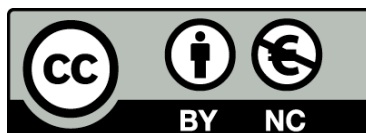




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

La funció de *CERKL* a la retina: generació d'un model de ratolí i anàlisi de la seva implicació en la resposta a estrès oxidatiu


Elena Borrego Domènech



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

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

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



**La funció de *CERKL* a la retina:
generació d'un model de ratolí i anàlisi
de la seva implicació en la resposta a
estrès oxidatiu**

Elena Borrego Domènech

2020

La funció de *CERKL* a la retina: generació d'un model de ratolí i anàlisi de la seva implicació en la resposta a estrès oxidatiu

Memòria presentada per
Elena Borrego Domènech

Per optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció i tutoria de la **Dra. Gemma Marfany Nadal** al
Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística,
Universitat de Barcelona

Programa de Genètica (HDK0S)



Dra. Gemma Marfany Nadal



Elena Borrego Domènech

A Barcelona, Juny del 2020



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

A la meva família

ABSTRACT

Close to one hundred genes cause Retinitis Pigmentosa (RP), a rare mendelian disease affecting 1:4,000 people worldwide. Mutations in *CERKL* cause autosomal recessive RP and cone-rod dystrophy, but the physiological role of this gene in the retina is yet not fully determined. We have achieved the *Cerkl* locus deletion by CRISPR-Cas9 gene-editing. Since this deletion in homozygosis is lethal in mice, we have generated a double heterozygote mouse model with less than 10% residual *Cerkl* expression. This *Cerkl*^{KD/KO} model shows retinal morphology alterations, with a decreased number of cones and progressive photoreceptor loss, poorly stacked photoreceptor outer segment membranes, defective RPE phagocytosis, and altered electrophysiological recordings in aged retinas. The *Cerkl*^{KD/KO} mouse model mimics many of the phenotypic traits, including the slow and progressive disease progression, present in human patients carrying *CERKL* mutations.

This novel mouse model allowed us to perform oxidative and light stress assays, which showed that in the retinas of the *Cerkl*^{KD/KO} *CERKL* localized to the stress granules formed in the retina in response to stress. Moreover, the number of stress granules was notably higher in the retinas with reduced *CERKL* expression compared to those of wild type mice, thus supporting the *CERKL* role in the protection and maintenance of retinal cells under oxidative stress conditions.

The generation of hiPSCs-derived retinal eyecups from a patient carrying the mutation p. R283* in homozygosis and a healthy sibling allowed us to confirm the results obtained with the mouse model. The organoids from the patient showed an exacerbated response, with an increase in the number of stress granules (SGs) and of *CERKL* localization in the SGs in response to oxidative stress insult.

Finally, we tested 40 nm gold nanoparticles (NPs) as a proof of principle for DNA delivery in phenotypic rescue and gene therapy assays. Our studies demonstrated that the NPs wrapped to the DNA internalized into ARPE-19 cells using alternative,

clathrin-independent routes. Moreover, these NPs also enter into retinal explants and allow the expression of the reporter gene, preferentially in cones. For this reason, this nano-delivery system is a promising delivery tool that deserves further study.

ÍNDEX

Abreviatures	13
Introducció	15
1. L'estructura de l'ull	17
1.1. Capa fibrosa	17
1.1.1. La còrnia	17
1.1.2. L'escleròtica	18
1.2. Medi ocular	18
1.2.1. La cambra anterior	18
1.2.2. La lent	18
1.2.3. L'humor vitri	19
1.3. Capa vascular	19
1.3.1. El cos ciliar	19
1.3.2. L'iris	19
1.3.3. La coroide	20
1.4. Capa nerviosa	20
2. La retina: Estructura i Desenvolupament	21
2.1. La retina neural	23
2.1.1. Els fotoreceptors: Cons i Bastons	23
2.1.2. Cèl·lules horitzontals, bipolars i amacrines	24
2.1.3. Cèl·lules ganglionars	26
2.2. L'Epiteli pigmentari de la retina (RPE)	27
3. Distròfies hereditàries de la retina: La Retinosi Pigmentària	28
3.1. Prevalença i característiques clíniques de la RP	28

3.2. Tipus d'herència i gens causants de la RP	30
4. El gen <i>CERKL</i> (<i>Ceramide Kinase-like</i>)	35
4.1. Història i descobriment: des del locus RP26 fins a <i>CERKL</i>	35
4.2. Complexitat transcripcional i expressió de <i>CERKL</i>	36
4.3. Homologia i dominis de la proteïna <i>CERKL</i>	40
4.4. <i>CERKL</i> , un gen causant de distròfies de retina	42
4.4.1. Distròfia de cons i bastons (CRD)	45
5. Estrès cel·lular i malalties de la retina	46
5.1. Estrès oxidatiu (OS) i espècies reactives de l'oxigen (ROS)	47
5.1.1. La pol·lució ambiental i el fum del tabac	49
5.1.2. Estrès lumínic	49
5.1.3. La inflamació	50
5.1.4. Estrès del reticle endoplasmàtic (RE)	50
5.1.5. El paper dels antioxidants: Efecte dual de l' $\text{NF}\kappa\text{B}$ i l'antioxidant NRF2	51
5.2. Resposta cel·lular a l'estrès oxidatiu: formació de grànuls d'estrès (SG) i <i>P-Bodies</i> (PB)	52
5.2.1. Els grànuls d'estrès (SG)	53
5.2.2. Els <i>P-Bodies</i> (PB)	56
5.2.3. Paral·lelismes i diferències entre els SGs i els PBs	57
5.3. Estrès oxidatiu: Causant de malalties oculars	58
5.3.1. Malalties de la superfície ocular	58
5.3.2. Malalties de la lent	60
5.3.3. Malalties de la retina	61
6. Models animals, cèl·lules humanes pluripotents induïdes (hiPSCs) i estratègies de teràpia	64

6.1. Models animals murins d'RP	64
6.2. Nous models: Cèl·lules humanes pluripotents induïdes (hiPSCs)	72
6.3. Estratègies terapèutiques per a malalties degeneratives de la retina	75
6.3.1. Teràpia d'addició gènica	77
6.3.2. Teràpia d'edició gènica	78
6.3.3. Optogenètica	80
6.3.4. Teràpia de modulació de l' <i>splicing</i>	80
6.3.5. Teràpia de silenciament gènic post-transcripcional	81
6.3.6. Teràpies farmacològiques	82
6.3.7. Sistemes d'alliberament de gens	82
Objectius	85
Resultats	89
Informe de la directora	91
Capítol 1: Generació i caracterització fenotípica d'un nou model murí de <i>Cerkl</i>	93
Publicació 1: <i>A new Cerkl mouse model generated by CRISPR-Cas9 shows progressive retinal degeneration and altered morphological and electrophysiological phenotype</i>	95
Annex Capítol 1: Cerca d'isoformes de <i>Cerkl</i> : expressió diferencial en fotoreceptors i origen de traducció no convencional	141
1.1. Cerca d'isoformes de <i>Cerkl</i> diferencialment expressades en cons i bastons	143
1.2. Identificació de possibles inicis de traducció alternatius de CERKL	148
Annex Capítol 1 - Materials i Mètodes	153

Capítol 2: El paper de CERKL front a l'estrès cel·lular	159
Publicació 2: <i>The Relevance of Oxidative Stress in the Pathogenesis and Therapy of Retinal Distrophies</i>	161
Annex Capítol 2: Implicació de CERKL en la resposta a l'estrès oxidatiu	187
2.1. Dinàmica cel·lular de CERKL front a l'estrès oxidatiu <i>in vitro</i>	189
2.2. Resposta de CERKL front a l'estrès oxidatiu <i>in vivo</i> a ratolí	192
2.3. Estudi de l'expressió de CERKL en còpies òptiques de retina derivades d'hiPSC i resposta enfront l'estrès oxidatiu	211
Annex Capítol 2 - Materials i Mètodes	221
Capítol 3: Nanopartícules d'or com a potencial vector terapèutic en malalties de la retina: prova de principi	231
Publicació 3: <i>In Vitro Gene Delivery in Retinal Pigment Epithelium Cells by Plasmid DNA-Wrapped Gold Nanoparticles</i>	233
Annex Capítol 3: Entrega de DNA en òrgans en cultiu mitjançant nanopartícules d'or	247
3.1. Eficiència de transfecció en cultius primaris organotípics de retina emprant nanopartícules d'or com a vector d'entrega de DNA	249
Annex Capítol 3 - Materials i Mètodes	255
Discussió	259
Conclusions	289
Bibliografia	295

ABREVIATURES

AAV: Virus adeno-associats

ALS: Esclerosi lateral amiotròfica

AMD: Degeneració macular associada a l'edat

AON: Oligonucleòtid antisentit

ATP: Trifosfat d'adenosina

CERKL: *Ceramide kinase-like*

CRD: Distròfia de cons i bastons

CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

CRM1: *Chromosomal Maintenance 1*

CSE: Extracte del fum de les cigarretes

DAGK: Diacilglicerol cinasa

DI: Índex d'interacció

DNA: Àcid desoxiribonucleic

DR: Retinopatia diabètica

ERG: Electroretinograma

EST: *Expressed Sequence Tag*

FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (Citometria de Flux)

