alimentació; per exemple, el dèficit de biotinidasa causa atrofia òptica i mitjançant la ingesta diària de biotina s'allegereixen considerablement els símptomes de la malaltia (Wanders et al. 2015; Wolf 2016).

Una altra de les característiques de les DR és l'heterogeneïtat fenotípica, per la qual mutacions en un mateix gen poden causar diferents patologies. Un exemple

identificat en aquest treball és el del gen *RD3*, que fins ara només s'havia descrit com a causant de LCA, però que gràcies a la utilització del xip s'ha trobat mutat en un pacient diagnosticat com a RP. El gen no hagués estat analitzat en aquesta família si s'hagués optat per un altre mètode de diagnòstic com la detecció de mutacions conegudes o la seqüenciació de gens candidats, que eren les alternatives en aquell moment. Aquest cas exemplifica la importància d'obrir al màxim el ventall de gens que s'analitzen en els protocols de diagnòstic de les DR, incloent al llistat de possibles dianes aquells gens que s'han relacionat amb patologies similars.

El mateix succeeix amb el patró d'herència. Com ja s'ha esmentat, en cada cas s'estima el patró hereditari més probable, però no sempre hi ha un únic patró possible. Fins que no s'identifica la causa molecular i, si és possible, s'estudia la cosegregació de la mutació o mutacions amb el fenotip, no es pot ratificar el tipus d'herència. En el nostre cas, gràcies a la utilització del xip s'ha identificat una mutació al gen *RP2*, situat al cromosoma X, en una família amb homes i dones afectats en diferents generacions (11NCE), que inicialment s'havia etiquetat com a RP amb herència dominant. Cal, doncs, ser oberts en l'assignació del patró d'herència i considerar més d'una opció si és el cas.

Ahora, mitjançant l'exoma s'han redefinit dos casos en què la malaltia apareixia per primer cop en la família, fet que fa pensar d'entrada en una herència autosòmica recessiva. El proband 82ORG presenta una mutació al gen *UNC119* que s'hereta de forma dominant, mentre que el pacient 76ORG té mutat el gen *RPGR*, que s'hereta lligat al sexe. En cap dels dos casos es coneixien membres de generacions anteriors afectats a la família, de manera que el més probable és que les mutacions siguin *de novo* o que, en el cas del gen *RPGR*, la mutació s'hagi transmès entre dones passant desapercebuda. La determinació del patró d'herència canvia per complet el consell genètic que la família pot rebre en tots aquests casos, especialment en el cas de dones portadores asimptomàtiques que tenen un alt risc de tenir un fill mascle afectat.

Finalment, destacar la importància d'un diagnòstic molecular acurat, que pot permetre dirigir el pacient cap a solucions terapèutiques que depenen del gen que està alterat. En aquest sentit, hem identificat fins a tres casos diagnosticats com a RP que presentaven mutacions al gen de la coroiderèmia (*CHM*). Aquest gen és un dels més avançats en el desenvolupament d'una teràpia gènica amb virus adeno-associats. Hi ha tres assajos clínics en marxa i un d'ells ja està en fase clínica 2, on s'ha comprovat que l'agudesa visual de sis individus afectats

millorava amb el tractament (Hohman 2016; MacLaren et al. 2014). Hi ha també en curs un quart assaig clínic amb implants retinals intel·ligents (IRIS V2, Pxiium Vision).

Identificació de nous gens candidats

A més d'identificar la causa molecular del trastorn en gens ja descrits com a responsables de DR, l'anàlisi de l'exoma ens ha permès identificar mutacions en tres gens candidats (*SCLT1*, *CEP78* i *SEMA6B*) que no s'havien associat prèviament a les DR i en un quart gen (*CEP250*) que només s'havia relacionat amb un cas atípic de Síndrome d'Usher que també és portador d'una mutació en un altre gen, *C2orf71* (Khateb et al. 2014). Aquests gens, tot i que cal dur a terme proves funcionals per demostrar de forma definitiva la seva implicació en la patologia, són molt bons candidats, ja que estan implicats en la ciliogènesi, procés essencial per al bon funcionament dels fotoreceptors, i/o estan relacionats amb altres gens associats a les DR.

SCLT1 és una proteïna que forma part dels apèndixs distals dels centríols, que ancoren la base del cili a la membrana plasmàtica mentre que *CEP250* i *CEP78* formen part dels centrosomes, estructures indispensables per la formació del cili als fotoreceptors. *CEP250* i *SCLT1* han estat descrits prèviament com a causants de ciliopaties en diferents síndromes (Adly et al. 2014; Failler et al. 2014; Tanos et al. 2013), però no s'havien associat a una DR no sindròmica. A més, se sap que *CEP250* interactua directament amb *NEK2*, codificat per un gen responsable de RP en recessivitat (Fry et al. 1998; Nishiguchi et al. 2013). Finalment, *SEMA6B* s'expressa al sistema nerviós i intervé en el desenvolupament de la retina murina tot actuant com a guia per al desenvolupament dels axons en cèl·lules nervioses, però fins ara no s'ha relacionat amb patologies neurodegeneratives (Andermatt et al. 2014; Matsuoka et al. 2013).

Recentment altres grups han confirmat la implicació de *CEP78* en les DR tot identificant mutacions en el gen que la codifica en pacients afectats de CRD amb pèrdua d'audició (fenotip diferent al de la síndrome d'Usher) i confirmant la seva presència a la base del cili connector dels fotoreceptors, on interacciona amb *FAM161A*, codificat per un gen també causant de RP (Fu et al. 2016; Namburi et al. 2016; Nikopoulos et al. 2016).

En el cas de *CEP250*, es van poder realitzar proves *in vitro* que demostren que la mutació identificada (p.A609V) augmenta significativament la longitud del cili.

Aquest increment de la mida del cili ja s'havia observat anteriorment en mutar altres gens involucrats en la funció ciliar. La hipòtesi més probable és que hi ha una afectació del transport retrògrad intraflagel·lar, tot produint-se una acumulació de components de l'axonema a l'extrem del cili que provoquen la seva elongació (Asante, Stevenson, and Stephens 2014). És possible que el fenotip cel·lular dels pacients no sigui aquest, ja que en l'experiment *in vitro* no s'ha anul·lat l'expressió del gen salvatge, mentre que els pacients desenvolupen la malaltia quan tenen els dos al·lels mutats. No obstant, hem pogut comprovar que la mutació provoca una alteració en la funció normal del cili.

Limitacions de l'anàlisi de l'exoma

L'estudi de l'exoma no permet resoldre el 100% dels diagnòstics genètics, per causes biològiques i també metodològiques. Comencem per les limitacions biològiques. L'elevat percentatge de casos DR que no es resolen (un 15% o més en el nostre cas) fa pensar que encara es desconeix un nombre substancial gens responsables de la patologia. La cerca d'aquests gens no és gens fàcil, perquè d'una banda cadascun d'ells representa probablement un percentatge reduït del total de casos i de l'altra calen evidències sòlides a nivell molecular per assegurar que un gen és responsable d'un fenotip patològic. Molts dels canvis identificats en pacients afecten proteïnes que no s'han identificat com a components endògens de la retina, raó per la qual és molt complicat establir una relació causa-efecte. A més, els gens que es coneixen avui en dia com a responsables de DR estan implicats en funcions molt diverses, i en conseqüència resulta difícil prioritzar candidats funcionals d'entre tots els possibles candidats.

Per una altra banda cal tenir en compte les limitacions tècniques que poden afectar l'èxit del diagnòstic. Les regions amb un alt contingut de GC o amb moltes repeticions presenten problemes a l'hora de ser capturades i/o seqüenciades. Aquest és el cas de la seqüència ORF15 del gen *RPGR*. Es tracta d'una regió amb repeticions CT que presenta moltes dificultats quan s'intenta seqüenciar-la amb la metodologia Sanger i que fins ara no s'ha pogut capturar en la seqüenciació de l'exoma. Aquesta dificultat impedeix descartar el gen com a causant de la patologia en els casos en què no s'ha trobat cap mutació en altres regions codificants. S'han desenvolupat protocols específics per poder analitzar la regió ORF15 (Li et al. 2016), on fins ara s'han descrit fins a 220 mutacions, respecte al total de 400 mutacions a tot el gen *RPGR*.

Alhora, en relació a la seqüenciació per WES, cal tenir en compte que l'exoma no és 'complet'. Només s'inclouen els exons reconeguts per certes bases de dades com RefSeq, i per tant mai es podran identificar canvis en exons que no estiguin anotats. A més, com ja s'ha dit, només s'amplifiquen les regions codificants, quedant-ne excloses les regions promotores, reguladores i intròniques. En l'actualitat s'està ampliant l'abast del WES per incloure algunes d'aquestes regions d'interès i d'altres com els gens que codifiquen miRNAs, i així intentar no perdre la possible informació rellevant que aquestes regions poden aportar. Així, per exemple, el kit de captura de seqüències exòmiques NimbleGen SeqCap EZ Human Exome Library v1.0 kit, desenvolupat per l'empresa Roche, permet capturar més de 700 gens de miRNAs, que constitueixen més d'una tercera part del total (Toma et al. 2015). En el context de les distròfies de retina, s'han identificat variants en exons no codificants i en regions 5'UTR descrites com a mutacions causals (Coppieters et al. 2015; Eisenberger et al. 2013): *USH2A* c.7595-2144A>G, *ABCA4* c.4539+2001G>A, c.5196+1136C>A (entre d'altres), i la mutació més comuna en *CEP290*, c.2991+1655A>G. Aquestes regions són actualment objecte d'estudi en pacients amb patologies concretes i poc heterogènies, com és el cas de la malaltia d'Stargardt, quan només s'ha trobat un al·lel patogènic la regió codificant i falta identificar el segon (Bauwens et al. 2015; Bax et al. 2015; Zernant et al. 2014).

S'ha comentat més amunt que no resulta fàcil a vegades establir una connexió clara entre un gen portador d'una mutació suposadament causal i la funció de la retina. A nivell tècnic també hi ha dificultats a l'hora de demostrar que un canvi identificat és patogènic. Així, per exemple, el gen *ABCA4* no s'expressa en sang i per tant cal recórrer a cultius de fibroblast desdiferenciats a cèl·lules mares pluripotents induïdes (iPS) i rediferenciades, mitjançant una combinació concreta de factors de transcripció i altres substàncies, a cèl·lules precursors de fotoreceptors. D'aquesta manera es pot crear un model per analitzar el possible efecte que les variacions provoquen en l'expressió del gen o en la funció de la proteïna (Sangermano et al. 2016).

D'altra banda, hi ha limitacions en l'anàlisi de les dades de seqüenciació obtingudes. Tot i que la detecció de variants puntuals per WES està molt avançada (sempre que s'obtingui una bona cobertura de la regió), la detecció de variants estructurals en heterozigosi com les delecions, duplicacions, translocacions, etc., que afecten exons sencers segueix essent una limitació important. Com que tot sovint no es pot detectar el punt de trencament o

d'inserció mitjançant l'anàlisi de la seqüència ja que aquest pot estar situat en regions intròniques, cal fer una 'quantificació de dosi' utilitzant els exons, procés no sempre senzill a causa de la variabilitat que hi ha en la cobertura dels diferents exons i entre mostres de diferents individus. A més, així com la detecció de variants puntuals en molts casos es pot fer amb una cobertura no massa alta (40x-60x), l'anàlisi de dosi necessita que la cobertura dels exons sigui prou bona (100x) per poder detectar variacions significatives de forma consistent. Això fa que aquesta anàlisi no és pugui realitzar encara de forma rutinària, complicant sobretot la resolució de famílies dominants, on hi ha poques pistes que senyalin l'únic al·lel que està mutat amb una possible alteració estructural.

Identificació d'alteracions estructurals

En aquest estudi hem aconseguit identificar quatre alteracions estructurals en tres gens que serien responsables de la patologia en els pacients. La primera d'elles es va poder trobar gràcies a la confluència de diversos factors que feien probable la presència d'una gran deleció no detectada en l'anàlisi de variants de l'exoma: i) la presència d'una primera mutació d'aturada prematura en heterozigosi al gen *EYS*, fins llavors sempre associat a DR amb herència recessiva, ii) l'absència d'avantpassats i descendents de la pacient amb la patologia que feien que l'herència dominant fos poc probable i, iii) l'elevada freqüència de delecions patogèniques descrites en aquest gen (la figura 11A il·lustra les delecions descrites fins ara a *EYS*).