GAPDH: Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa

GFAP: Proteïna àcida fibril·lar de la glia

GFP: *Green Fluorescent Protein*

HDR: *Homology Directed Repair*

HEK293: *Human Embryonic Kidney*, línia 293 (cèl·lules en cultiu)

hiPSCs: *Human induced Pluripotent Stem Cells*

HQ: Hidroquinona

ICC: Immunocitoquímica

IHC: Immunohistoquímica

IPL: Capa plexiforme interna (retina)

IRD: Distròfies de retina hereditàries

IS: Segment intern (fotoreceptors)

KD: *Knockdown*

KI: *Knockin*

KO: *Knockout*

LINE: *Long interspersed nuclear element*

LHON: Neuropatia òptica hereditària de Leber

LTR: *Long Terminal Repeat*

MAM: Membranes associades a mitocondris

MD: Degeneració Macular

NADH: Nicotinamida adenina dinucleòtid

NES: Senyal d'exportació nuclear

NHEJ: *Non-Homologous End Joining*

NLS: Senyal de localització nuclear

NMD: *Non-sense mediated decay*

NP: Nanopartícula

NO: Òxid nítric

NOS: Sintasa d'òxid nítric

NOX: nicotinamida adenina
dinucleòtid fosfat oxidasa

OCT: Tomografia de coherència
òptica

ONL: Capa nuclear externa (retina)

OP: Potencial oscil·latori

OPL: Capa plexiforme externa
(retina)

OS: Segment extern (fotoreceptor)/
Estrès oxidatiu (segons context)

PABP: *PolyA Binding Protein*

PB: *P-Body*

PCR: Reacció en cadena de la
polimerasa

PH: Plecstrina (domini proteic)

PNA: *Peanut Agglutinin*

RDD: Malaltia degenerativa de la
retina

RE: Reticle endoplasmàtic

RNA: Àcid ribonucleic

RNP: Ribonucleoproteïna

RHO: Rodopsina

ROS: Espècies reactives de l'oxigen

RP: Retinosi Pigmentària

RPE: Epiteli pigmentari de la retina

SG: Grànul d'estrès

SOD: Superòxid dismutasa

TM: Xarxa trabecular

TSS: Lloc d'inici de la transcripció

UPR: Resposta de proteïnes mal
plegades

UTR: *Untranslated* (Regió transcrita
no traduïda)

UV: Llum ultraviolada

ZNF: *Zinc-finger nuclease*

Introducció

1. Estructura de l'ull

La vista és el sentit més important del que depenen els humans, essent els ulls la finestra al món. La majoria de les sensacions sensorials provinents de l'ambient es capten a través del sentit de la vista, el que permet als humans entendre i desenvolupar-se amb l'entorn [1], [2]. La visió és el sentit resultant de la integració i interpretació d'un conjunt d'imatges, gràcies a un gran circuit neuronal molt refinat que treballa de manera sinèrgica i està controlat per un extens nombre de gens.

L'ull presenta una forma globular i està format per tres capes principals: la capa fibrosa, la capa vascular i la capa nerviosa. Addicionalment, també es pot parlar del medi ocular [3].

1.1. Capa Fibrosa

La capa fibrosa és la capa més externa de l'ull i està formada per la còrnia i l'escleròtica.

1.1.1 La còrnia

La còrnia és avascular i transparent, la formen principalment cèl·lules epitelials que poden regenerar després de ser danyades i és on hi ha la majoria de terminacions nervioses, el que fan la part externa de l'ull sensible al tacte i al dolor. A la base d'aquestes cèl·lules es troba la capa de Browman, formada per fibres de col·lagen que si reben algun tipus de dany, aquest és irreversible. Seguidament, es troba l'estroma, format per fibres de col·lagen, proteoglicans, aigua, fibres elàstiques, fibròcits i fibres nervioses sensibles, tot el qual confereix el gruix a la còrnia; la disposició en paral·lel de les fibres permet que la còrnia sigui transparent. A la part posterior de l'estroma es troba la membrana de Descemet, que representa la base sobre la que se situarà l'endoteli. Finalment, la capa més posterior de la còrnia és l'endoteli, que consisteix en una monocapa de cèl·lules que funciona com una membrana permeable que permet l'entrada d'oxigen i la sortida de productes de rebuig i fluid (Figura 1) [3]–[5].

1.1.2 L'escleròtica

L'escleròtica ocupa cinc sisens de la part posterior de l'ull. Es compon principalment per fibres de col·lagen elàstiques i denses que es disposen de forma aleatòria, formant un manyoc de fibres irregulars, el que confereix el color blanc als ulls. La unió entre l'escleròtica i la còrnia es coneix com el limb (Figura 1) [3]–[5].

1.2 Medi Ocular

El medi ocular està format pels teixits transparents i el líquid de dins de l'ull, incloent-hi la cambra anterior, la lent i l'humor vitri.

1.2.1 La cambra anterior

La cambra anterior es un espai ple d'humor aquós, fluid transparent de consistència aquosa. Està flanquejada per la part anterior, per la còrnia i, per la posterior, per l'iris (Figura 1) [3]–[5].

1.2.2 La lent

La lent és una estructura biconvexa i transparent que es troba darrera de l'iris i davant de l'humor vitri. La transparència d'aquest teixit es deu a que és avascular, no presenta innervacions ni tampoc teixit connectiu. És flexible i està suspesa en la seva posició gràcies a les zònules, o lligaments suspensoris del cristal·lí, que l'enganxen al cos ciliar. La lent està composta per la càpsula, l'epiteli i la substància de la lent. La càpsula és una membrana elàstica que cobreix completament la lent, emmotllant la seva forma segons l'enfoc de requeriment de l'ull. A més a més, actua com a barrera protectora impedit el pas de bacteris, entre altres. Les cèl·lules epitelials de la lent es troben darrera de la càpsula anterior de la lent, conferint-li rigidesa; s'encarreguen del transport de substàncies dins de la lent, així com de secretar material capsular. Finalment, la substància de la lent consisteix en cèl·lules i fibres densament empaquetades que aporten a la lent un alt contingut d'aigua i de

proteïnes i eleven l'índex de refracció del cristal·lí; canvis en el contingut proteic de la lent causen pèrdua de la seva elasticitat (Figura 1) [3]–[5].

1.2.3 L'humor vitri

L'últim element que forma el medi ocular és l'humor vitri, que representa el 80% del volum de l'ull i es localitza darrera de la càpsula de la lent. L'humor vitri està format per una substància gelatinosa, composta per col·lagen, mucopolisacàrid i àcid hialurònic. Té l'ora serrata per la part anterior, i el nervi òptic i la fòvea per la part posterior. La funció de l'humor vitri és mantenir la transparència del medi òptic i aportar una pressió interna constant per donar suport a les estructures internes de l'ull (Figura 1) [3]–[5].

1.3 Capa Vascular

La capa vascular, també coneguda com a tracte uveal, és la capa intermèdia de l'ull, localitzada entre l'escleròtica i la retina. Les seves funcions principals són produir humor aquós en els processos ciliars i alterar la forma de la lent cristal·lina per tal d'enfocar correctament. Aquesta capa està formada per tres elements: el cos ciliar, l'iris i la coroide [3]–[5].

1.3.1 El cos ciliar

El cos ciliar s'estén des de la base de l'iris fins a ser un continu amb la coroide en l'ora serrata. Els processos ciliars que es troben a la cambra posterior de darrera l'iris produeixen humor aquós, mentre que els processos ciliars que connecten amb la lent estan units al múscul ciliar que quan es contrau relaxa les zònules, permetent l'acomodació de la lent i per tant, l'enfoc visual. La part més posterior dels processos ciliars connecten amb la retina i l'ora serrata (Figura 1) [3]–[5].

1.3.2 L'iris

L'iris és la regió acolorida de l'ull i forma un diafragma davant de la lent, el que controla l'entrada de llum a l'ull canviant la mida de la pupil·la. L'iris prevé

l'entrada de llum en excés i ajuda a formar imatges clares a la retina, ja que evita l'entrada de rajos de llum perifèrica. Aquest està format per tres capes: la capa anterior, que conté melanòcits i col·lagen; la capa mitja o estroma, formada principalment per col·lagen, melanòcits i fibroblast, aquesta capa també conté els vasos sanguinis i els nervis; i finalment, la capa posterior, consistent en el múscul dilatori de la pupil·la i epitelí pigmentari (Figura 1) [3]–[5].

1.3.3 La coroide

L'últim element que forma la capa vascular és la coroide, essent la seva funció principal nodrir i aportar oxigen a la capa més externa de la retina. La coroide està compresa per quatre capes: la lamina fusca, l'estroma, els coriocapil·lars i la membrana de Bruch. És un teixit llarg, vascular i pigmentat que forma el revestiment mig de la part posterior de l'ull i s'estén des de l'ora serrata fins el nervi òptic. La coroide s'uneix a l'escleròtica per teixit connectiu i li arriben els vasos sanguinis i innervacions des de l'escleròtica. La retina i la coroide comparteixen l'artèria oftàlmica, sent el major subministrament sanguini que els arriba. La vasculatura de la coroide presenta dos tipus de vasos sanguinis: els coriocapil·lars, i les artèries i venes. Finalment es troba la membrana de Bruch, localitzada entre els coriocapil·lars i sobre la base de l'epitelí pigmentari de la retina; aquesta membrana basal permet el pas dels nutrients cap a les capes externes de la retina, però evita que restes retinals passin a través dels porus cap als coriocapil·lars (Figura 1) [3]–[5].

1.4 Capa Nerviosa

La capa nerviosa és on es troben les cèl·lules receptores que conformen la retina. La retina és la capa més interna de l'ull, així doncs, la llum ha de travessar primer tots els elements que conformen l'ull per tal d'arribar a la retina, on l'energia fotolumínica serà convertida en impulsos elèctrics, que es transmetran ara en direcció inversa per totes les capes que formen la retina, mitjançant sinapsis, fins arribar a l'última capa, formada per cèl·lules ganglionars (RGCs). Els axons de les

RGCs conflueixen i formen el nervi òptic, que portarà la informació captada fins al quiasme òptic, localitzat a la fosa cerebral anterior (Figura 1) [3]–[5].

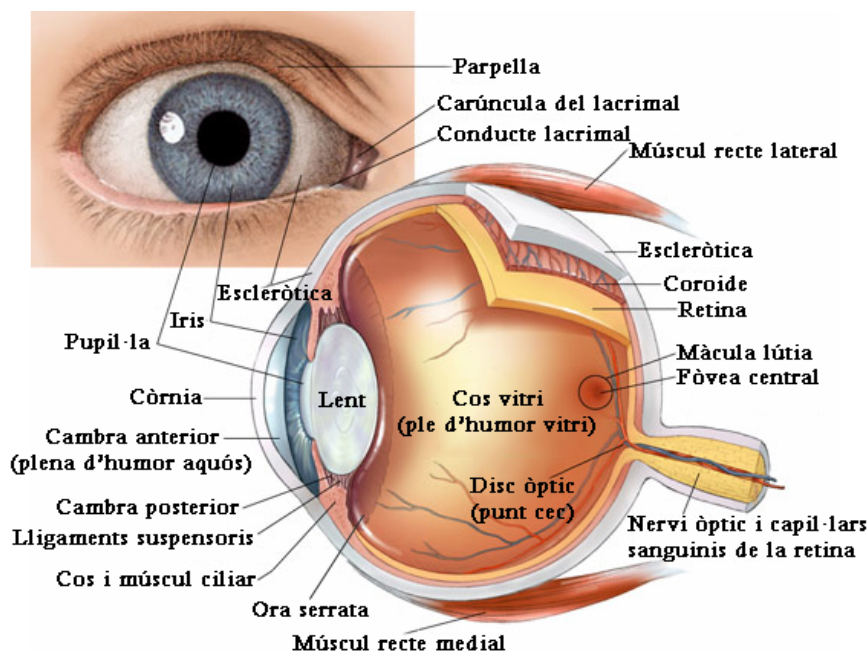


Figura 1. Representació de l'anatomia de l'ull. (Imatge adaptada de Central Florida Retina & Macular degeneration Center, <https://www.centralfloridaretina.com/>).

2. La Retina: Estructura i Desenvolupament

La retina és la porció neural de l'ull i forma part del sistema nerviós central. Durant el desenvolupament, la vesícula òptica s'evagina del diencèfal per després invaginar-se i formar la copa òptica. La capa interna de la copa òptica donarà lloc a la retina, mentre que la capa externa esdevindrà l'epiteli pigmentari (RPE). L'RPE conté melanina i redueix la retrodispersió de la llum que entra a l'ull; l'RPE també juga un paper crític en el manteniment dels fotoreceptors, renovant els fotopigments i fagocitant els discs dels fotoreceptors, dels que l'elevada taxa de renovació –tots els discs en el segment extern són renovats cada 12 dies– és essencial per a la visió.

La retina comprèn un complex circuit neural que converteix l'activitat elèctrica generada als fotoreceptors en potencials d'acció que viatgen al cervell via axons del nervi òptic. Encara que té els mateixos elements funcionals i neurotransmissors d'altres parts del sistema nerviós central, la retina solament conté unes poques classes de neurones. Bàsicament, hi han cinc tipus de neurones a la retina: fotoreceptors, cèl·lules bipolars, cèl·lules ganglionars, cèl·lules horitzontals i cèl·lules amacrines. Els somes i processos d'aquestes neurones s'organitzen en cinc capes alternes, amb els somes localitzats a les capes nuclears interna i externa i a la capa de cèl·lules ganglionars, mentre que els processos i les connexions sinàptiques es localitzen a les capes plexiformes interna i externa (Figura 2) [6].

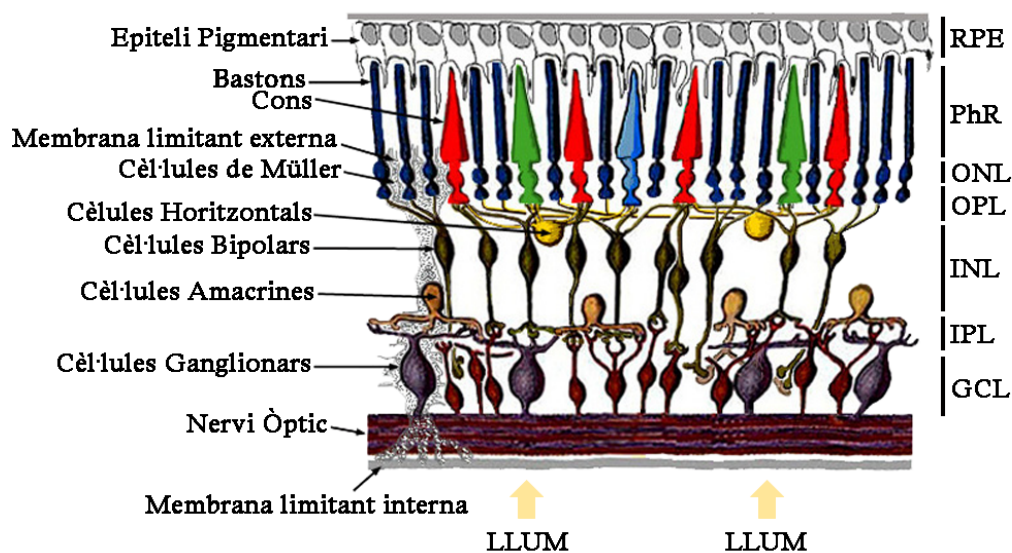


Figura 2. Representació esquemàtica de la retina. **RPE:** Epiteli Pigmentari de la retina. **PhR:** Capa dels fotoreceptors. **ONL:** Capa nuclear externa. **OPL:** Capa plexiforme externa. **INL:** Capa nuclear interna. **IPL:** Capa plexiforme interna. **GCL:** Capa de cèl·lules ganglionars. Imatge adaptada de Webvision (<https://webvision.med.utah.edu>).

2.1 La retina neural

2.1.1 Els Fotoreceptors: Cons i Bastons

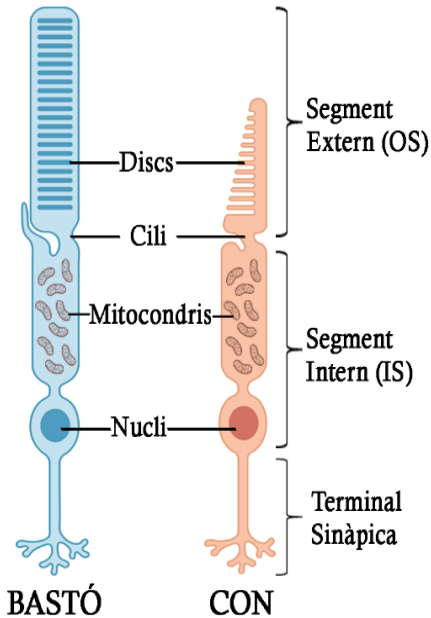


Figura 3. Il·lustració dels dos tipus de fotoreceptors, cons i bastons. (Imatge pròpia generada amb BioRender).

A priori, la disposició espacial de les capes de la retina sembla contrària a la intuïció, ja que els raigs de llum han de passar a través dels elements de la retina no sensibles a la llum abans d'arribar als segments externs dels fotoreceptors, on es duu a terme la fotorecepció i la fototransducció. La retina dels vertebrats presenta dos tipus de cèl·lules sensibles a la llum, els cons i els bastons. L'estructura d'ambdós tipus de fotoreceptors presenta un segment extern (OS), compost per discs membranosos que es formen al segment intern del fotoreceptor i es mouen cap a la punta del segment extern, on acaben sent fagocitats per les cèl·lules de l'RPE, que són adjacents. L'OS conté el fotopigment i altres proteïnes involucrades en el procés de

fotorecepció i transducció, mentre que el segment intern (IS) conté el citosol, on es donen els processos metabòlics, la biosíntesi i l'endocitosi, a més del nucli cel·lular. Finalment, també hi ha un curt axó amb els terminals sinàptics que contacten amb les cèl·lules bipolars o horitzontals. L'absorció de la llum pels fotoreceptors inicia una cascada d'esdeveniments que canvien el potencial de membrana del receptor i, consegüentment, la quantitat de neurotransmissor alliberat per la sinapsi del fotoreceptor a les cèl·lules amb que contacten [7].