De manera similar, es va poder identificar la deleció de dos exons al gen *CRX* en un altre pacient. En aquest cas no hi havia cap mutació prèvia en el gen que oferís una pista, ja que es tractava d'una família amb herència dominant, però la perfecta cosegregació amb la malaltia d'una variant molt rara no patogènica situada molt a prop del gen va convidar a analitzar la cobertura del *locus* amb deteniment. Així es va identificar la presència de la deleció i el punt de trencament.

En l'últim cas, corresponent a la família E4, amb una herència dominant, l'anàlisi de l'exoma no va revelar cap mutació potencialment patogènica. Gràcies a l'experiència acumulada amb els casos anteriors, es va optar per analitzar els gens dominants descrits prèviament com a responsables de la patologia, tot detectant alteracions estructurals en el gen *PRPF31*. En aquest cas, la sorpresa fou molt més gran, ja que la patologia està causada per dues mutacions diferents en diferents branques de la família (Publicació 2 d'aquesta tesi, Figures 1H i 3). Les

dues mutacions són alteracions estructurals grans, que afecten més d'un exó, però que no sembla que presentin cap relació ja que no comparteixen cap dels punts d'inserció/deleció.

A *PRPF31* s'han descrit fins ara 11 grans delecions que inclouen més d'un exó i tres reorganitzacions complexes, cosa que fa pensar en una tendència d'aquesta regió cromosòmica a patir aquest tipus de reordenaments. Concretament, s'han identificat delecions molt semblants que impliquen part del gen *PRPF31* i diversos gens situats a 5' (Abu-Safieh et al. 2006; Köhn et al. 2009; Sullivan et al. 2006) (Figura 11B).

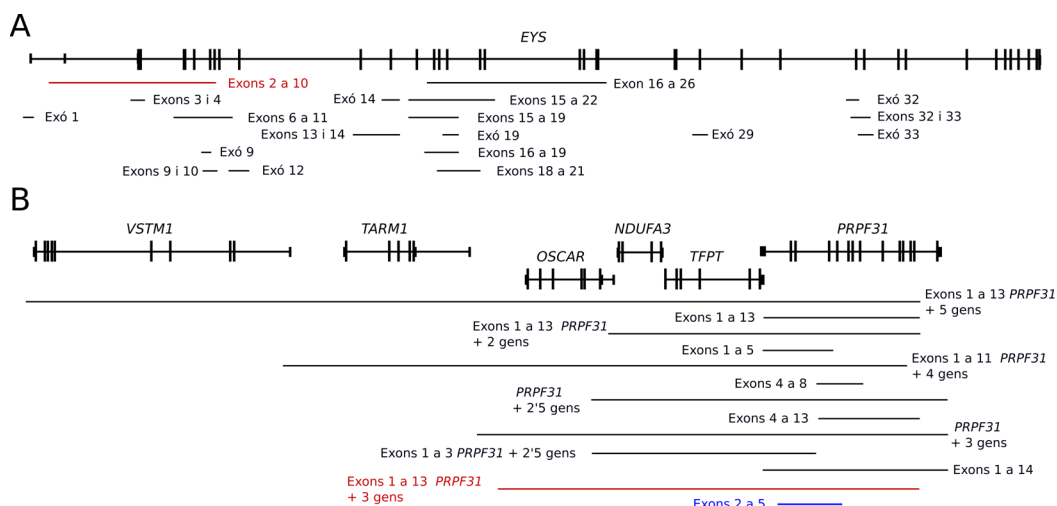


Figura 11. Representació de les grans alteracions estructurals descrites en els gens *EYS* (A) i *PRPF31* (B) (regió cromosòmica chr19:54,544,068-54,635,550 (hg19)). En vermell i blau s'indiquen les delecions i duplicacions, respectivament, identificades en els nostre treball.

Com ja s'ha esmentat, *EYS* i *PRPF31* són dos gens DR que tenen tendència a patir grans alteracions estructurals. Però mentre que en el cas de *EYS* les delecions acostumen a ser de només un o dos exons, a *PRPF31* acostuma a estar implicat gairebé tot el gen i fins i tot altres gens situats a 5'. L'origen d'aquestes alteracions està condicionat per l'arquitectura genòmica del gen i de les regions flanquejants, que inclou elements repetitius i seqüències amb alta homologia. Si aquestes seqüències promouen la recombinació homòloga no al·lèlica (NAHR, de l'anglès *Non-Allelic Homologous Recombination*), es produeixen alteracions recurrents amb els mateixos punts de trencament; però si el que es dona és una unió d'extremes no homòloga (NHEJ, de l'anglès *Non-Homologous End Joining*), els

reordenaments són esporàdics i no comparteixen punts de trencament.

Els elements *Alu*, molt abundants en el genoma, s'han associats amb la NAHR, essent responsables d'un gran percentatge d'aquestes. *PRPF31*, on s'han detectat moltes delecions que tenen punts de trencament similars (per exemple a l'intró 13), està enriquit en seqüències *Alu* i per tant és probable que aquestes siguin en gran mesura les responsables de les alteracions. L'estudi detallat dels punts de trencament hauria de permetre establir un mapa de seqüències propenses a patir aquest fenomen i ajudar en la cerca d'aquestes mutacions.

L'escenari del gen *EYS*, però, és completament diferent. Les delecions no acostumen a tenir punts de trencament comuns, però el gran nombre d'alteracions d'aquest tipus que s'hi han descrit fa pensar que no es tracta d'un efecte atzarós. S'ha vist que certes seqüències (per exemple quàdruplex de G o petites inversions repetides) afavoreixen la formació d'estructures secundàries que obstrueixen el procés de replicació (col·lapse de la forquilla de replicació) tot conduint al trencament de les cadenes de DNA. També s'han descrit altres seqüències (repeticions de A o TA) anomenades llocs fràgils comuns (en anglès, *common fragile sites*), que pertorben la progressió de la polimerasa durant la replicació i poden provocar que aquesta es dissociï de la maquinària i vagi a buscar altres llocs més estables. Aquests mecanismes són responsables de les delecions no recurrents i és probable que *EYS* estigui enriquit en aquest tipus de seqüències (Cardoso et al. 2016; Carvalho and Lupski 2016). Donat que en aquest cas és molt difícil establir punts calents i les delecions acostumen a afectar pocs exons, s'ha de fer una anàlisi molt refinada per identificar-les a partir de les dades de seqüenciació massiva. Per sort, en tractar-se d'un gen que causa retinosi pigmentària en recessivitat, la presència d'una mutació en heterozigosi pot ajudar a senyalar el gen com a candidat i, si fos necessari recórrer a la utilització d'altres tècniques de quantificació de dosi, com la MLPA, per a la detecció de grans variants estructurals. La tècnica de MLPA (de l'anglès *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) és una tècnica comercial que permet quantificar la dosi d'entre 30 i 45 regions genòmiques a la vegada. Està dissenyada per determinar si les regions exòniques de certs gens estan duplicades o delecionades. El fet que estigui patentada fa que sigui una única empresa qui comercialitzi les sondes necessàries, i que aquestes només s'hagin desenvolupat per a un nombre de gens limitat. Afegit a això, hi ha el fet que cada disseny només analitza uns pocs gens, i per tant no és una tècnica d'alt rendiment que es pugui aplicar per fer un escrutini mutacional en malalties genèticament molt heterogènies, com les

DR.

Un fet destacable respecte les delecions/duplicacions genòmiques és que s'observa un nombre de delecions molt més gran respecte al de duplicacions (per exemple, si tenim en compte els gens *EYS* i *PRPF31* comptant els esdeveniments que afecten com a mínim un exó, tenim 19 delecions/2 duplicacions i 12 delecions/1 duplicació, respectivament). Aquesta desviació pot ser deguda a diversos factors. En primer lloc, les recombinacions il·legítimes que es donen entre dues posicions cromosòmiques d'una mateixa cromàtida només provoquen delecions, en contra del que passa si aquesta es dona entre cromàtides germanes (o entre diferents cromosomes), quan es produeix alhora una duplicació i una delecio (Turner et al. 2008). Per aquest motiu ja s'ha d'esperar un nombre doble de delecions que de duplicacions. Un altre factor a considerar és que la detecció de duplicacions és tècnicament més complexa que la de delecions, ja que la diferència de dosi a detectar en el primer cas és de un 33% (passem de dues còpies a tres), mentre que en les delecions és del 50% (de dues còpies a una). Aquesta diferència podria explicar que el nombre de duplicacions estigui subestimat.

Altres estratègies de seqüenciació massiva

Per intentar millorar l'eficàcia diagnòstica mitjançant WES s'estan desenvolupant els anomenats “exomes clínics”. Aquests exomes estan dissenyats per cobrir totes les regions codificants del genoma, però millorant la cobertura dels gens que estan implicats en malalties genètiques. D'aquesta manera es pretén facilitar la utilització d'aquesta metodologia en el diagnòstic, ja que millora la detecció de variants en els gens d'interès sense deixar de banda la resta de gens del genoma (Altmüller et al. 2016). Aquesta major cobertura dels gens rellevants pot permetre millorar la quantificació de les regions capturades i, mitjançant la comparació entre moltes mostres, determinar la presència de delecions/duplicacions.

Amb un objectiu similar es fa servir la seqüenciació massiva dirigida o “*targeted sequencing*”. Aquesta estratègia permet fer un disseny personalitzat de captura per seqüenciar només les regions d'interès en cada cas. En tractar-se de dissenys particulars, ofereixen la flexibilitat de poder incloure regions no codificants, com introns, especialment els llocs de *splicing*, o regions promotores. Normalment aquests panells acostumen a representar regions de captura petites, de molt poques Mb, i això permet analitzar alhora un gran nombre de mostres obtenint una molt bona cobertura a un cost significativament inferior de seqüenciació. A

més, l'anàlisi se simplifica força ja que es redueix molt el nombre de dades a analitzar. La principal desavantatge és que no permet analitzar variants en possibles gens nous com sí que es pot fer amb la seqüenciació de l'exoma complet. Per aquest motiu, aquests panells de seqüenciació només es poden fer servir per aplicacions diagnòstiques i no de recerca, ja que mai s'identificaran variants en gens que no siguin candidats *a priori*. En el context de les DR s'està estenent força l'ús d'aquesta eina en el diagnòstic rutinari, ja que, com s'ha dit, es redueix molt el cost (Bernardis et al. 2016; Ramkumar et al. 2016).

Una altra opció és la seqüenciació del genoma complet (WGS, per *Whole Genome Sequencing*), que permet detectar qualsevol variant tant en regions exòniques o intròniques com intergèniques. La principal avantatge d'aquesta estratègia en relació al WES és que permet detectar les alteracions estructurals que afecten exons sencers, no només delecions i duplicacions, sinó també inversions, insercions i translocacions, ja que s'obté una cobertura contínua i uniforme que permet quantificar i mapar els punts de trencament (Ellingford, Barton, Bhaskar, Williams, et al. 2016; Tattini, D'Aurizio, and Magi 2015). Alhora, el mapatge de la seqüenciació WGS és molt més fi, ja que es disposa de molt més context. Però de moment aquesta tècnica presenta un cost encara massa elevat, si volem obtenir una cobertura mínima comparable a la de la seqüenciació WES, i a més requereix una anàlisi posterior de les dades molt més complex a nivell computacional i interpretatiu, ja que és molt difícil avaluar l'efecte de les variants no codificants. Això fa que encara no estigui gaire estès el seu ús en genètica diagnòstica (Royer-Bertrand and Rivolta 2015).

Una de les principals mancances que presenten tant el WES com el WGS és que no capturen específicament el DNA mitocondrial. Les malalties que tenen com a causa la disfunció dels mitocondris poden estar causades tant per mutacions en gens nuclears com mitocondrials, i en conseqüència en certs casos pot resultar important l'anàlisi del DNA d'aquest orgànul cel·lular. Hi ha kits específics que permeten capturar el genoma mitocondrial, i ja s'ha posat a punt un protocol per realitzar alhora la llibreria del genoma mitocondrial i la de l'exoma nuclear a partir d'una extracció de DNA estàndard. En aquest cas s'ha de tenir en compte que la proporció dels dos tipus de material genètic no és equivalent i per tant s'utilitza molta menys quantitat de sonda de captura del DNA mitocondrial que de l'exoma. D'aquesta manera, la cobertura obtinguda en seqüenciar és equiparable entre els dos tipus de DNA (http://www.n-genetics.com/file/TN_2015_Sep_SeqCapEZ.pdf).