Els bastons tenen un OS llarg i cilíndric i els discs membranosos es troben empaquetats i separats de la membrana plasmàtica. Els bastons són els responsables

de la visió escotòpica i, a diferència dels cons, únicament hi ha un tipus de bastó. A la retina dels humans predominen els bastons, havent-hi 20 bastons per cada con, que es troben distribuïts al llarg de tota la retina a excepció de la fòvea, on únicament hi ha cons. Els bastons humans són molt sensibles i poden arribar a detectar un únic fotó. El pigment visual dels bastons és la rodopsina, que compren el 95% de les proteïnes dels discs i està altament empaquetada en el seu interior; l'elevada densitat d'aquest empaquetament, juntament amb l'ordenació dels discs respecte l'entrada de la llum, augmenta la probabilitat de capturar els fotons que hi incideixen (Figura 3) [8], [9].

Els cons reben aquest nom perquè l'OS presenta una forma cònica. Els OS dels cons són més curts que el dels bastons, i els seus discs formen un continu amb la membrana plasmàtica. Els cons són els responsables de la visió fotòpica i en color, essent els que aporten agudesa visual. A diferència dels bastons, a la retina humana hi ha tres tipus de cons diferents segons la longitud d'ona de la llum que són capaços d'absorbir, ja que expressen diferents fotopigments, anomenats opsines: cons L (longituds d'ona llargues, rang del vermell), cons M (longituds d'ona mitjanes, rang del verd) i cons S (longituds d'ona curtes, rang del blau). Els cons es distribueixen al llarg de la retina, però en alguns vertebrats hi ha una regió ubicada al centre de la retina anomenada màcula, on hi ha una elevada densitat de cons. Els humans tenen enmig de la màcula, la fòvea, caracteritzada per l'absència de bastons, i que permet una major agudesa visual (Figura 3) [8], [9].

2.1.2 Cèl·lules horitzontals, bipolars i amacrines

El segment intern dels fotoreceptors conté el nucli, el soma i el curt axó amb les terminals sinàptiques que contacten amb les cèl·lules bipolars o horitzontals. L'absorció de la llum pel fotopigment a l'OS dels fotoreceptors inicia una cascada d'esdeveniments que canvien els potencials de membrana de la cèl·lula receptora. Els neurotransmissors són alliberats a l'espai sinàptic entre el fotoreceptor i la cèl·lula amb la qual contacten [7]. En general, els processos de les cèl·lules horitzontals

permeten les interaccions laterals entre els fotoreceptors i les cèl·lules bipolars que mantenen els sistemes de sensibilitat visual de contrast de llum, tot permetent la visió d'un rang ampli d'intensitat lumínica. Els processos de les cèl·lules amacrines són post-sinàptics respecte als terminals de les cèl·lules bipolars, i pre-sinàptics respecte a les dendrites de les cèl·lules ganglionars. Les diferents subclasses de cèl·lules amacrines contribueixen de manera diferent a la funció visual [7].

Les cèl·lules horitzontals són les encarregades de modular la informació i transferir-la entre les cèl·lules bipolars i els fotoreceptors; estan involucrades en ajudar a l'ull a ajustar-se a condicions d'alta i baixa intensitat de llum. Existeixen 3 tipus de cèl·lules horitzontals, els seus terminals sinàptics formen la capa plexiforme externa de la retina i els seus somes es localitzen a la capa nuclear interna. A més, interaccionen mitjançant unions comunicants (*gap junctions*) amb les cèl·lules bipolars. Les connexions que formen les cèl·lules horitzontals a la capa plexiforme externa (OPL) transmeten informació sobre la polaritat, sensibilitat espectral, rapidesa i l'estructura del camp espacial [9], [10].

La retina humana conté més de 13 subtipus diferents de cèl·lules bipolars que, de manera diferencial, recullen la informació provinent dels fotoreceptors amb els quals formen sinapsis a la capa plexiforme externa i processen la informació al nucli, que forma la capa nuclear interna. Les cèl·lules bipolars formen circuits amb altres fotoreceptors que els aporten els blocs elementals per la visió com la composició cromàtica, la polaritat, el contrast i el perfil de l'estímul que els arriba. Per tal de transmetre la informació visual, les cèl·lules bipolars connecten, bé amb les cèl·lules amacrines o bé amb les cèl·lules ganglionars. Les cèl·lules bipolars formen relacions diferents segons amb la cèl·lula que interaccionin, ja sigui ganglionar, amacrina o bé horitzontal [9]–[12].

Les cèl·lules amacrines són un tipus de neurona que no desenvolupen axó i les seves dendrites es ramifiquen formant la capa plexiforme interna de la retina. S'han descrit més de 30 subtipus diferents de cèl·lules amacrines, i aquesta diversitat dins del

mateix tipus cel·lular permet formar microcircuitos funcionals molt especialitzats que habiliten a la retina per a detectar ombres i moviments de llum en direccions concretes. Aquests microcircuitos funcionals condueixen diferents espectres d'informació i es classifiquen segons el tipus cèl·lula amacrina, ja sigui de camp ampli, de camp mitjà o de camp estret. Les cèl·lules amacrines de camp ampli s'especialitzen en la comunicació horitzontal al llarg d'una sola capa de la retina, assistint a la integració horitzontal de la informació. Les cèl·lules amacrines de camp estret penetren més capes de la retina de manera vertical, permetent la integració de la informació en vertical [9], [10]. L'elevada varietat de subtipus de cèl·lules amacrines il·lustra la norma més general que, tot i que hi hagi únicament cinc tipus bàsics de cèl·lules retinals, hi pot haver una gran diversitat dins d'un mateix tipus cel·lular.

2.1.3 Cèl·lules ganglionars

Les cèl·lules ganglionars formen la capa més anterior de la retina. Se n'han descrit més de 20 subtipus i els seus axons formen el nervi òptic que comunica amb el cervell. La disposició dels circuits que transmeten la informació dels cons i dels bastons a les cèl·lules ganglionars també contribueix a les diferents característiques de la visió fotòpica i escotòpica. En la major part de la retina, els senyals dels cons i dels bastons convergeixen a les mateixes cèl·lules ganglionars, per exemple, una mateixa cèl·lula ganglionar respon a estímuls provinents tant de cons com de bastons, depenent del nivell d'il·luminació. La transmissió de la informació des dels bastons a les cèl·lules ganglionars requereix de cèl·lules bipolars de bastons que, a diferència de les cèl·lules bipolars de cons, no contacten directament amb les cèl·lules ganglionars. Les cèl·lules bipolars dels bastons fan sinapsi amb cèl·lules amacrines específiques, les quals transmeten la informació a cèl·lules bipolars de cons mitjançant unions comunicants i, finalment, aquestes envien la informació a les cèl·lules ganglionars. Conseqüentment, els circuits que uneixen els cons i els bastons a les cèl·lules ganglionars difereixen dramàticament en el seu grau de

convergència. L'alta convergència dels bastons fa que siguin un millor sistema de detecció de la llum, ja que petites senyals de molts bastons convergeixen generant una gran resposta en les cèl·lules bipolars. A la vegada, aquesta elevada convergència redueix la resolució espacial, ja que, el senyal pot provenir de qualsevol punt de la superfície de la retina. La relació 1-a-1 dels cons cap a les cèl·lules bipolars i ganglionars maximitza l'agudesesa visual [7].

Alguns autors classifiquen les cèl·lules ganglionars com a un tercer tipus de fotoreceptor. Les cèl·lules ganglionars ajuden a: transmetre tant la informació per a la formació d'una imatge com la que no; sincronitzar els processos fisiològics dels ritmes circadianis; modular l'alliberament de melatonina, i regular la mida de la pupil·la. De l'1 al 2 % de les cèl·lules ganglionars són fotosensibles, ja que expressen melanopsina, un fotopigment que actua com a neuromodulador. Els axons de les cèl·lules ganglionars convergeixen al disc òptic i passen a través de la làmina cribosa desmielinitzada, per tal de no interferir amb la llum que entra. Els axons arriben al nucli supraquiasmàtic, al nucli pretectal olivar, a la divisió ventral del nucli geniculat i a l'àrea preòptica, pel que estan implicades en la sincronització dels ritmes circadianis i el reflex de la pupil·la a la llum [10], [13], [14].

2.2 L'Epiteli Pigmentari de la Retina (RPE)

L'epiteli pigmentari de la retina (RPE) forma part de la retina. Tot i que no es considera porció neural, forma part de la retina externa i es troba situat entre la retina neural i la coroide. La membrana apical de l'RPE embolcalla amb els microvilli els OSs dels fotoreceptors, i la membrana basolateral contacta amb la membrana de Bruch, la qual separa l'RPE de l'endoteli fenestrat dels coriocapil·lars. L'RPE constitueix la barrera hemato-retiniana externa, mentre que la interna està constituïda bàsicament per cèl·lules endotelials. Les unions estretes entre cèl·lules veïnes de l'RPE i endotelials són essencials per controlar de manera molt estricta els fluids i les molècules que travessen la barrera hemato-retiniana, a més de prevenir l'entrada de tòxics dins de la retina.

Les funcions principals de l'RPE són: I) el transport de nutrients, ions i aigua, II) absorbir la llum i protegir davant la fotooxidació, III) reisomeritzar l'*all-trans*-retinal a 11-*cis*-retinal, el qual és un element clau del cicle visual, IV) fagocitar els discs dels OS dels fotoreceptors i V) secretar factors essencials per la integritat estructural de la retina. Addicionalment, l'RPE estabilitza la composició iònica a l'espai subretinal, el qual és crucial pel manteniment de l'excitabilitat dels fotoreceptors i contribueix a l'estatus immunològic privilegiat de l'ull, ja que forma part de la barrera hemato-retiniana i secreta factors immunosupressius dins de l'ull. Així doncs, l'RPE és un element essencial per a la funció visual [15]–[17].

3. Distrofies hereditàries de Retina: La Retinosi Pigmentària

La neurodegeneració retinal associada a la mort o disfunció dels fotoreceptors és la causa principal de pèrdua de visió incurable. Diferents factors genètics determinen la gènesi i homeòstasi dels fotoreceptors, pel que mutacions a gens concrets poden propiciar alteracions estructurals, o bé funcionals, que acabin causant ceguera. Les malalties degeneratives de retina (RDDs) estan àmpliament dividides en monogèniques (mendelianes) o multifactorials (complexes), tant sindròmiques com no-sindròmiques. La RDD multifactorial més comú és la degeneració macular associada a l'edat (AMD) que, com el nom indica, és una degeneració que es manifesta a edats avançades i presenta una prevalença de 3,5 per cada 1.000 individus majors de 50 anys arreu del món [18], [19]. D'altra banda, les RDDs mendelianes afecten a 1 entre 2.000-3.000 individus arreu del món, essent la Retinosi Pigmentària (RP) la més prevalent [19] i en la que ens centrarem en aquest apartat.

3.1 Prevalença i característiques clíniques de l'RP

L'RP és la forma més comú de distrofia hereditària de retina, amb una prevalença d'1 entre 3.000-5.000 individus arreu del món [20]. Aquesta malaltia es caracteritza

per la pèrdua progressiva de visió causada per la mort, primer dels bastons i posteriorment, del cons. A més, s'observen dipòsits de pigment a la retina provinents de l'RPE a conseqüència de la mort dels fotoreceptors [21].

Els primers estadis de la malaltia es manifesten normalment com a ceguera nocturna. Aquest símptoma pot aparèixer durant la primera o la segona dècada de vida o, a vegades, inclús més tard. Una ceguera nocturna suau pot ser ignorada inicialment pel pacient però, a l'adolescència, moltes vegades s'acusa a les festes que transcorren durant la nit. En aquest estadi de la malaltia és comú presentar defectes en la visió perifèrica en condicions de baixa lluminositat. Malgrat això, aquests defectes no són notables a la llum del dia, pel que els pacients tenen un estil de vida completament normal. El diagnòstic en aquest estadi és difícil d'establir, particularment, quan no hi ha una història familiar que l'acompanyi. Finalment, l'agudesia visual és normal o lleugerament per sota del llinde de la normalitat.

En estadis intermedis de la malaltia la ceguera nocturna es torna evident, el que causa impediment a l'hora de desenvolupar-se en condicions de baixa intensitat de llum. Els pacients presenten visió en túnel (pèrdua de visió del camp perifèric) durant el dia, el que també els afecta a les accions quotidianes, com ara conduir. A més a més, molts pacients es tornen fotofòbics, especialment en presència de llum difosa (quan hi ha resol), el que els dificulta la lectura a l'aire lliure, per exemple, de cartells. Altres dificultats que els afecten a la capacitat de lectura són causades pel decrement en l'agudesia visual, en part per la implicació macular (presenten edema macular o atròfia foveomacular lleugera) i l'aparició d'una cataracta subcortical posterior. El fons de l'ull presenta dipòsits pigmentats a la perifèria, estretament dels vasos de la retina i el disc òptic és moderadament pàl·lid.

En els últims estadis de la malaltia els pacients ja no es poden desenvolupar de manera autònoma com a resultat de la visió en túnel, i els queden pocs graus de romanent de camp visual al voltant del punt de fixació. La lectura és pràcticament impossible i es necessiten ulleres d'elevada magnificació, la fotofòbia és molt intensa

i el fons de l'ull presenta extensos dipòsits de pigment que arriben a l'àrea de la màcula. Els vasos sanguinis són encara més primis i el disc òptic presenta una pal·lidesa encerada. Addicionalment, es detecta atròfia corioretinal a la perifèria i també a l'àrea foveomacular. Tot i això, la progressió de la malaltia continua essent lenta fins que els pacients es tornen completament cecs quan el camp de visió central desapareix encara que, usualment, són capaços de percebre la llum en el camp de visió perifèric [22].

La variabilitat clínica en l'edat en que es manifesta la malaltia i la seva evolució en el temps, així com l'heterogeneïtat genètica, moltes vegades dificulten un diagnòstic precoç i acurat [23], [24].

3.2 Tipus d'herència i gens causants d'RP

L'RP és, majoritàriament, una malaltia monogènica que segueix els patrons d'herència mendelians clàssics.

- RP autosòmica dominant (adRP): Aproximadament, el 30-40% dels casos presenten aquest tipus d'RP [21] i, normalment, són les formes més suaus de la malaltia, arribant a presentar-se casos amb els primers símptomes més tard dels 50 anys, tot i que en alguns casos, depenent del gen afectat, també pot ser molt severa. Variacions en la penetrància són freqüents, en particular quan les mutacions es donen en *PAP1*, *PRPF31* i *RPI* [22].
- RP autosòmica recessiva (arRP): Representa el 50-60% dels casos [21] i els seus símptomes comencen típicament durant la primera-segona dècada de vida [22].
- RP lligada al cromosoma X (X-RP): Aquest tipus d'RP és el menys freqüent explicant el 5-15% dels casos [21]. En aquests casos, la majoria d'afectes són homes hemizigots. Els símptomes de l'RP acostumen a aparèixer durant la primera dècada de vida i, freqüentment, s'associa amb miopia [22].

De forma minoritària, també s'han descrit casos d'herència no-mendeliana clàssica [22], [25], [26] entre els que es trobarien: els d'herència mitocondrial [27], els de

forma digènica en que es presenten mutacions en heterozigosi en *ROM1* en combinació amb mutacions en heterozigosi amb *RDS* [28] i la isodisomia uniparental [29]. Tot i que l'RP normalment es manifesta de forma aïllada, en alguns casos forma part de síndromes d'afectació ciliar (ciliopaties), essent els més freqüents el síndrome d'Usher, al qual s'associa l'RP a sordesa neurosensorial –el 14% de tots els casos d'RP són, de fet, síndrome d'Usher– [22], [30] i el síndrome de Bardet-Biedl (BBS), el qual associa l'RP amb obesitat infantil, retard mental i psicomotor, polidactília, hipogenitalisme i anormalitats renals [22], [31]. Endemés, a part dels síndromes esmentats, l'RP també pot estar associada a malalties neurològiques i metabòliques [22].

La Retinosi Pigmentària, a més de seguir diferents tipus d'herència i ser tant sindròmica com no, presenta una elevada heterogeneïtat genètica i al·lèlica, ja que més de 90 gens poden causar la mateixa malaltia (Taula 1), i mutacions en el mateix gen poden causar diferents formes d'RP o, fins i tot, diferents distròfies de retina.

Taula 1. Llistat de gens causants de Retinosi Pigmentària.

Retinosi Pigmentària autosòmica dominant (adRP)			
Gen	Proteïna	Localització	Associació amb altres distròfies
<i>ADIPOR1</i>	<i>Adiponectin receptor 1</i>	1q32.1	sRP, adRP, BBS
<i>ARL3</i>	<i>ADP ribosylation factor like GTPase 3</i>	10q24.32	
<i>BEST1</i>	<i>Bestrophin 1</i>	11q12.3	adMD, adRCP, arBP
<i>CA4</i>	<i>Carbonic anhydrase IV</i>	17q23.2	
<i>CRX</i>	<i>Cone-rod otx-like photoreceptor homeobox transcription factor</i>	19q13.32	adCRD, adLCA, arLCA
<i>FSCN2</i>	<i>Retinal fascic homolog 2, actin bundling protein</i>	17q25.3	adMD
<i>GUCA1B</i>	<i>Guanylate cyclase activating protein 1B</i>	6p21.1	adMD
<i>HK1</i>	<i>Hexokinase 1</i>	10q22.1	NSHA, HMSNR
<i>IMPDH1</i>	<i>Inosine monophosphate dehydrogenase 1</i>	7q32.1	adLCA
<i>IMPG1</i>	<i>Interphotoreceptor matrix proteoglycan 1</i>	6q14.1	adMDV, arMDV
<i>KLHL7</i>	<i>Kelch-like 7 protein (Drosophila)</i>	7p15.3	
<i>NR2E3</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 2 group E3</i>	15q23	ESC, arRP, GFS
<i>NRL</i>	<i>Neural retina luciferase zipper</i>	14q11.2	arRP