En definitiva, però, el WES és de les estratègies més completes per al diagnòstic genètic, ja que és molt més accessible que el WGS i té l'avantatge respecte els panells dirigits que inclou molts més gens, permetent una anàlisi molt més extensa i la possibilitat d'ampliar els gens candidats sense haver de refer la seqüenciació.

Interpretació clínica de les dades obtingudes

La interpretació clínica de les variants identificades en els pacients no és en absolut trivial. Amb la seqüenciació de gens candidats, la quantitat de variants rares amb possible efecte sobre la proteïna que s'identificaven era molt baixa, ja que el número de regions genòmiques analitzades era petita. Però quan es tracta d'experiments de seqüenciació massiva, en què s'estudien un gran nombre de regions, uns 180.000 exons corresponents a més de 20.000 gens, el nombre de variants obtingudes es dispara. Per a la correcta interpretació del possible impacte funcional d'aquestes variants, diversos col·lectius han desenvolupat guies que permeten avaluar cadascun dels canvis i adjudicar-los un determinat grau de patogenicitat, tenint en compte dades poblacionals, de segregació, funcionals i computacionals. En el nostre cas hem fet servir les pautes establertes per «*The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Association for Molecular Pathology (AMP)*» (Richards et al. 2015). Els criteris definits permeten classificar amb facilitat com a patogènica una variant a) sense sentit, b) que canviï la pauta de lectura o c) que alteri els llocs canònics de *splicing*, però són molt estrictes quan es tracta de variants de canvi de sentit. L'argument principal és que no és suficient, per considerar una variant rara de canvi de sentit com a patogènica, trobar-la en un gen ja conegut com a causant de la patologia si no es realitzen estudis funcionals que demostrin la seva patogenicitat. El fet que aquesta variant ja s'hagi identificat en altres pacients o que diversos algoritmes bioinformàtics en prediguin un impacte funcional només es consideren evidències febles (Figura 12). En canvi, l'estudi de la segregació de la/es variant/s es considera una evidència més forta (sempre que hi hagi un número suficient d'individus de la família estudiats) i ajuda molt a l'hora de determinar el possible impacte del canvi identificat. D'aquí l'enorme importància de poder estudiar els pares i/o altres membres de la família (fills, germans) per establir fases, comprovar la cosegregació de les mutacions amb la patologia i identificar mutacions *de novo*, ja que en molts casos és l'única manera de tenir prou evidències per poder considerar una variant de canvi de sentit com a

EVIDÈNCIA DE PATOGENICITAT

	Feble	Moderada	Fora	Molt forta
Dades poblacionals		Freqüència de la variant a la població nul·la o molt baixa en casos recessius	Freqüència de la variant en pacients incrementada estadísticament respecte controls	
Dades predictives i computacionals	Diversos algorismes prediuen un efecte deleteri de la variant	Nova variant de canvi de sentit en un aminoàcid on ja s'ha descrit un canvi aminoacídic diferent La variant altera la mida de la proteïna	Nou canvi nucleotídic que provoca un canvi d'aminoàcid ja descrit com a patogènic	Variant que provoca la pèrdua de funció de la proteïna
Dades Funcionals	Variant de canvi de sentit en un gen on s'han descrit aquest tipus de variants com a patogèniques	La variant afecta un domini molt important de la proteïna o una zona amb moltes mutacions descrites	Estudis funcionals demostren l'efecte deleteri de la variant	
Segregació	Cosegregació de la variant amb la malaltia en múltiples individus afectats	En augmentar les dades de segregació		
Evidències de novo		Variant <i>de novo</i> sense confirmació de maternitat i paternitat	Variant <i>de novo</i> amb confirmació de maternitat i paternitat	
Dades al·lèliques		En malalties recessives la variant es troba en trans amb una altra mutació en el mateix gen		
Altres Bases de dades	Variant prèviament descrita com a patogènica			
Altres Dades	El fenotip és molt específic i és causat per mutacions només en aquest gen			

Figura 12. Classificació de les possibles evidències que permeten categoritzar una variant com a patogènica. Adaptat de Richards et al. 2015.

patogènica.

Un aspecte important a tenir en compte és que aquesta guia només es pot aplicar en casos de variants en gens ja associats amb el fenotip del pacient. A l'hora d'identificar gens nous associats a una patologia, els requisits són encara més estrictes i les variants només es poden considerar com a candidates. Són necessaris altres tipus d'evidències, com altres variants en el mateix gen en

individus amb el mateix fenotip, per considerar el gen com a causal i poder classificar la variant com a patogènica. Aquesta casuística, quan es tracta de malalties rares, molt heterogènies i bastant estudiades, és molt difícil de trobar si no es té accés a un nombre molt gran de pacients.

Reptes de futur

1. Relacions genotip-fenotip. Presència d'al·lels modificadors

En el conjunt de les DR, continua essent una assignatura pendent la possibilitat d'establir relacions genotip-fenotip de manera que es faciliti, per una banda, el diagnòstic genètic segons la clínica del pacient i, per l'altra, la determinació de l'evolució i prognosi de la patologia a partir del diagnòstic molecular. Aquestes fites es compliquen encara més per la presència en molts casos de variants rares potencialment patogèniques o, fins i tot de mutacions ja descrites, en més d'un gen associat a les DR (Biswas et al. 2017).

En malalties monogèniques, causades per mutacions en un gen major, pot haver-hi altres variants en el mateix gen o en d'altres gens que tinguin una influència sobre el fenotip. Es tracta dels anomenats al·lels modificadors, que contribueixen a l'expressivitat variable de molts trastorns mendelians. Un exemple de la primera situació el trobem en una patologia com la malaltia de Gaucher, en què s'ha descrit que una segona mutació situada prop de l'alteració causal en el mateix al·lel disminueix l'activitat de l'enzim beta-glucosidasa, essent per tant, un possible modificador del fenotip (Montfort et al. 2004).

En el conjunt de les DR, però, es dona més sovint la segona situació. Per exemple, en la síndrome de Bardet-Biedl (BBS), una malaltia recessiva, s'han descrit força casos de pacients portadors de tres mutacions en dos gens associats amb BBS, dues en els dos al·lels d'un gen i una tercera en un segon gen, i s'ha hipotetitzat que aquesta tercera mutació pot ser la causa de les diferències fenotípiques entre diferents pacients. Fins i tot s'han descrit casos en què la presència de dues mutacions en un gen no serien suficients per determinar l'aparició de la patologia, tot plantejant-se la hipòtesi que hi hauria una herència oligogènica de la malaltia. No obstant, encara no hi ha prou evidències que recolzin aquest plantejament (Beales et al. 2003; Chen et al. 2011; González-Del Pozo et al. 2014; Katsanis et al. 2001; Priya et al. 2016). Tot i així, s'han descrit gens no causals però sí modificadors del fenotip en pacients amb BBS (Badano et al. 2006; Cardenas-

Rodriguez et al. 2013). Aquest efecte ja s'havia observat en altres patologies amb herència mendeliana com la fibrosi quística (FQ) (amb una prevalença molt més elevada que les DR). Així, en comparar pacients que presenten exactament el mateix genotip per la mutació causal al gen responsable de la FQ, *CFTR*, certes variants en els gens *TGFβ1* i *MBL2* agreugen l'afectació pulmonar que pateixen i condicionen la seva supervivència. En el cas de *MBL2*, s'ha observat que el nivell d'expressió del gen està relacionat amb l'edat d'adquisició de malalties infeccioses respiratòries que acceleren la pèrdua de funció pulmonar (Buranawuti et al. 2007; Dorfman et al. 2008; Drumm et al. 2005).

En el nostre cas, hem identificat pacients portadors de mutacions en més d'un gen (Publicació 2, famílies 22ORG i 39ORG). La família 22ORG presenta dues mutacions ja descrites prèviament en pacients amb DR, en heterozigosi, en els gens *CNGB3* i *CRB1* i una mutació nova en *ROM1*. Mentre que les dues primeres estan presents també en una germana sana, la tercera només s'ha trobat a la pacient. *CRB1* causa DR amb herència recessiva mentre que *CNGB3* i *ROM1* causen DR amb herència dominant. A més, *ROM1* s'ha descrit com a responsable de DR amb herència digènica amb una altra mutació al gen *PRPH2*. En el cas de la família 39ORG, diversos membres de la família són portadors d'una mutació ja descrita amb herència dominant a *PDE6B*, però només una filla ha manifestat la patologia. Aquesta alhora presenta un canvi nou, predit com a patogènic, a *USH2A*, gen que s'havia descrit com a responsable de retinosi pigmentària amb herència recessiva. En aquest dos casos es podria hipotetitzar que els pacient ha desenvolupat la patologia a causa de l'efecte additiu de dues mutacions (a *CNGB3* i *ROM1*, en la família 22ORG; i a *PDE6B* i *USH2A* a la família 39ORG), mentre que els membres sans de la família presenten penetrància incompleta per la mutació dominant (*CNGB3* i *PDE6B*, respectivament).

L'efecte que aquestes «segones mutacions» poden tenir sobre el fenotip del pacient no és fàcil d'avaluar, però caldria obrir la porta a la definició de paisatges genètics on no només es tinguessin en compte les mutacions desencadenants de la patologia, sinó també altres variants que poden estar exercint un efecte modificador del fenotip, ja sigui en el mateix gen causal o en d'altres. Una hipòtesi és que, en casos d'herència recessiva, aquestes variants siguin responsables de les variacions en el desenvolupament i evolució de la patologia, fins i tot en individus de la mateixa família. En els casos d'herència dominant amb penetrància incompleta, les segones mutacions que es produeixen en un gen diferent del causal poden fins i tot ser factors desencadenants de la patologia,

situació que es podria considerar com a herència digènica. En el cas de *PRPF31*, gen responsable de RP en dominància degut a haploinsuficiència i amb nombrosos casos de penetrància incompleta, s'han descrit diferents variants en gens situats al seu voltant (no relacionats amb DR) que modifiquen la seva expressió i per tant determinen l'aparició de la patologia (Rose et al. 2016; Rose and Bhattacharya 2016; Venturini et al. 2012).

En diverses ocasions s'han descrit fenotips modificats per la presència de més d'una mutació en diferents gens de DR (Coppieters et al. 2010; Huynh et al. 2014; Littink et al. 2010; Poloschek et al. 2010). És indiscutible que la gran varietat fenotípica que presenten aquestes patologies ha d'estar influïda pel context genètic de cada individu, que fa que l'edat d'aparició, l'evolució i l'estat final de la malaltia en cada cas siguin molt variables, i que fins ara no s'hagin pogut establir relacions genotip-fenotip clares. Per això, en el futur serà molt important estudiar a fons les interaccions que aquestes variants poden tenir amb les mutacions causals per tal d'identificar els gens realment rellevants en les relacions genotip-fenotip, que permetran anticipar l'evolució de la patologia i el possible èxit que les futures teràpies puguin tenir en cada pacient en particular. No es pot obviar, però, que l'efecte ambiental també juga un paper en l'evolució de la patologia i per tant és una variable més a tenir en compte a l'hora d'establir relacions.

D'altra banda, la presència d'una variant patogènica en un individu no sempre determina l'aparició de la patologia. En estudis realitzats gràcies a la utilització de plataformes de seqüenciació massiva s'ha analitzat la freqüència de portadors de mutacions potencialment patogèniques en població no afectada. Així per exemple, en un estudi realitzat sobre 589.000 individus (suposadament) sans s'han identificat 13 portadors de variants patogèniques (en homozigosi o heterozigosi en gens amb herència recessiva o dominant, respectivament) que causen una patologia molt severa però que no han manifestat mai cap símptoma de la patologia. Aquesta dada fa pensar en la presència de variants 'protectores' que s'han de tenir en compte en l'estudi de les malalties mendelianes i que podrien ser determinants en el desenvolupament d'estratègies terapèutiques (Chen et al. 2016).

2. Malalties de la visió d'origen mitocondrial. Identificació de les causes genètiques.

Certes DR i altres patologies visuals estan causades per alteracions del DNA

mitocondrial (mtDNA). Aquest dany pot ser causat tant per mutacions en gens nuclears que tenen una funció al mitocondri i que provoquen l'alteració de l'estabilitat del seu DNA, com per mutacions en el propi mtDNA. En el primer cas, la detecció d'aquestes mutacions és idèntica a la de qualsevol altra mutació nuclear, però quan la mutació es troba en el mtDNA la situació canvia completament. Això és degut a que aquest DNA no segueix les lleis mendelianes de la genètica. En primer lloc, es transmet exclusivament per via materna i, en segon lloc, cada cèl·lula pot tenir diversos mitocondris i cada mitocondri diverses còpies de mtDNA. Quan es produeix una mutació al mtDNA, aquesta acostuma a trobar-se en un estadi d'heteroplàsmia, de manera que coexisteixen molècules de mtDNA normal i molècules amb la mutació. Quan el grau d'heteroplàsmia de la mutació supera un llindar determinat, es desenvolupa la patologia. El nivell d'heteroplàsmia, a més, varia en els diferents teixits, ja que durant el desenvolupament embrionari la distribució de la població inicial de mitocondris a les cèl·lules en divisió és totalment atzarosa (Gorman and Taylor 2011).