PRPF3	<i>pre-mRNA processing factor 3</i>	1q21.2	
PRPF4	<i>pre-mRNA processing factor 4</i>	9q32	
PRPF6	<i>pre-mRNA processing factor 6</i>	20q13.33	
PRPF8	<i>pre-mRNA processing factor 8</i>	17p13.3	
PRPF31	<i>pre-mRNA processing factor 31</i>	19q13.42	
PRPH2	<i>Peripherin 2</i>	6p21.1	adMD, digRP, adAMDV, adCRD, adCACD, arLCA
RDH12	<i>Retinol dehydrogenase 12</i>	14q24.1	arLCA
RHO	<i>Rhodopsin</i>	3q22.1	arRP, adCSNB
ROM1	<i>Retinal outer segment membrane protein 1</i>	11q12.3	digRP
RPI	<i>RPI</i>	8q12.1	arRP
RP9	<i>RP9</i>	7p14.3	
RPE65	<i>Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein</i>	1p31.2	arLCA, arRP
SAG	<i>Arrestin (s-antigen)</i>	2q37.1	arRP, arOD
SEMA4A	<i>Semaphorin 4A</i>	1q22	adCRD
SNRNP200	<i>Small nuclear ribonucleoprotein 200kDa (U5)</i>	2q11.2	
SPP2	<i>Secreted phosphoprotein 2</i>	2q37.1	
TOPORS	<i>Topoisomerase I binding arginine/serine-rich protein</i>	9p21.1	

Retinosi Pigmentària autosòmica recessiva (arRP)

Gen	Proteïna	Localització	Associació amb altres distròfies
ABCA4	<i>ATP-binding cassette transporter - retinal</i>	1p22.1	arSD, arMD, arFF, arCRD
AGBL5	<i>ATP/GTP binding protein-like 5</i>	2p23.3	
AHR	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i>	7p21.1	
ARHGEF18	<i>Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor 18</i>	19p13.2	
ARL6	<i>ADP-ribosylation factor-like 6</i>	3q11.2	arBBS
ARL2BP	<i>ADP-ribosylation factor-like 2 binding protein</i>	16q.13.3	
BBS1	<i>BBS1</i>	11q13	arBBS
BBS2	<i>BBS2</i>	16q13	arBBS
BEST1	<i>Bestrophin 1</i>	11q12.3	adMD, adRCP, arBP
C2orf71	<i>Chromosome 2 open reading frame 71</i>	2p23.2	
C8orf37	<i>Chromosome 8 open reading frame 37</i>	8q22.1	arCRD, arBBS
CERKL	<i>Ceramide Kinase-like</i>	2q31.3	arCRD
CLCC1	<i>Chloride intracellular ion channel (CLIC)-like protein 1</i>	1p13.3	
CLRN1	<i>Clarin-1</i>	3q25.1	arUSH3

CNGA1	<i>Rod cGMP-gated channel alpha subunit</i>	4p12	
CNGB1	<i>Rod cGMP-gated channel beta subunit</i>	16q21	
CRB1	<i>Crumbs homolog 1</i>	1q31.3	arRP-PPRPE, arLCA, adPPRCA
CYP4V2	<i>Cytochrome P450 4V2</i>	4q35.2	arBCCD
DHDDS	<i>Dehydrololichyl diphosphate synthetase</i>	1p36.11	
DHX38	<i>DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 38</i>	16q22.2	
EMC1	<i>ER membrane protein complex subunit 1</i>	1p36.13	
EYS	<i>Eyes shut / spacemaker (Drosophila) homolog</i>	6q12	
FAM161A	<i>Family with sequence similarity 161 member A</i>	2p15	
GPR125	<i>G protein-coupled receptor 125</i>	4p15.2	
HGSNAT	<i>Heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase</i>	8p11.21-p11.1	arMPS
IDH3B	<i>NAD(+)-specific isocitrate dehydrogenase 3 beta</i>	20p13	
IFT140	<i>Intraflagellar transport 140 Chlamydomonas homolog protein</i>	16p13.3	arMSS, arLCA
IFT172	<i>Intraflagellar transport protein 172</i>	2p33.3	arBBS
IMPG2	<i>Interphotoreceptor matrix proteoglycan 2</i>	3q12.3	
KIAA1549	<i>KIAA1549 protein</i>	7q34	
KIZ	<i>Kizuna centrosomal protein</i>	20p11.23	
LRAT	<i>Lecithin retinol acyltransferase</i>	4q32.1	arLCA
MAK	<i>Male germ-cell associated kinase</i>	6p24.2	
MERTK	<i>c-mer protooncogene receptor tyrosine kinase</i>	2q13	arCRD
MVK	<i>Mevalonate kinase</i>	12q24.11	arMA, arHIDS
NEK2	<i>NIMA (never in mitosis gene A)-related kinase 2</i>	1q32.3	
NEUROD1	<i>Neuronal differentiation protein 1</i>	2q31.3	
NR2E3	<i>Nuclear receptor subfamily 2 group E3</i>	15q23	ESC, adRP, GFS
NRL	<i>Neural retina luciferase zipper</i>	14q11.2	adRP
PDE6A	<i>cGMP phosphodiesterase alpha subunit</i>	5q33.1	
PDE6B	<i>Rod cGMP phosphodiesterase beta subunit</i>	4p16.3	adCSNB
PDE6G	<i>Phosphodiesterase 6G cGMP-specific rod gamma</i>	17q25.3	
POMGNT1	<i>Protein O-linked acetylglucosaminyltransferase 1 (beta 1,2-)</i>	1p34.1	
PRCD	<i>Progressive rod-cone degeneration protein</i>	17q25.1	
PROM1	<i>Prominin 1</i>	4p15.32	adSD, adMD
RBP3	<i>Retinol binding protein 3, interstitial</i>	10q11.22	

REEP6	<i>Receptor accessory protein 6 (receptor expression enhancer protein 6)</i>	19p13.3	
RGR	<i>RPE-retinal G protein-coupled receptor</i>	10q23.1	adCS
RHO	<i>Rhodopsin</i>	3q22.1	adRP, adCSNB
RLBP1	<i>Retinaldehyde-binding protein 1</i>	15q26.1	arBD, arRPA, arRCD
RP1	<i>RP1</i>	8q12.1	adRP
RP1L1	<i>Retinitis pigmentosa 1-like protein 1</i>	8p23.1	adOMD
RPE65	<i>Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein</i>	1p31.2	arLCA, adRP
SAG	<i>Arrestin (s-antigen)</i>	2q37.1	adRP, arOD
SAMD11	<i>Sterile alpha motif domain containing 11 protein</i>	1p36.3	
SLC7A14	<i>Solute carrier family 7 member 14</i>	3q26.2	
SPATA7	<i>Spermatogenesis associated protein 7</i>	14q31.3	arLCA
TRNT1	<i>CCA adding tRNA nucleotidyl transferase</i>	3p26.2	
TTC8	<i>Tetratricopeptide repeat domain 8</i>	14q32.11	arBBS
TULP1	<i>Tubby-like protein 1</i>	6p21.31	arLCA
USH2A	<i>Usherin</i>	1q41	arUSH2a
ZNF408	<i>Zinc finger protein 408</i>	11p11.2	adFEVR
ZNF513	<i>Zinc finger protein 513</i>	2p23.3	
Retinosi Pigmentària lligada al cromosoma X (X-RP)			
Gen	Proteïna	Localització	Associació amb altres distròfies
OFD1	<i>Oral-facial-digital syndrome 1 protein</i>	Xp22.2	SGBS, OFD1, JBTS
RP2	<i>Retinitis pigmentosa 2 (X-linked)</i>	Xp11.23	
RPGR	<i>Retinitis pigmentosa GTPase regulator</i>	Xp11.4	CORDX1, rAMD

ad: Autosòmic dominant. **ar:** Autosòmic recessiu. **sRP:** Retinosi Pigmentària sindròmica. **BBS:** Síndrome de Bardet-Biedl. **MD:** Distròfia Macular. **RCP:** Vitriretinocoiropatia. **BP:** Bestrofinopatia. **LCA:** Amaurosi congènita de Leber. **CRD:** Distròfia de cons i bastons. **NSHA:** Anèmia hemolítica no esferocítica. **HMSNR:** Neuropatia hereditària motora i sensorial del tipus Russe. **ESC:** Síndrome de l'increment de cons S. **GFS:** Síndrome de Goldman-Favre. **CSNB:** Ceguera nocturna congènita estacionària. **AMDV:** Distròfia macular vitel·lifforme adulta. **MDV:** Distròfia macular vitel·lifforme. **OD:** Malaltia de Oguchi. **SD:** Malaltia de Stargardt. **FF:** Fundus flavimaculatus. **USH3:** Síndrome d'Usher tipus 3. **RP-PPRPE:** Retinosi Pigmentària amb preservació para-arteriolar de l'epiteli pigmentari. **PPRCA:** Atròfia corioretiniana paravenosa pigmentada. **MPS:** Mucopolisacaridosi. **MSS:** Síndrome de Mainzer-Saldino. **MA:** Acidúria mevalònica. **HIDS:** Síndrome d'híper-IgD. **CS:** Esclerosi Coroidal. **BD:** Distròfia de Bothnia. **RPA:** Retinosi punctata albescens. **RCD:** Distròfia de bastons i cons. **OMD:** Distròfia macular oculta. **USH2a:** Síndrome d'Usher tipus 2a. **FEVR:** Vitriretinopatia exsudativa familiar. **SGBS:** Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel. **OFD1:** Síndrome orofaciadigital 1. **JBTS:** Síndrome de Joubert. **CORDX:** Distròfia de cons lligada al cromosoma X. **AMD:** Distròfia macular atrofica lligada al cromosoma X. Llistat de gens recollits a RetNet (<https://sph.uth.edu/retnet/>).