En conseqüència, la detecció de variants causants de patologies de la visió en el mtDNA és molt complicada, ja que no es pot analitzar el teixit afectat, que és on s'espera trobar la mutació en un percentatge d'heteroplàsmia més elevat. Actualment, la cerca de mutacions es fa mitjançant DNA obtingut a partir de sang o a partir d'una biòpsia de teixit muscular. El problema és que si en aquests teixits el grau d'heteroplàsmia de la variant és inferior al 20%, molt probablement no es detectarà la mutació. L'anàlisi del mtDNA per seqüenciació massiva requereix una elevada cobertura per poder detectar variants que tenen una proporció inferior al 50% respecte la variant normal. A més, el mtDNA també pot contenir alteracions estructurals grans en heteroplàsmia, situació encara més complicada d'analitzar i en què s'està treballant avui dia per poder-ho resoldre amb garanties (Carroll, Brillhante, and Suomalainen 2014).

Finalment, a l'hora d'interpretar les variants identificades en el mtDNA s'ha d'anar molt en compte, ja que aquest òrganul presenta un codi genètic particular, de manera que un canvi nucleotídic pot provocar un canvi aminoacídic diferent al que es produiria si es tractés de DNA nuclear. Alhora, molts gens del mtDNA codifiquen RNAs de transferència (tRNAs) que no són traduïts a proteïna i que per tant no es poden avaluar amb els mateixos criteris que la resta de casos (Diroma, Lubisco, and Attimonelli 2016; Gorman et al. 2016).

Conclusions

Xip DR aplicat al diagnòstic genètic d'una cohort de 36 famílies espanyoles afectades de distròfies de retina (DR) hereditàries

- L'aplicació d'un xip de diagnòstic indirecte basat en SNPs dissenyat pel grup, el Xip DR, ha permès completar el diagnòstic genètic de 17 famílies (un 47% del total) afectades de diferents DR.
- S'han identificat 16 mutacions noves i 13 ja descrites en un total de 10 gens DR ja coneguts.
- L'èxit del diagnòstic mitjançant el Xip DR està condicionat per les recombinacions que es poden produir entre la mutació i els marcadors utilitzats, per la presència de mutacions estructurals i pel patró d'herència assignat a cada família.
- L'eficàcia del xip és tant més elevada com més gran és la família. A més, millora molt si aquesta presenta un patró d'herència recessiu amb consanguinitat, casos en què s'ha arribat a un percentatge d'èxit del 80%.

Diagnòstic genètic mitjançant seqüenciació de l'exoma en 33 famílies espanyoles

- Mitjançant la seqüenciació de l'exoma s'han diagnosticat genèticament 22 famílies o casos aïllats d'un total de 37 (59,5%). A més, s'han proposat gens candidats molt probables en 10 casos més.
- S'han identificat un total de 21 mutacions noves i 15 conegudes en 22 gens prèviament associats a DR.
- El diagnòstic genètic ha portat a la reavaluació clínica de diversos pacients. S'ha diagnosticat un pacient afectat de la malaltia de Refsum, que pot ser tractada mitjançant un control de la dieta, tot evitant l'aparició de símptomes neurològics i cardíacs greus. A més, s'ha identificat una patologia sindròmica en dos pacients en què s'havia diagnosticat inicialment una DR aïllada.
- S'han detectat tres casos de coroiderèmia, malaltia del grup de les DR que compta amb una teràpia gènica en fase avançada de desenvolupament.
- La seqüenciació de l'exoma ha permès detectar quatre grans reorganitzacions estructurals en heterozigosi (tres delecions i una duplicació) causants de DR. Tot i així, no sempre és possible detectar

aquest tipus de mutacions i llavors cal recórrer a altres metodologies (MLPA, seqüenciació del genoma).

- S'han proposat quatre nous gens candidats a ser responsables de DR: *SCLT1*, *CEP250*, *CEP78* i *SEMA6B*. Caldria fer estudis funcionals que demostrin la seva patogenicitat, com en el cas de *CEP250*, en què s'ha determinat mitjançant un assaig *in vitro* que la mutació altera l'estructura del cili. El gen *CEP78* ha estat descrit recentment per altres autors com a causant de DR.

Diagnòstic genètic de les DR

- En total, la utilització de tècniques que permeten analitzar de forma simultània un gran nombre de gens associats a les DR ha permès diagnosticar genèticament o identificar un candidat plausible en 49 de 64 casos (76,5%).
- S'han identificat un total de 37 mutacions noves, tot expandint l'espectre de mutacions causals en gens de DR.
- L'obtenció del diagnòstic genètic ha comportat que en fins a cinc casos es redefinís el patró d'herència que s'havia assumit inicialment, tot permetent que els pacients i les famílies rebin a partir d'ara un consell genètic adequat.

Bibliografia

- Abu-Safieh, Leen et al. 2006. "A Large Deletion in the adRP Gene PRPF31: Evidence That Haploinsufficiency Is the Cause of Disease." *Molecular Vision* 12:384–88. Retrieved February 8, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16636657>).
- Adly, Nouran, Amal Alhashem, Amer Ammari, and Fowzan S. Alkuraya. 2014. "Ciliary Genes TBC1D32/C6orf170 and SCLT1 Are Mutated in Patients with OFD Type IX." *Human Mutation* 35(1):36–40. Retrieved December 29, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24285566>).
- Adzhubei, Ivan a et al. 2010. "A Method and Server for Predicting Damaging Missense Mutations." *Nature Methods* 7(4):248–49. Retrieved December 13, 2013 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2855889&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Ajmal, Muhammad et al. 2014. "A Missense Mutation in the Splicing Factor Gene DHX38 Is Associated with Early-Onset Retinitis Pigmentosa with Macular Coloboma." *Journal of Medical Genetics* 1–5. Retrieved May 12, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24737827>).
- al-Maghteh, M., C. Gregory, C. Inglehearn, A. Hardcastle, and S. Bhattacharya. 1993. "Rhodopsin Mutations in Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa." *Human Mutation* 2(4):249–55. Retrieved August 7, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8401533>).
- Altmüller, Janine et al. 2016. "A Systematic Comparison of Two New Releases of Exome Sequencing Products: The Aim of Use Determines the Choice of Product." *Biological Chemistry* 397(8):791–801. Retrieved December 1, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27021259>).
- Ambasudhan, Rajesh et al. 2004. "Atrophic Macular Degeneration Mutations in ELOVL4 Result in the Intracellular Misrouting of the Protein." *Genomics* 83(4):615–25. Retrieved July 30, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15028284>).
- Andermatt, Irwin et al. 2014. "Semaphorin 6B Acts as a Receptor in Post-Crossing Commissural Axon Guidance." *Development (Cambridge, England)* 141(19):3709–20. Retrieved April 29, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25209245>).
- Arai, Yuuki et al. 2015. "Retinitis Pigmentosa with EYS Mutations Is the Most Prevalent Inherited Retinal Dystrophy in Japanese Populations." *Journal of Ophthalmology* 2015:1–10. Retrieved September 30, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4487330&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Asante, David, Nicola L. Stevenson, and David J. Stephens. 2014. "Subunit Composition of the Human Cytoplasmic Dynein-2 Complex." *Journal of Cell Science* 127(Pt 21):4774–87. Retrieved November 23, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25205765>).
- Athanasίου, Dimitra et al. 2013. "The Cell Stress Machinery and Retinal Degeneration." *FEBS Letters* 587(13):2008–17. Retrieved May 24, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23684651>).
- Badano, Jose L. et al. 2006. "Dissection of Epistasis in Oligogenic Bardet–Biedl Syndrome." *Nature* 439(7074):326–30. Retrieved April 25, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16327777>).
- Bainbridge, James W. B. et al. 2015. "Long-Term Effect of Gene Therapy on Leber's Congenital Amaurosis." *The New England Journal of Medicine* 372(20):1887–97. Retrieved July 2, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25938638>).

- Bamshad, Michael J. et al. 2011. "Exome Sequencing as a Tool for Mendelian Disease Gene Discovery." *Nature Reviews. Genetics* 12(11):745–55. Retrieved May 23, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21946919>).
- Barh, Debmalya, Vasudeo Zambare, and Vasco Azevedo. 2013. *OMICS: Applications in Biomedical, Agricultural, and Environmental Sciences*. CRC Press. Retrieved August 27, 2015 (<https://books.google.com/books?id=yoPNBQAAQBAJ&pgis=1>).
- Barnard, Alun R., Markus Groppe, and Robert E. MacLaren. 2014. "Gene Therapy for Choroideremia Using an Adeno-Associated Viral (AAV) Vector." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5(3):a017293. Retrieved March 8, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25359548>).
- Bauwens, Miriam et al. 2015. "An Augmented ABCA4 Screen Targeting Noncoding Regions Reveals a Deep Intronic Founder Variant in Belgian Stargardt Patients." *Human Mutation* 36(1):39–42. Retrieved March 21, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25346251>).
- Bax, Nathalie M. et al. 2015. "Heterozygous Deep-Intronic Variants and Deletions in ABCA4 in Persons with Retinal Dystrophies and One Exonic ABCA4 Variant." *Human Mutation* 36(1):43–47. Retrieved April 28, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25363634>).
- Beales, Philip L. et al. 2003. "Genetic Interaction of BBS1 Mutations with Alleles at Other BBS Loci Can Result in Non-Mendelian Bardet-Biedl Syndrome." *The American Journal of Human Genetics* 72(5):1187–99. Retrieved April 12, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12677556>).
- Berger, Wolfgang, Barbara Kloeckener-Gruissem, and John Neidhardt. 2010. "The Molecular Basis of Human Retinal and Vitreoretinal Diseases." *Progress in Retinal and Eye Research* 29(5):335–75. Retrieved December 19, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20362068>).
- Bernardis, Isabella et al. 2016. "Unravelling the Complexity of Inherited Retinal Dystrophies Molecular Testing: Added Value of Targeted Next-Generation Sequencing." *BioMed Research International* 2016:1–14. Retrieved February 14, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28127548>).
- Biswas, Pooja et al. 2017. "Genetic Analysis of 10 Pedigrees with Inherited Retinal Degeneration by Exome Sequencing and Phenotype-Genotype Association." *Physiological Genomics* 49(4):216–29. Retrieved April 21, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28130426>).
- Bonnet, Crystel and Aziz El-Amraoui. 2012. "Usher Syndrome (Sensorineural Deafness and Retinitis Pigmentosa): Pathogenesis, Molecular Diagnosis and Therapeutic Approaches." *Current Opinion in Neurology* 25(1):42–49. Retrieved August 20, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22185901>).
- Boye, Shannon E., Sanford L. Boye, Alfred S. Lewin, and William W. Hauswirth. 2013. "A Comprehensive Review of Retinal Gene Therapy." *Molecular Therapy* 21(3):509–19. Retrieved April 13, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3642288&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Broman, K. W. and J. L. Weber. 1999. "Long Homozygous Chromosomal Segments in Reference Families from the Centre d'Etude Du Polymorphisme Humain." *American Journal of Human Genetics* 65(6):1493–1500. Retrieved August 27, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1288359&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

- Bujakowska, Kinga et al. 2012. "CRB1 Mutations in Inherited Retinal Dystrophies." *Human Mutation* 33(2):306–15. Retrieved August 8, 2012 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22065545>).
- Bujakowska, Kinga M. et al. 2014. "Targeted Exon Sequencing in Usher Syndrome Type I." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 55(12):8488–96. Retrieved August 3, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4280089&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Bujakowska, Kinga M. et al. 2015. "Mutations in IFT172 Cause Isolated Retinal Degeneration and Bardet-Biedl Syndrome." *Human Molecular Genetics* 24(1):230–42. Retrieved April 24, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25168386>).
- Buranawuti, Kittit et al. 2007. "Variants in Mannose-Binding Lectin and Tumour Necrosis Factor Alpha Affect Survival in Cystic Fibrosis." *Journal of Medical Genetics* 44(3):209–14. Retrieved April 12, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158822>).
- Cardenas-Rodriguez, Magdalena et al. 2013. "Characterization of CCDC28B Reveals Its Role in Ciliogenesis and Provides Insight to Understand Its Modifier Effect on Bardet-Biedl Syndrome." *Human Genetics* 132(1):91–105. Retrieved April 25, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23015189>).
- Cardoso, Ana R., Manuela Oliveira, Antonio Amorim, and Luisa Azevedo. 2016. "Major Influence of Repetitive Elements on Disease-Associated Copy Number Variants (CNVs)." *Human Genomics* 10(1):30. Retrieved (<http://humgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40246-016-0088-9>).
- Carroll, C. J., V. Brilhante, and A. Suomalainen. 2014. "Next-Generation Sequencing for Mitochondrial Disorders." *British Journal of Pharmacology* 171(8):1837–53. Retrieved September 13, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24138576>).
- Carvalho, Claudia M. B. and James R. Lupski. 2016. "Mechanisms Underlying Structural Variant Formation in Genomic Disorders." *Nature Reviews Genetics* 17(4):224–38. Retrieved February 8, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26924765>).
- de Castro-Miró, Marta et al. 2014. "Combined Genetic and High-Throughput Strategies for Molecular Diagnosis of Inherited Retinal Dystrophies." *PloS One* 9(2):e88410. Retrieved March 28, 2014 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3917917&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Chacon-Camacho, Oscar Francisco and Juan Carlos Zenteno. 2015. "Review and Update on the Molecular Basis of Leber Congenital Amaurosis." *World Journal of Clinical Cases* 3(2):112–24. Retrieved July 10, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4317604&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Chakarova, Christina F. et al. 2002. "Mutations in HPRP3, a Third Member of Pre-mRNA Splicing Factor Genes, Implicated in Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa." *Human Molecular Genetics* 11(1):87–92. Retrieved August 27, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11773002>).
- Chen, Jianjun et al. 2011. "Molecular Analysis of Bardet-Biedl Syndrome Families: Report of 21 Novel Mutations in 10 Genes." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52(8):5317. Retrieved April 25, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21642631>).
- Chen, Rong et al. 2016. "Analysis of 589,306 Genomes Identifies Individuals Resilient to Severe

- Mendelian Childhood Diseases.” *Nature Biotechnology* 34(5):531–38. Retrieved June 27, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27065010>).
- Cheng, Liang and David Y. Zhang. 2010. *Molecular Genetic Pathology*. Springer Science & Business Media. Retrieved August 27, 2015 (https://books.google.com/books?id=F_7QXO0ZBigC&pgis=1).
- Churchill, Jennifer D. et al. 2013. “Mutations in the X-Linked Retinitis Pigmentosa Genes RPGR and RP2 Found in 8.5% of Families with a Provisional Diagnosis of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54(2):1411–16. Retrieved July 10, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3597192&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Collin, Rob W. J. et al. 2008. “Identification of a 2 Mb Human Ortholog of Drosophila Eyes Shut/spacemaker That Is Mutated in Patients with Retinitis Pigmentosa.” *American Journal of Human Genetics* 83(5):594–603. Retrieved September 30, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2668042&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Collin, Rob W. J. et al. 2011. “High-Resolution Homozygosity Mapping Is a Powerful Tool to Detect Novel Mutations Causative of Autosomal Recessive RP in the Dutch Population.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52(5):2227–39. Retrieved July 31, 2012 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21217109>).
- Collin, Rob W. J. et al. 2012. “Antisense Oligonucleotide (AON)-Based Therapy for Leber Congenital Amaurosis Caused by a Frequent Mutation in CEP290.” *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 1:e14. Retrieved August 3, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3381589&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Conte, Ivan et al. 2015. “MiR-204 Is Responsible for Inherited Retinal Dystrophy Associated with Ocular Coloboma.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(25):E3236-45. Retrieved July 29, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26056285>).
- Cooper, Gregory M. et al. 2005. “Distribution and Intensity of Constraint in Mammalian Genomic Sequence.” *Genome Research* 15(7):901–13. Retrieved June 19, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1172034&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Coppieters, Frauke et al. 2010. “Genetic Screening of LCA in Belgium: Predominance of CEP290 and Identification of Potential Modifier Alleles in AH11 of CEP290-Related Phenotypes.” *Human Mutation* 31(10):E1709–66. Retrieved May 9, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20683928>).
- Coppieters, Frauke et al. 2015. “Hidden Genetic Variation in LCA9-Associated Congenital Blindness Explained by 5'UTR Mutations and Copy-Number Variations of *NMNAT1*.” *Human Mutation* 36(12):1188–96. Retrieved February 14, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26316326>).
- Coussa, Razeq Georges and Elias I. Traboulsi. 2012. “Choroideremia: A Review of General Findings and Pathogenesis.” *Ophthalmic Genetics* 33(2):57–65. Retrieved August 26, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22017263>).
- Cremers, Frans P. M., D. J. van de Pol, L. P. van Kerkhoff, B. Wieringa, and H. H. Ropers. 1990. “Cloning of a Gene That Is Rearranged in Patients with Choroideraemia.” *Nature*

- 347(6294):674–77. Retrieved August 26, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2215697>).
- Daiger, S. P., L. S. Sullivan, and S. J. Bowne. 2013. “Genes and Mutations Causing Retinitis Pigmentosa.” *Clinical Genetics* 84(2):132–41. Retrieved November 26, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23701314>).
- Dawn Teare, M. and Jennifer H. Barrett. 2005. “Genetic Linkage Studies.” *The Lancet* 366(9490):1036–44. Retrieved August 27, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16168786>).
- Desmet, François-Olivier et al. 2009. “Human Splicing Finder: An Online Bioinformatics Tool to Predict Splicing Signals.” *Nucleic Acids Research* 37(9):e67. Retrieved December 10, 2014 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2685110&tool=pmcentrez&endertype=abstract>).
- Diroma, Maria Angela, Paolo Lubisco, and Marcella Attimonelli. 2016. “A Comprehensive Collection of Annotations to Interpret Sequence Variation in Human Mitochondrial Transfer RNAs.” *BMC Bioinformatics* 17(S12):338. Retrieved April 13, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28185569>).
- Dorfman, Ruslan et al. 2008. “Complex Two-Gene Modulation of Lung Disease Severity in Children with Cystic Fibrosis.” *The Journal of Clinical Investigation* 118(3):1040–49. Retrieved April 12, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292811>).
- Doudna, Jennifer A. et al. 2014. “Genome Editing. The New Frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9.” *Science (New York, N.Y.)* 346(6213):1258096. Retrieved August 26, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25430774>).
- Drumm, Mitchell L. et al. 2005. “Genetic Modifiers of Lung Disease in Cystic Fibrosis.” *New England Journal of Medicine* 353(14):1443–53. Retrieved April 12, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16207846>).
- Dryja, T. P. et al. 1990. “A Point Mutation of the Rhodopsin Gene in One Form of Retinitis Pigmentosa.” *Nature* 343(6256):364–66. Retrieved August 5, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2137202>).
- Dryja, T. P., L. B. Hahn, K. Kajiwarra, and E. L. Berson. 1997. “Dominant and Digenic Mutations in the peripherin/RDS and ROM1 Genes in Retinitis Pigmentosa.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 38(10):1972–82. Retrieved July 30, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9331261>).
- Dueker, Nicole D. and Margaret A. Pericak-Vance. 2014. “Analysis of Genetic Linkage Data for Mendelian Traits.” *Current Protocols in Human Genetics / Editorial Board, Jonathan L. Haines ... [et Al.]* 83:1.4.1-1.4.31. Retrieved August 27, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25271837>).
- Dunn, K. C., A. E. Aotakiil-Keen, F. R. Putkey, and L. M. Hjelmeland. 1996. “ARPE-19, A Human Retinal Pigment Epithelial Cell Line with Differentiated Properties.” *Experimental Eye Research* 62(2):155–70. Retrieved October 1, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8698076>).
- Dvir, Liron et al. 2010. “Autosomal-Recessive Early-Onset Retinitis Pigmentosa Caused by a Mutation in PDE6G, the Gene Encoding the Gamma Subunit of Rod cGMP Phosphodiesterase.” *American Journal of Human Genetics* 87(2):258–64. Retrieved August 27, 2015

(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2917712&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

- Edwards, A. O. 2008. "Clinical Features of the Congenital Vitreoretinopathies." *Eye (London, England)* 22(10):1233–42. Retrieved August 26, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18309337>).
- Eisenberger, Tobias et al. 2013. "Increasing the Yield in Targeted Next-Generation Sequencing by Implicating CNV Analysis, Non-Coding Exons and the Overall Variant Load: The Example of Retinal Dystrophies" edited by T. Li. *PLoS ONE* 8(11):e78496. Retrieved November 22, 2013 (<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0078496>).
- El-Asrag, Mohammed E. et al. 2015. "Biallelic Mutations in the Autophagy Regulator DRAM2 Cause Retinal Dystrophy with Early Macular Involvement." *American Journal of Human Genetics* 96(6):948–54. Retrieved August 7, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25983245>).
- Ellingford, Jamie M., Stephanie Barton, Sanjeev Bhaskar, James O'Sullivan, et al. 2016. "Molecular Findings from 537 Individuals with Inherited Retinal Disease." *Journal of Medical Genetics* jmedgenet-2016-103837. Retrieved June 21, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27208204>).
- Ellingford, Jamie M., Stephanie Barton, Sanjeev Bhaskar, Simon G. Williams, et al. 2016. "Whole Genome Sequencing Increases Molecular Diagnostic Yield Compared with Current Diagnostic Testing for Inherited Retinal Disease." *Ophthalmology* 123(5):1143–50. Retrieved February 14, 2017 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161642016000300>).
- Eudy, J. D. et al. 1998. "Mutation of a Gene Encoding a Protein with Extracellular Matrix Motifs in Usher Syndrome Type IIa." *Science (New York, N.Y.)* 280(5370):1753–57. Retrieved August 31, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9624053>).
- Fahim, Abigail T., Stephen P. Daiger, and Richard G. Weleber. 2013. "Retinitis Pigmentosa Overview." Retrieved August 25, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1417/>).
- Failler, Marion et al. 2014. "Mutations of CEP83 Cause Infantile Nephronophthisis and Intellectual Disability." *American Journal of Human Genetics* 94(6):905–14. Retrieved December 29, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4121475&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Falk, Marni J. et al. 2012. "NMNAT1 Mutations Cause Leber Congenital Amaurosis." *Nature Genetics* 44(9):1040–45. Retrieved January 30, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842227>).
- Fathinajafabadi, Alihamze, Eva Pérez-Jiménez, Marina Riera, Erwin Knecht, and Roser González-Duarte. 2014. "CERKL, a Retinal Disease Gene, Encodes an mRNA-Binding Protein That Localizes in Compact and Untranslated mRNPs Associated with Microtubules." *PLoS One* 9(2):e87898. Retrieved August 26, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3912138&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Fernandez-San Jose, Patricia et al. 2015. "Targeted Next-Generation Sequencing Improves the Diagnosis of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa in Spanish Patients." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56(4):2173–82. Retrieved August 3, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25698705>).