4. El gen *CERKL* (*Ceramide Kinase-Like*)

L'any 2004, el nostre grup va identificar per primera vegada el gen *CERKL*, localitzat al locus RP26, a partir de l'anàlisi per clonatge posicional d'una família espanyola afecta d'RP. Des de llavors, la funció de *CERKL* encara roman desconeguda. Així, doncs, en aquest treball ens centrarem en l'estudi funcional d'aquest gen per aportar-hi una mica de llum.

4.1 Història i descobriment: Des del locus RP26 fins a *CERKL*

A finals del anys noranta, el grup de recerca de la Dra. González-Duarte va analitzar una família consanguínia amb 13 fills dels quals 5 estaven clínicament diagnosticats d'arRP. Els símptomes havien aparegut durant la segona dècada de vida i presentaven pèrdua de la visió perifèrica i central, entre altres, tot i que el grau d'afectació entre ells era diferent. Gràcies als electroretinogrames, prova que es realitza de manera rutinària als pacients amb distròfies de retina, es va mostrar que presentaven alteracions principalment en els bastons, el que es característic de l'RP [32].

El primer abordament que es va dur a terme va ser l'anàlisi de lligament amb loci que, en aquell moment, havien estat ja reportats com a causatius de la malaltia RP, Síndrome d'Usher, Síndrome de Bardet-Biedl o altres distròfies de retina. A més, també es van incloure gens candidats causants de desordres oculars com ara: *PEDB*, *RHO*, *RDS*, *ROM1*, *RCV1*, *NRL* i *PDEG*. En aquesta anàlisi no es van trobar evidències de cosegregació entre la malaltia i cap dels marcadors genètics analitzats [32].

Davant la manca de candidats, el següent pas va ser realitzar un anàlisi de lligament amb marcadors distribuïts de manera aleatòria al llarg del genoma. Després d'analitzar més de 75 microsatèl·lits, un dels marcadors, el D2S118, localitzat al cromosoma 2, va donar una puntuació de *lod score* significativa. L'estudi d'aquesta

regió va permetre caracteritzar un nou locus, conegut com RP26, causant d'arRP. Inicialment es creia que la seva mida eren aproximadament 17 Mb però estudis més refinats el van acotar a 2,5 Mb [32], [33].

La regió descrita com RP26 contenia cinc gens ja descrits però cap d'ells presentava cap variant patogènica un cop seqüenciats. La cerca més exhaustiva de cDNA o ESTs no caracteritzats a les bases de dades dins de les 2,5 Mb va revelar dues seqüències properes incompletes, una EST i un cDNA de retinoblastoma, localitzades entre els gens *ITGa4* i *NEUROD1*. L'alineament *in silico* d'ambdues seqüències mostrava una elevada homologia amb la ceramida cinasa, l'esfingosina cinasa i la diacilglicerol cinasa, el que suggeria que les seqüències analitzades corresponien a un nou gen. Després d'analitzar una llibreria de cDNA de retina humana es va determinar que la regió codificant del nou gen contenia 1.596 nucleòtids i 13 exons (avui sabem que el gen humà té 14 exons). La proteïna de 532 aminoàcids predita presentava una elevada similitud (50% homologia) [33] amb la ceramida cinasa humana [34], enzim que fosforil·la a la ceramida 1 fosfat (C1P), un metabòlit de la via dels esfingolípids involucrat en l'apoptosi, la proliferació, la fagocitosi i la inflamació [35]–[37]. Per raó d'aquesta similitud, el nou gen es va anomenar *Ceramide kinase-like (CERKL)*. *CERKL* està localitzat a la regió cromosòmica 2q31.3 i comprèn un total de 140,35 Kb.

Es va analitzar el gen *CERKL* a la família on s'havia identificat el locus RP26, i es va identificar una mutació sense sentit en homozigosi a l'exó 5 (R257X) a tots els pacients de la família. Aquesta mutació truncava de manera prematura la proteïna al mig del domini catalític predit i que, a més a més, cosegregava amb la malaltia [33]. Per tant, *CERKL* és el gen causant d'arRP del locus RP26.

4.2 Complexitat transcripcional i expressió de *CERKL*

Estudis inicials en teixits humans varen identificar al menys 9 transcrits diferents del gen *CERKL* [38], tot i que, posteriorment, l'anàlisi de retines humanes i de ratolí va

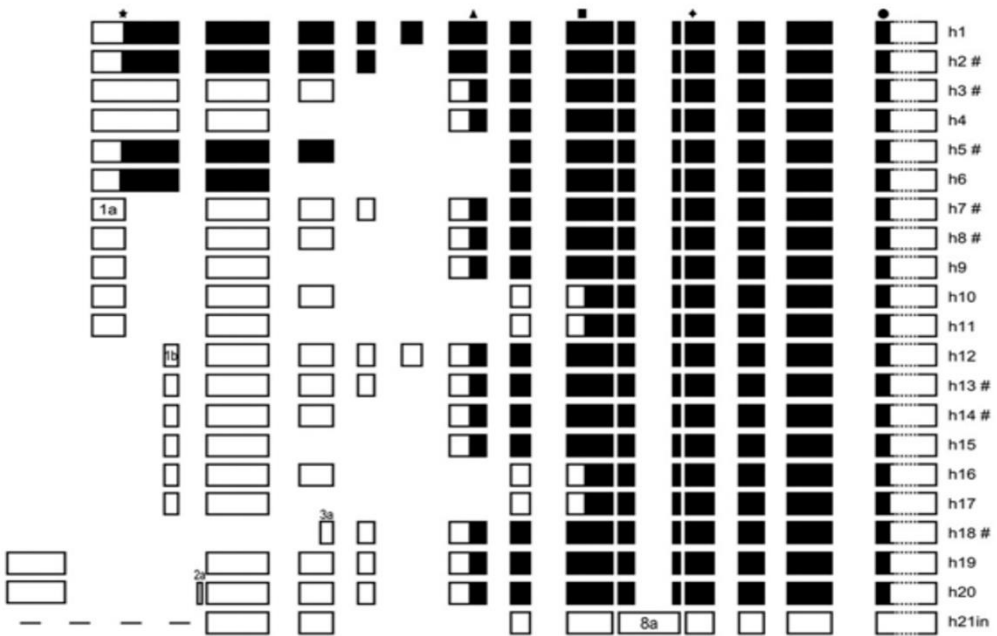
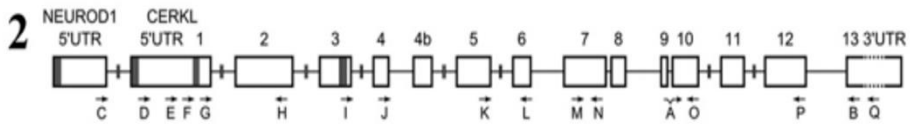
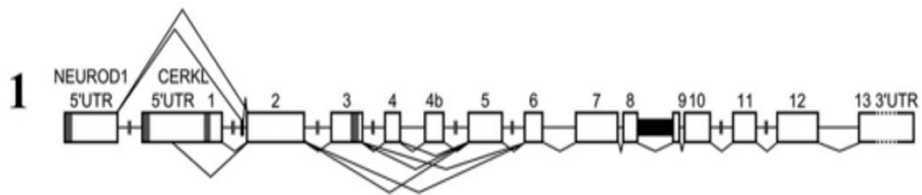
permetre concloure que, en realitat, produïa més de 20 transcrits diferents generats per *splicing* alternatiu (Figura 4) [39].

Per cada transcrit, tant humà com murí, la regió 3' UTR és única i a més, en el cas dels ratolins és més llarga, el que possiblement significa que presenta dues senyals de poliadenilació. En ambdues espècies, la regió 5' UTR presenta multiplicitat de promotors i llocs d'inici de transcripció (TSS), el que contribueix a la complexitat dels transcrits madurs generats per aquest gen [39].

En el cas dels transcrits humans identificats a retina, es van identificar quatre TSS, dels quals la majoria de transcrits s'expressen des del promotor adjacent a *CERKL* (comencen a la regió 5' UTR inicialment descrita), així com també del promotor del gen adjacent a 5', *NEURODI*, que es transcriu en la mateixa direcció. També hi ha transcrits que es generen a partir de TSSs interns a l'exó 1 i l'exó 3. Addicionalment, el gen humà conté un exó addicional en pauta, específic d'aquesta espècie, l'exó 4b, que es troba dins del domini DAGK, trencant el domini consens [39]. Aquest exó de més, respecte el gen de ratolí, fa que la nomenclatura de les mutacions canviï, en el cas de la mutació més prevalent al món de *CERKL* que ja hem esmentat prèviament, R257X (o p.R257*), també se l'anomena p. R283*. Finalment, tant l'exó 4b com l'exó 5 presenten un lloc d'*splicing* minoritari (GC enlloc de GU), el que suggereix que l'*splicing* alternatiu és rellevant i té una fina regulació.

Pel que fa als transcrits a retina de ratolí es van identificar quatre TSS diferents, dels quals es va poder comprovar que, com succeeix en la retina humana, la majoria de transcrits s'expressen des del promotor adjacent a *CERKL* i del promotor del gen adjacent a 5', *NEURODI*. També existeix un promotor intern, dins l'intró 2, actiu en altres òrgans i que pot generar dos exons inicials diferents anomenats 3a i 3b [39].