- Fokkema, Ivo F. A. C. et al. 2011. "LOVD v.2.0: The next Generation in Gene Variant Databases." *Human Mutation* 32(5):557–63. Retrieved October 29, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21520333>).
- Fry, A. M. et al. 1998. "C-Nap1, a Novel Centrosomal Coiled-Coil Protein and Candidate Substrate of the Cell Cycle-Regulated Protein Kinase Nek2." *The Journal of Cell Biology* 141(7):1563–74. Retrieved December 22, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2133000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Fu, Qing et al. 2016. "CEP78 Is Mutated in a Distinct Type of Usher Syndrome." *Journal of Medical Genetics*. Retrieved November 28, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27627988>).
- Furgoch, Mira J. B., Jacqueline Mewes-Arès, Alina Radziwon, and Ian M. Macdonald. 2014. "Molecular Genetic Diagnostic Techniques in Choroideremia." *Molecular Vision* 20:535–44. Retrieved October 21, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4000712&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Ge, Zhongqi et al. 2015. "NGS-Based Molecular Diagnosis of 105 eyeGENE(®) Proband with Retinitis Pigmentosa." *Scientific Reports* 5:18287. Retrieved February 23, 2016 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4678898&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Ghazi, Nicola G. et al. 2016. "Treatment of Retinitis Pigmentosa due to MERTK Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Results of a Phase I Trial." *Human Genetics* 135(3):327–43. Retrieved April 20, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26825853>).
- Gillespie, Rachel L. et al. 2015. "Abrogation of HMX1 Function Causes Rare Oculoauricular Syndrome Associated with Congenital Cataract, Anterior Segment Dysgenesis, and Retinal Dystrophy." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56(2):883–91. Retrieved August 7, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25574057>).
- Glöckle, Nicola et al. 2013. "Panel-Based next Generation Sequencing as a Reliable and Efficient Technique to Detect Mutations in Unselected Patients with Retinal Dystrophies." *European Journal of Human Genetics: EJHG* (November 2012):1–6. Retrieved August 20, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23591405>).
- Gong, Xiaoming, Meredith Harrell, Dianne Mitchell, Olof Sundin, and Lewis Rubin. 2014. "A New Human Retinal Pigment Epithelial Cell Model for Interrogating the Protective Functions of Xanthophylls in Retinopathies (39.2)." *FASEB J* 28(1_Supplement):39.2-. Retrieved November 6, 2015 (http://www.fasebj.org/content/28/1_Supplement/39.2).
- González-Del Pozo, María et al. 2014. "Deciphering Intrafamilial Phenotypic Variability by Exome Sequencing in a Bardet-Biedl Family." *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2(2):124–33. Retrieved April 25, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24689075>).
- Goodwin, Sara, John D. McPherson, and W.Richard McCombie. 2016. "Coming of Age: Ten Years of next-Generation Sequencing Technologies." *Nature Reviews Genetics* 17(6):333–51. Retrieved August 25, 2016 (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg.2016.49>).
- Gorman, Gráinne S. et al. 2016. "Mitochondrial Diseases." *Nature Reviews Disease Primers* 2:16080. Retrieved April 13, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27775730>).
- Gorman, Grainne S. and Robert W. Taylor. 2011. "Mitochondrial DNA Abnormalities in

- Ophthalmological Disease.” *Saudi Journal of Ophthalmology* 25(4):395–404. Retrieved December 2, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23960954>).
- Haji Abdollahi, Sara and Tatsuo Hirose. 2013. “Stargardt-Fundus Flavimaculatus: Recent Advancements and Treatment.” *Seminars in Ophthalmology* 28(5–6):372–76. Retrieved August 25, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24138045>).
- Hamel, Christian P. 2006. “Retinitis Pigmentosa.” *Orphanet Journal of Rare Diseases* 1(1):40. Retrieved June 13, 2015 (<http://www.ocrd.com/content/1/1/40>).
- Hamel, Christian P. 2007. “Cone Rod Dystrophies.” *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2:7. Retrieved March 8, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17270046>).
- Hartong, Dyonne T., Eliot L. Berson, and Thaddeus P. Dryja. 2006. “Retinitis Pigmentosa.” *Lancet* 368(9549):1795–1809. Retrieved May 25, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17113430>).
- Hebsgaard, S. M. et al. 1996. “Splice Site Prediction in Arabidopsis Thaliana Pre-mRNA by Combining Local and Global Sequence Information.” *Nucleic Acids Research* 24(17):3439–52. Retrieved November 4, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146109&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Hohman, Thomas C. 2016. “Hereditary Retinal Dystrophy.” in *Handbook of experimental pharmacology*. Retrieved February 15, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28035529>).
- den Hollander, Anneke I. et al. 2006. “Mutations in the CEP290 (NPHP6) Gene Are a Frequent Cause of Leber Congenital Amaurosis.” *American Journal of Human Genetics* 79(3):556–61. Retrieved June 3, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1559533&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Den Hollander, Anneke I., Aaron Black, Jean Bennett, and Frans P. M. Cremers. 2010. “Lighting a Candle in the Dark: Advances in Genetics and Gene Therapy of Recessive Retinal Dystrophies.” 120(9).
- den Hollander, Anneke I., Ronald Roepman, Robert K. Koenekoop, and Frans P. M. Cremers. 2008. “Leber Congenital Amaurosis: Genes, Proteins and Disease Mechanisms.” *Progress in Retinal and Eye Research* 27(4):391–419. Retrieved September 5, 2011 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18632300>).
- van Huet, Ramon A. C. et al. 2015. “The Efficacy of Microarray Screening for Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa in Routine Clinical Practice.” *Molecular Vision* 21:461–76. Retrieved June 3, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4415583&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Huynh, Nancy, Brett G. Jeffrey, Amy Turriff, Paul A. Sieving, and Catherine A. Cukras. 2014. “Sorting out Co-Occurrence of Rare Monogenic Retinopathies: Stargardt Disease Co-Existing with Congenital Stationary Night Blindness.” *Ophthalmic Genetics* 35(1):51–56. Retrieved April 21, 2017 (<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13816810.2013.865762>).
- Imamoto, Yasushi and Yoshinori Shichida. 2014. “Cone Visual Pigments.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1837(5):664–73. Retrieved August 5, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24021171>).

- Iwanami, Masaki, Mio Oshikawa, Tomomi Nishida, Satoshi Nakadomari, and Seishi Kato. 2012. "High Prevalence of Mutations in the EYS Gene in Japanese Patients with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53(2):1033–40. Retrieved October 21, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22302105>).
- Jaakson, K. et al. 2003. "Genotyping Microarray (Gene Chip) for the ABCR (ABCA4) Gene." *Human Mutation* 22(5):395–403. Retrieved July 23, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14517951>).
- Kajiwara, K., E. L. Berson, and T. P. Dryja. 1994. "Digenic Retinitis Pigmentosa due to Mutations at the Unlinked peripherin/RDS and ROM1 Loci." *Science (New York, N.Y.)* 264(5165):1604–8. Retrieved July 9, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8202715>).
- Karali, Marianthi and Sandro Banfi. 2015. "Inherited Retinal Dystrophies: The Role of Gene Expression Regulators." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 61:115–19. Retrieved August 18, 2015 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272515000503>).
- Kartasasmita, Arief et al. 2011. "A Novel Nonsense Mutation in Rhodopsin Gene in Two Indonesian Families with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa." *Ophthalmic Genetics* 32(1):57–63. Retrieved August 7, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21174529>).
- Katsanis, N. et al. 2001. "Triallelic Inheritance in Bardet-Biedl Syndrome, a Mendelian Recessive Disorder." *Science* 293(5538):2256–59. Retrieved April 12, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567139>).
- Kettleborough, Ross N. W. et al. 2013. "A Systematic Genome-Wide Analysis of Zebrafish Protein-Coding Gene Function." *Nature* 496(7446):494–97. Retrieved May 17, 2017 (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature11992>).
- Khateb, Samer et al. 2014. "A Homozygous Nonsense CEP250 Mutation Combined with a Heterozygous Nonsense C2orf71 Mutation Is Associated with Atypical Usher Syndrome." *Journal of Medical Genetics* 51(7):460–69. Retrieved December 3, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24780881>).
- Kloeckener-Gruissem, Barbara and Christoph Amstutz. 2012. "VCAN-Related Vitreoretinopathy." Retrieved August 26, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3821/>).
- Kohl, Susanne et al. 2015. "Mutations in the Unfolded Protein Response Regulator ATF6 Cause the Cone Dysfunction Disorder Achromatopsia." *Nature Genetics* 47(7):757–65. Retrieved August 7, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26029869>).
- Köhn, Linda et al. 2009. "Breakpoint Characterization of a Novel Approximately 59 Kb Genomic Deletion on 19q13.42 in Autosomal-Dominant Retinitis Pigmentosa with Incomplete Penetrance." *European Journal of Human Genetics: EJHG* 17(5):651–55. Retrieved December 1, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19050727>).
- Kolb, Helga. 2003. "How the Retina Works." *American Scientist*. Retrieved (<http://www.americanscientist.org/issues/feature/how-the-retina-works/1>).
- Kolb, Helga. 2007a. "Inner Plexiform Layer." *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Retrieved August 6, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11536/>).

- Kolb, Helga. 2007b. "Morphology and Circuitry of Ganglion Cells - PubMed - NCBI." *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Retrieved August 6, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413393>).
- Kolb, Helga. 2012. "Photoreceptors." *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Retrieved August 5, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413383>).
- Kumar, Prateek, Steven Henikoff, and Pauline C. Ng. 2009. "Predicting the Effects of Coding Non-Synonymous Variants on Protein Function Using the SIFT Algorithm." *Nature Protocols* 4(7):1073–81. Retrieved July 14, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19561590>).
- Kurg, A. et al. 2000. "Arrayed Primer Extension: Solid-Phase Four-Color DNA Resequencing and Mutation Detection Technology." *Genetic Testing* 4(1):1–7. Retrieved August 26, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794354>).
- Kurosaki, T. and L. E. Maquat. 2016. "Nonsense-Mediated mRNA Decay in Humans at a Glance." *Journal of Cell Science* 129(3):461–67. Retrieved May 15, 2017 (<http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.181008>).
- Lamb, Trevor D. 2013. "Evolution of Phototransduction, Vertebrate Photoreceptors and Retina." *Progress in Retinal and Eye Research* 36:52–119. Retrieved July 9, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23792002>).
- Lazar, Csilla H. et al. 2015. "Whole Exome Sequencing Reveals GUCY2D as a Major Gene Associated with Cone and Cone-Rod Dystrophy in Israel." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56(1):420–30. Retrieved October 20, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4296770&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Lee, Ji Eun et al. 2012. "CEP41 Is Mutated in Joubert Syndrome and Is Required for Tubulin Glutamylation at the Cilium." *Nature Genetics* 44(2):193–99. Retrieved November 6, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3267856&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Lee, Kristy and Seema Garg. 2015. "Navigating the Current Landscape of Clinical Genetic Testing for Inherited Retinal Dystrophies." *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 17(4):245–52. Retrieved July 30, 2015 (<http://www.readcube.com/articles/10.1038%2Fgim.2015.15>).
- Li, Jianli et al. 2016. "Improved Diagnosis of Inherited Retinal Dystrophies by High-Fidelity PCR of ORF15 Followed by Next-Generation Sequencing." *The Journal of Molecular Diagnostics* 18(6):817–24. Retrieved February 14, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27620828>).
- Li, Shiqiang et al. 2014. "Exome Sequencing Reveals CHM Mutations in Six Families with Atypical Choroideremia Initially Diagnosed as Retinitis Pigmentosa." *International Journal of Molecular Medicine* 34(2):573–77. Retrieved December 2, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24913019>).
- Lieschke, Graham J. and Peter D. Currie. 2007. "Animal Models of Human Disease: Zebrafish Swim into View." *Nature Reviews. Genetics* 8(5):353–67. Retrieved July 10, 2014 (<http://www.readcube.com/articles/10.1038/nrg2091>).
- Littink, Karin W. et al. 2010. "A Novel Nonsense Mutation in CEP290 Induces Exon Skipping and Leads to a Relatively Mild Retinal Phenotype." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51(7):3646–52. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20130272>).

- M'hamdi, O., I. Ouertani, and H. Chaabouni-Bouhamed. 2014. "Update on the Genetics of Bardet-Biedl Syndrome." *Molecular Syndromology* 5(2):51–56. Retrieved June 1, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3977223&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- MacDonald, Ian M., Stacey Hume, Stephanie Chan, and Miguel C. Seabra. 2015. "Choroideremia." Retrieved July 29, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1337/>).
- MacDonald, Ian M., Laurie Russell, and Chi-Chao Chan. 2009. "Choroideremia: New Findings from Ocular Pathology and Review of Recent Literature." *Survey of Ophthalmology* 54(3):401–7. Retrieved July 3, 2014 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2679958&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- MacLaren, Robert E. et al. 2014. "Retinal Gene Therapy in Patients with Choroideremia: Initial Findings from a Phase 1/2 Clinical Trial." *Lancet* 383(9923):1129–37. Retrieved June 9, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4171740&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Mandal, Md Nawajes A. et al. 2005. "Sequencing Arrays for Screening Multiple Genes Associated with Early-Onset Human Retinal Degenerations on a High-Throughput Platform." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46(9):3355–62. Retrieved August 3, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16123440>).
- Marfany, Gemma and Roser González-Duarte. 2015. "Clinical Applications of High-Throughput Genetic Diagnosis in Retinal Dystrophies: Present Challenges and Future Directions." *World J Med Genet* 5(2):14–22.
- Masland, R. H. 2001. "The Fundamental Plan of the Retina." *Nature Neuroscience* 4(9):877–86. Retrieved May 7, 2015 (<http://www.nature.com.sire.ub.edu/neuro/journal/v4/n9/full/nn0901-877.html>).
- Mathur, Pranav and Jun Yang. 2015. "Usher Syndrome: Hearing Loss, Retinal Degeneration and Associated Abnormalities." *Biochimica et Biophysica Acta* 1852(3):406–20. Retrieved July 29, 2015 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443914003627>).
- Matsuoka, Ryota L., Lu O. Sun, Kei-ichi Katayama, Yutaka Yoshida, and Alex L. Kolodkin. 2013. "Sema6B, Sema6C, and Sema6D Expression and Function during Mammalian Retinal Development." *PloS One* 8(4):e63207. Retrieved December 29, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3640007&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- McAlear, Suzanne D., Timothy W. Kraft, and Alecia K. Gross. 2010. "1 Rhodopsin Mutations in Congenital Night Blindness." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 664:263–72. Retrieved August 7, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20238025>).
- McQuillan, Ruth et al. 2008. "Runs of Homozygosity in European Populations." *American Journal of Human Genetics* 83(3):359–72. Retrieved August 27, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2556426&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Metzker, Michael L. 2010. "Sequencing Technologies - the next Generation." *Nature Reviews. Genetics* 11(1):31–46. Retrieved July 9, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19997069>).

- Meyerson, Cherise, Greg Van Stavern, and Collin McClelland. 2015. "Leber Hereditary Optic Neuropathy: Current Perspectives." *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)* 9:1165–76. Retrieved November 10, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4492634&tool=pmcentrez&endertype=abstract>).
- Molday, L. L., A. R. Rabin, and R. S. Molday. 2000. "ABCR Expression in Foveal Cone Photoreceptors and Its Role in Stargardt Macular Dystrophy." *Nature Genetics* 25(3):257–58. Retrieved July 30, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10888868>).
- Molday, Laurie L., Thomas Jefferies, and Robert S. Molday. 2014. "Insights into the Role of RD3 in Guanylate Cyclase Trafficking, Photoreceptor Degeneration, and Leber Congenital Amaurosis." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7:44. Retrieved August 23, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4033307&tool=pmcentrez&endertype=abstract>).
- Molday, Robert S. and Kang Zhang. 2010. "Defective Lipid Transport and Biosynthesis in Recessive and Dominant Stargardt Macular Degeneration." *Progress in Lipid Research* 49(4):476–92. Retrieved August 25, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2946192&tool=pmcentrez&endertype=abstract>).
- Montfort, Magda, Amparo Chabás, Lluïsa Vilageliu, and Daniel Grinberg. 2004. "Functional Analysis of 13 GBA Mutant Alleles Identified in Gaucher Disease Patients: Pathogenic Changes and "modifier" Polymorphisms." *Human Mutation* 23(6):567–75. Retrieved May 9, 2017 (<http://doi.wiley.com/10.1002/humu.20043>).
- Namburi, Prasanthi et al. 2016. "Bi-Allelic Truncating Mutations in CEP78, Encoding Centrosomal Protein 78, Cause Cone-Rod Degeneration with Sensorineural Hearing Loss." *American Journal of Human Genetics* 99(3):777–84. Retrieved November 28, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27588452>).
- Napier, Maria L. et al. 2014. "Mutational Analysis of the Rhodopsin Gene in Sector Retinitis Pigmentosa." *Ophthalmic Genetics* 1–5. Retrieved August 3, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25265376>).
- Neveling, Kornelia et al. 2012. "Next-Generation Genetic Testing for Retinitis Pigmentosa." *Human Mutation* 33(6):963–72. Retrieved December 1, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22334370>).
- Neveling, Kornelia, Anneke I. den Hollander, Frans P. M. Cremers, and Rob W. J. Collin. 2013. "Identification and Analysis of Inherited Retinal Disease Genes." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 935:3–23. Retrieved July 8, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23150357>).
- Ng, Sarah B. et al. 2010. "Exome Sequencing Identifies the Cause of a Mendelian Disorder." *Nature Genetics* 42(1):30–35. Retrieved May 24, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2847889&tool=pmcentrez&endertype=abstract>).
- Nikopoulos, Konstantinos et al. 2010. "Next-Generation Sequencing of a 40 Mb Linkage Interval Reveals TSPAN12 Mutations in Patients with Familial Exudative Vitreoretinopathy." *American Journal of Human Genetics* 86(2):240–47. Retrieved August 27, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2820179&tool=pmcentrez&endertype=abstract>).
- Nikopoulos, Konstantinos et al. 2016. "Mutations in CEP78 Cause Cone-Rod Dystrophy and

- Hearing Loss Associated with Primary-Cilia Defects.” *American Journal of Human Genetics* 99(3):770–76. Retrieved November 28, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27588451>).
- Nishiguchi, Koji M. et al. 2013. “Whole Genome Sequencing in Patients with Retinitis Pigmentosa Reveals Pathogenic DNA Structural Changes and NEK2 as a New Disease Gene.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Retrieved September 22, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24043777>).
- Nishiguchi, Koji M. and Carlo Rivolta. 2012. “Genes Associated with Retinitis Pigmentosa and Allied Diseases Are Frequently Mutated in the General Population.” *PLoS One* 7(7):e41902. Retrieved October 9, 2014 (<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041902>).
- North, Victoria, Rony Gelman, and Stephen H. Tsang. 2014. “Juvenile-Onset Macular Degeneration and Allied Disorders.” *Developments in Ophthalmology* 53:44–52. Retrieved August 25, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4405533&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Novas, Rossina, Magdalena Cardenas-Rodriguez, Florencia Irigoín, and Jose L. Badano. 2015. “Bardet-Biedl Syndrome: Is It Only Cilia Dysfunction?” *FEBS Letters*. Retrieved August 26, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26231314>).
- Pachydaki, Sophia I. and Lucy H. Young. 2007. “Genetics of Hereditary Vitreoretinal Degenerations.” *Seminars in Ophthalmology* 22(4):219–27. Retrieved August 26, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18097985>).
- Poloschek, Charlotte M. et al. 2010. “*ABCA4* and *ROM1*: Implications for Modification of the *PRPH2* -Associated Macular Dystrophy Phenotype.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51(8):4253. Retrieved February 14, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20335603>).
- Pomares, Esther et al. 2009. “Identification of an Intronic Single-Point Mutation in RP2 as the Cause of Semidominant X-Linked Retinitis Pigmentosa.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50(11):5107–14. Retrieved November 6, 2015 (<http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2164700>).
- Pomares, Esther et al. 2010. “Comprehensive SNP-Chip for Retinitis Pigmentosa-Leber Congenital Amaurosis Diagnosis: New Mutations and Detection of Mutational Founder Effects.” *European Journal of Human Genetics : EJHG* 18(1):118–24. Retrieved March 5, 2012 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2987167&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Pomares, Esther, Gemma Marfany, Maria José Brión, Angel Carracedo, and Roser González-Duarte. 2007. “Novel High-Throughput SNP Genotyping Cosegregation Analysis for Genetic Diagnosis of Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa and Leber Congenital Amaurosis.” *Human Mutation* 28(February):511–16.
- Priya, Sathya, Sheela Nampoothiri, Parveen Sen, and S. Sripriya. 2016. “Bardet-Biedl Syndrome: Genetics, Molecular Pathophysiology, and Disease Management.” *Indian Journal of Ophthalmology* 64(9):620–27. Retrieved April 25, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27853007>).
- Ramkumar, Hema L. et al. 2016. “A Report on Molecular Diagnostic Testing for Inherited Retinal Dystrophies by Targeted Genetic Analyses.” *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* gtm.2016.0251. Retrieved February 14, 2017

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28005406>).

- Rattner, A., H. Sun, and J. Nathans. 1999. "Molecular Genetics of Human Retinal Disease." *Annual Review of Genetics* 33:89–131. Retrieved July 8, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10690405>).
- Remmer, Meredith H., Neelesh Rastogi, Milan P. Ranka, and Emily J. Ceisler. 2015. "Achromatopsia: A Review." *Current Opinion in Ophthalmology* 26(5):333–40. Retrieved August 25, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26196097>).
- Richards, Sue et al. 2015. "Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology." *Genetics in Medicine* 17(5):405–24. Retrieved March 5, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4544753&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Rivas, Miren Agurtzane and Elena Vecino. 2009. "Animal Models and Different Therapies for Treatment of Retinitis Pigmentosa." *Histology and Histopathology* 24(10):1295–1322. Retrieved November 6, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19688697>).
- Rivolta, Carlo, E. A. Sweklo, E. L. Berson, and T. P. Dryja. 2000. "Missense Mutation in the USH2A Gene: Association with Recessive Retinitis Pigmentosa without Hearing Loss." *American Journal of Human Genetics* 66(6):1975–78. Retrieved June 6, 2012 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1378039&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Robin, Nathaniel H., Rocio T. Moran, and Leena Ala-Kokko. 2014. "Stickler Syndrome." Retrieved August 26, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1302/>).
- Roman-Sanchez, Ramon, Theodore G. Wensel, and John H. Wilson. 2015. "Nonsense Mutations in the Rhodopsin Gene That Give Rise to Mild Phenotypes Trigger mRNA Degradation in Human Cells by Nonsense-Mediated Decay." *Experimental Eye Research*. Retrieved October 20, 2015 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483515300348>).
- Roosing, Susanne et al. 2014. "Causes and Consequences of Inherited Cone Disorders." *Progress in Retinal and Eye Research* 42:1–26. Retrieved July 8, 2015 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350946214000275>).
- Rose, A. M. and S. S. Bhattacharya. 2016. "Variant Haploinsufficiency and Phenotypic Non-Penetrance in PRPF31-Associated Retinitis Pigmentosa." *Clinical Genetics* 90(2):118–26. Retrieved October 28, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26853529>).
- Rose, Anna M. et al. 2016. "Transcriptional Regulation of PRPF31 Gene Expression by MSR1 Repeat Elements Causes Incomplete Penetrance in Retinitis Pigmentosa." *Scientific Reports* 6(1):19450. Retrieved May 9, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26781568>).
- Ross, M. H. and W. Pawlina. 2008. *Histología*. 5^a. Madrid.
- Rowe, Michael H. 2002. "Trichromatic Color Vision in Primates." *News Physiol Sci* 17(3):93–98. Retrieved August 6, 2015 (<http://physiologyonline.physiology.org/content/17/3/93>).
- Royer-Bertrand, Beryl and Carlo Rivolta. 2015. "Whole Genome Sequencing as a Means to Assess Pathogenic Mutations in Medical Genetics and Cancer." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 72(8):1463–71. Retrieved August 27, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25548800>).

- Rozet, J. M. et al. 2002. "Dominant X Linked Retinitis Pigmentosa Is Frequently Accounted for by Truncating Mutations in Exon ORF15 of the RPGR Gene." *Journal of Medical Genetics* 39(4):284–85. Retrieved July 8, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1735080&tool=pmcentrez&endertype=abstract>).
- Sadun, Alfredo A., Chiara La Morgia, and Valerio Carelli. 2011. "Leber's Hereditary Optic Neuropathy." *Current Treatment Options in Neurology* 13(1):109–17. Retrieved July 8, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21063922>).
- Sahel, José-Alain, Katia Marazova, and Isabelle Audo. 2015. "Clinical Characteristics and Current Therapies for Inherited Retinal Degenerations." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5(2):a017111. Retrieved March 8, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25324231>).
- Sangermano, Riccardo et al. 2016. "Photoreceptor Progenitor mRNA Analysis Reveals Exon Skipping Resulting from the ABCA4 c.5461-10T→C Mutation in Stargardt Disease." *Ophthalmology* 123(6):1375–85. Retrieved August 26, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26976702>).
- Saqib, Muhammad Arif Nadeem et al. 2015. "Homozygosity Mapping Reveals Novel and Known Mutations in Pakistani Families with Inherited Retinal Dystrophies." *Scientific Reports* 5:9965. Retrieved June 19, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4421863&tool=pmcentrez&endertype=abstract>).
- Schorderet, Daniel F. and Pascal Escher. 2009. "NR2E3 Mutations in Enhanced S-Cone Sensitivity Syndrome (ESCS), Goldmann-Favre Syndrome (GFS), Clumped Pigmentary Retinal Degeneration (CPRD), and Retinitis Pigmentosa (RP)." *Human Mutation* 30(11):1475–85. Retrieved July 30, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19718767>).
- Schorderet, Daniel F., Alexandra Iouranova, Tatiana Favez, Leila Tiab, and Pascal Escher. 2013. "IROme, a New High-Throughput Molecular Tool for the Diagnosis of Inherited Retinal Dystrophies." *BioMed Research International* 2013:198089. Retrieved September 1, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3591198&tool=pmcentrez&endertype=abstract>).
- Schwarz, Jana Marie, Christian Rödelsperger, Markus Schuelke, and Dominik Seelow. 2010. "MutationTaster Evaluates Disease-Causing Potential of Sequence Alterations." *Nature Methods* 7(8):575–76. Retrieved May 31, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676075>).
- Siemiakowska, Anna M., Rob W. J. Collin, Anneke I. den Hollander, and Frans P. M. Cremers. 2014. "Genomic Approaches for the Discovery of Genes Mutated in Inherited Retinal Degeneration." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4(8). Retrieved August 4, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24939053>).
- Siepel, Adam et al. 2005. "Evolutionarily Conserved Elements in Vertebrate, Insect, Worm, and Yeast Genomes." *Genome Research* 15(8):1034–50. Retrieved March 4, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1182216&tool=pmcentrez&endertype=abstract>).
- Slijkerman, Ralph W. N. et al. 2015. "The Pros and Cons of Vertebrate Animal Models for Functional and Therapeutic Research on Inherited Retinal Dystrophies." *Progress in Retinal and Eye Research*. Retrieved July 10, 2015

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25936606>).

- Srilekha, Sundaramurthy et al. 2015. "Homozygosity Mapping in Leber Congenital Amaurosis and Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa in South Indian Families." *PloS One* 10(7):e0131679. Retrieved August 4, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4493089&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Stenson, Peter D. et al. 2012. "The Human Gene Mutation Database (HGMD) and Its Exploitation in the Fields of Personalized Genomics and Molecular Evolution." *Current Protocols in Bioinformatics / Editorial Board, Andreas D. Baxevanis ... [et Al.]* Chapter 1:Unit1.13. Retrieved July 4, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22948725>).
- Strauss, Olaf. 2005. "The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function." *Physiological Reviews* 85(3):845–81. Retrieved April 23, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987797>).
- Sullivan, Lori S. et al. 2006. "Genomic Rearrangements of the *PRPF31* Gene Account for 2.5% of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47(10):4579. Retrieved February 8, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17003455>).
- Sullivan, Lori S. et al. 2014. "A Dominant Mutation in Hexokinase 1 (HK1) Causes Retinitis Pigmentosa." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 55(11):7147–58. Retrieved August 27, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4224580&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Sundaram, Venki, Anthony T. Moore, Robin R. Ali, and James W. B. Bainbridge. 2011. "Educational Paper: Retinal Dystrophies and Gene Therapy." *European Journal of Pediatrics* 757–65. Retrieved March 11, 2012 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22080959>).
- Sung, Ching-Hwa and Jen-Zen Chuang. 2010. "The Cell Biology of Vision." *The Journal of Cell Biology* 190(6):953–63. Retrieved March 31, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3101587&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Swaroop, Anand, Douglas Kim, and Douglas Forrester. 2010. "Transcriptional Regulation of Photoreceptor Development and Homeostasis in the Mammalian Retina." *Nature Reviews. Neuroscience* 11(8):563–76. Retrieved April 3, 2015 (<http://www.nature.com.sire.ub.edu/nrn/journal/v11/n8/full/nrn2880.html>).
- Szlyk, J. P. et al. 2001. "Perceived and Actual Performance of Daily Tasks: Relationship to Visual Function Tests in Individuals with Retinitis Pigmentosa." *Ophthalmology* 108(1):65–75. Retrieved August 31, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11150266>).
- Tanackovic, Goranka et al. 2011. "PRPF Mutations Are Associated with Generalized Defects in Spliceosome Formation and Pre-mRNA Splicing in Patients with Retinitis Pigmentosa." *Human Molecular Genetics* 20(11):2116–30. Retrieved July 30, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3090192&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Tanos, B. E. et al. 2013. "Centriole Distal Appendages Promote Membrane Docking, Leading to Cilia Initiation." *Genes & Development* 27(2):163–68. Retrieved October 7, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3566309&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

- Tattini, Lorenzo, Romina D'Aurizio, and Alberto Magi. 2015. "Detection of Genomic Structural Variants from Next-Generation Sequencing Data." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3:92. Retrieved July 12, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4479793&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Thomas, Philip and Trevor G. Smart. 2005. "HEK293 Cell Line: A Vehicle for the Expression of Recombinant Proteins." *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 51(3):187–200. Retrieved July 9, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15862464>).
- Toma, Claudio et al. 2015. "Common and Rare Variants of microRNA Genes in Autism Spectrum Disorders." *The World Journal of Biological Psychiatry* 16(6):376–86. Retrieved May 8, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25903372>).
- Turner, Daniel J. et al. 2008. "Germline Rates of de Novo Meiotic Deletions and Duplications Causing Several Genomic Disorders." *Nature Genetics* 40(1):90–95. Retrieved February 8, 2017 (<http://www.nature.com/doi/10.1038/ng.2007.40>).
- Tuson, Miquel, Gemma Marfany, and Roser González-Duarte. 2004. "Mutation of CERKL, a Novel Human Ceramide Kinase Gene, Causes Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa (RP26)." *American Journal of Human Genetics* 74(1):128–38. Retrieved August 27, 2015 (<http://www.cell.com/article/S000292970761951X/fulltext>).
- Vaché, Christel et al. 2012. "Usher Syndrome Type 2 Caused by Activation of an USH2A Pseudoxon: Implications for Diagnosis and Therapy." *Human Mutation* 33(1):104–8. Retrieved October 20, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22009552>).
- Venturini, Giulia, Anna M. Rose, Amna Z. Shah, Shomi S. Bhattacharya, and Carlo Rivolta. 2012. "CNOT3 Is a Modifier of PRPF31 Mutations in Retinitis Pigmentosa with Incomplete Penetrance." *PLoS Genetics* 8(11):e1003040. Retrieved May 7, 2014 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3493449&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Vithana, Eranga N. et al. 2001. "A Human Homolog of Yeast Pre-mRNA Splicing Gene, PRP31, Underlies Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa on Chromosome 19q13.4 (RP11)." *Molecular Cell* 8(2):375–81. Retrieved July 8, 2015 (<http://www.cell.com/article/S1097276501003057/fulltext>).
- Wada, Yuko et al. 2003. "Autosomal Dominant Macular Degeneration Associated with 208delG Mutation in the FSCN2 Gene." *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 121(11):1613–20. Retrieved July 30, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14609921>).
- Walia, Saloni and Gerald A. Fishman. 2009. "Natural History of Phenotypic Changes in Stargardt Macular Dystrophy." *Ophthalmic Genetics* 30(2):63–68. Retrieved July 24, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19373676>).
- Wallace, D. C. et al. 1988. "Mitochondrial DNA Mutation Associated with Leber's Hereditary Optic Neuropathy." *Science (New York, N.Y.)* 242(4884):1427–30. Retrieved August 24, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3201231>).
- Wanders, Ronald JA, Hans R. Waterham, and Bart P. Leroy. 2015. *Refsum Disease*. University of Washington, Seattle. Retrieved February 14, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301527>).
- Wang, Feng et al. 2013. "Next Generation Sequencing-Based Molecular Diagnosis of Retinitis Pigmentosa: Identification of a Novel Genotype-Phenotype Correlation and Clinical

- Refinements.” *Human Genetics*. Retrieved October 29, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24154662>).
- Wang, Feng et al. 2014. “Next Generation Sequencing-Based Molecular Diagnosis of Retinitis Pigmentosa: Identification of a Novel Genotype-Phenotype Correlation and Clinical Refinements.” *Human Genetics* 133(3):331–45. Retrieved April 29, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3945441&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Wang, Qing-liang et al. 2004. “QRX, a Novel Homeobox Gene, Modulates Photoreceptor Gene Expression.” *Human Molecular Genetics* 13(10):1025–40. Retrieved July 24, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15028672>).
- Wässle, Heinz. 2004. “Parallel Processing in the Mammalian Retina.” *Nature Reviews. Neuroscience* 5(10):747–57. Retrieved July 10, 2014 (<http://www.nature.com.sire.ub.edu/nrn/journal/v5/n10/full/nrn1497.html>).
- Weil, D. 2003. “Usher Syndrome Type I G (USH1G) Is Caused by Mutations in the Gene Encoding SANS, a Protein That Associates with the USH1C Protein, Harmonin.” *Human Molecular Genetics* 12(5):463–71. Retrieved August 27, 2015 (<http://hmg.oxfordjournals.org/content/12/5/463.long>).
- Welsch, U. 2010. *Histología*. 2^a. Madrid: Panamerica.
- Werdich, Xiang Q., Emily M. Place, and Eric A. Pierce. 2014. “Systemic Diseases Associated with Retinal Dystrophies.” *Seminars in Ophthalmology* 29(5–6):319–28. Retrieved July 29, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25325857>).
- Wilkinson-Berka, Jennifer L. 2004. “The Cellular Organisation of the Retina.” *Expert Reviews in Molecular Medicine* 6(15).
- Wolf, Barry. 2016. *Biotinidase Deficiency*. University of Washington, Seattle. Retrieved February 14, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301497>).
- Won, Jungyeon et al. 2009. “RPGRIP1 Is Essential for Normal Rod Photoreceptor Outer Segment Elaboration and Morphogenesis.” *Human Molecular Genetics* 18(22):4329–39. Retrieved July 30, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2766293&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Wright, Alan F., Christina F. Chakarova, Mai M. Abd El-Aziz, and Shomi S. Bhattacharya. 2010. “Photoreceptor Degeneration: Genetic and Mechanistic Dissection of a Complex Trait.” *Nature Reviews. Genetics* 11(4):273–84. Retrieved August 6, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20212494>).
- Xu, S. Y., M. Schwartz, T. Rosenberg, and A. Gal. 1996. “A Ninth Locus (RP18) for Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa Maps in the Pericentromeric Region of Chromosome 1.” *Human Molecular Genetics* 5(8):1193–97. Retrieved August 27, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8842740>).
- Yang, Shuo et al. 2016. “Long-Term Outcomes of Gene Therapy for the Treatment of Leber’s Hereditary Optic Neuropathy.” *EBioMedicine* 10:258–68. Retrieved April 20, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27426279>).
- Yau, King-Wai and Roger C. Hardie. 2009. “Phototransduction Motifs and Variations.” *Cell* 139(2):246–64. Retrieved July 24, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2885920&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

- Yu-Wai-Man, Patrick. 2015. "Therapeutic Approaches to Inherited Optic Neuropathies." *Seminars in Neurology* 35(5):578–86. Retrieved October 13, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26444403>).
- Zeitz, Christina. 2007. "Molecular Genetics and Protein Function Involved in Nocturnal Vision." *Expert Review of Ophthalmology* 2(3):467–85. Retrieved August 26, 2015 (<http://www.tandfonline-com.sire.ub.edu/doi/abs/10.1586/17469899.2.3.467?journalCode=ierl20#.Vd145lSsVD8>).
- Zeitz, Christina, Anthony G. Robson, and Isabelle Audo. 2015. "Congenital Stationary Night Blindness: An Analysis and Update of Genotype-Phenotype Correlations and Pathogenic Mechanisms." *Progress in Retinal and Eye Research* 45:58–110. Retrieved August 7, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25307992>).
- Zernant, Jana et al. 2005. "Genotyping Microarray (Disease Chip) for Leber Congenital Amaurosis: Detection of Modifier Alleles." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46(9):3052–59. Retrieved August 26, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16123401>).
- Zernant, Jana et al. 2014. "Analysis of the ABCA4 Genomic Locus in Stargardt Disease." *Human Molecular Genetics* 23(25):6797–6806. Retrieved March 17, 2016 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4245042&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Zhao, Chen et al. 2006. "A Novel Locus (RP33) for Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa Mapping to Chromosomal Region 2cen-q12.1." *Human Genetics* 119(6):617–23. Retrieved August 27, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16612614?dopt=Abstract>).
- Zhao, Chen et al. 2009. "Autosomal-Dominant Retinitis Pigmentosa Caused by a Mutation in SNRNP200, a Gene Required for Unwinding of U4/U6 snRNAs." *American Journal of Human Genetics* 85(5):617–27. Retrieved January 16, 2012 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2775825&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Zhao, Li et al. 2014. "Next-Generation Sequencing-Based Molecular Diagnosis of 82 Retinitis Pigmentosa Proband from Northern Ireland." *Human Genetics* 134:217–30. Retrieved (<http://link.springer.com/10.1007/s00439-014-1512-7>).
- Zhao, Yun et al. 2003. "The Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator (RPGR)- Interacting Protein: Subservient RPGR Function and Participating in Disk Morphogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(7):3965–70. Retrieved July 17, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=153031&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).