CERKL Humà



Cerkl Murí

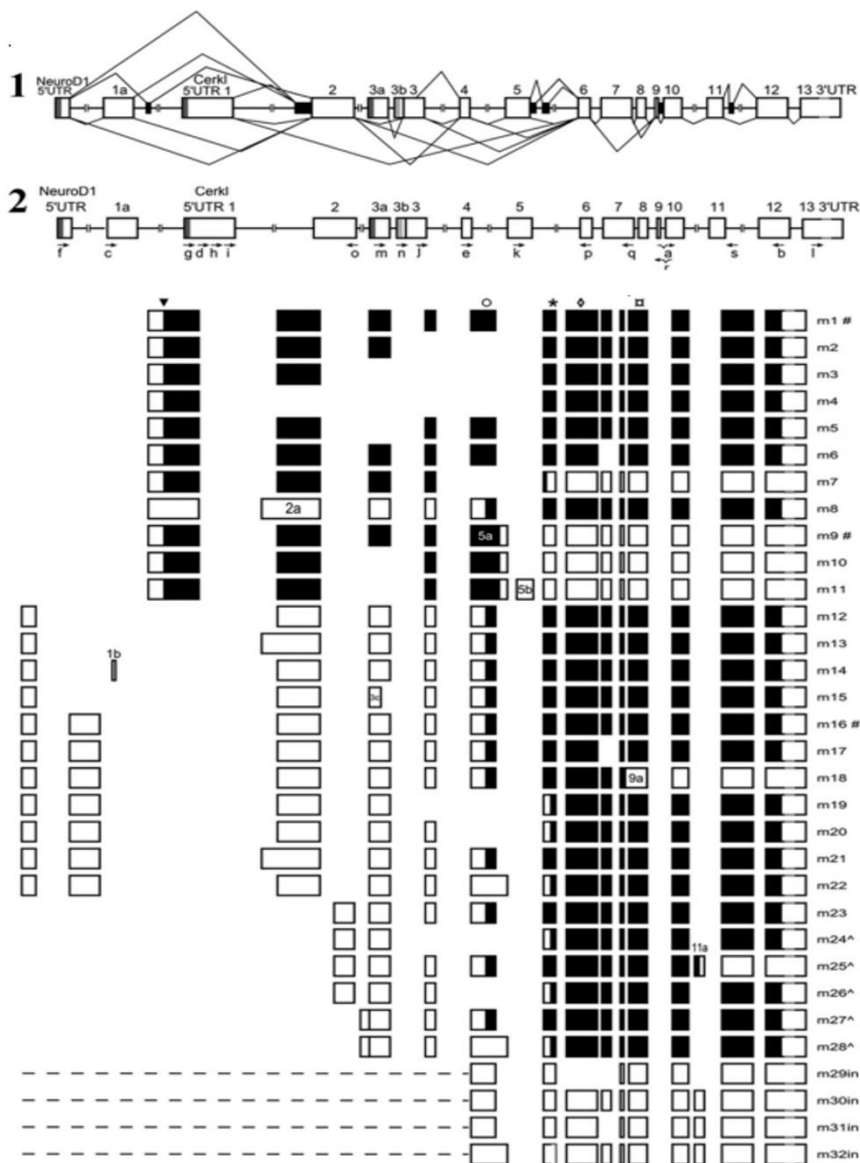


Figura 4. Representació de la complexitat transcripcional de *CERKL* humana i ratolí. En la imatge es poden observar els diferents *splicings* alternatius i totes les isoformes que es generen. (Imatge adaptada de Garanto, et. al., 2011).

Aquesta complexitat transcripcional suggereix que *CERKL* pot exercir més d'una funció, que poden ser subtilment diferents segons els dominis proteics expressats, i que aquestes funcions poden ser distintes en diferents òrgans, depenent dels transcrits diferencials. Alguns estudis demostren que *CERKL* està involucrat en la resposta a l'estrès oxidatiu, tot i que la seva funció encara no està clara, i s'ha suggerit un paper en la protecció cel·lular en resposta al dany per estrès oxidatiu [40], [41]. Estudis funcionals han demostrat que *CERKL* presenta una localització subcel·lular dinàmica, ja que es pot translocar de nucli a citoplasma, i pot estar associat a vesícules de l'aparell de Golgi i trans-Golgi, així com, a les membranes del reticle endoplasmàtic i mitocondris [40], [42]. Malgrat les mutacions a *CERKL* únicament causen un fenotip patològic a retina, aquest gen s'expressa en nombrosos teixits adults i fetals, tant en ratolí com en humans. En humans, la major expressió de *CERKL* es detecta a la retina, a algunes regions del cervell, els pulmons i els ronyons [33], [43] mentre que en ratolins adults, el nivells més elevats d'expressió es detecten a la retina, el fetge i els testicles [39].

4.3 Homologia i dominis de la proteïna CERKL

L'isoforma completa de *Cerkl* codifica per una proteïna de 525 aminoàcids, d'aproximadament 60 kDa, amb diferents dominis (Figura 5).

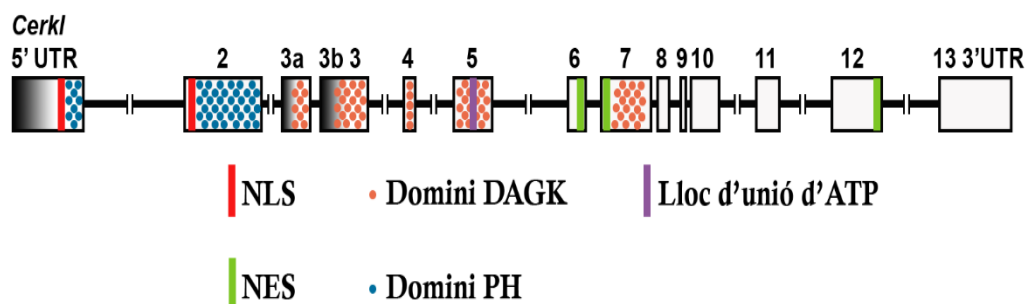


Figura 5. Representació de la proteïna CERKL, amb els dominis proteics identificats.

CERKL conté dos dominis de localització nuclear (NLS), l'NLS-1 està codificat a l'exó 1 i l'NLS-2, a l'exó 2 i ambdós contenen 12 aminoàcids. Malgrat que ambdós NLS contenen la seqüència consensus característica dels dominis NLS, quan es muten aquests dominis, únicament canvia la localització subcel·lular de CERKL si es muta l'NLS-2, el que indica que dels dos NLS presents a CERKL, l'NLS-2 és l'únic que media la importació nuclear [35]. Addicionalment, presenta també dos dominis d'exportació nuclear (NES), NES-1 està codificat entre els exons 6 i 7, i NES-2, entre els exons 12 i 13 (Figura 5) [44]. El fet que contingui aquests dos senyals d'exportació i importació del nucli suggereix que és una proteïna dinàmica, com ja veurem posteriorment, ja que té la capacitat d'entrar i sortir d'aquest compartiment subcel·lular.

El domini plectrina (PH) es troba a la part N-terminal de la proteïna i és el menys estudiat. Alguns estudis suggereixen que podria tenir una funció estructural o d'interacció proteïna-proteïna, més que d'ancoratge subcel·lular, com és habitual, (Figura 5) [44]. D'altra banda, el domini diacilglicerol cinasa (DAGK) és un dels dominis més ben estudiats i caracteritzats de CERKL ja que inicialment se li atribuïa una funció cinasa. El domini DAGK presenta un 29% d'identitat nucleotídica i un 50% de similitud proteica amb la ceramida cinasa o CERK, la cinasa de lípids més similar, filogenèticament, a CERKL i per la qual se li va atribuir el nom. De fet, anàlisis sistemàtics de la superfamília que conté el domini DAGK confirmaren que CERKL prové del grup de les cinases d'esfingosina (SPHKs). L'anàlisi d'homologia entre CERKL i CERK també va revelar l'existència d'un lloc d'unió a l'ATP a l'exó 5. Malgrat totes les semblances i conservació dels dominis cinasa i d'unió a l'ATP amb CERK, el que suggereix que podria tenir una funció cinasa, i a pesar de múltiples esforços de diferents grups de recerca, mai no s'ha pogut demostrar que pugui exercir una funció cinasa, ni de lípids ni de proteïnes, així com tampoc s'ha trobat un possible substrat (Figura 5) [43], [45]. Finalment, s'ha descrit que la regió N-terminal de 256 aminoàcids és capaç d'interaccionar amb l'RNA, el que s'ha relacionat amb la capacitat de CERKL per formar ribonucleocomplexes [41].

4.4 *CERKL*, un gen causant de distròfies de retina

Des del descobriment de *CERKL* s'han descrit, fins al moment, més de 40 mutacions patogèniques diferents, sempre implicades en distròfies de retina recessives (Taula 2). Les mutacions no-sinònimes són les més freqüents en aquest gen, tot i que no hi ha cap associació entre el tipus de mutacions –canvi de sentit o sense sentit– ni si es troben en homozigosi o doble heterozigosi, amb el fenotip observat. De fet, les mutacions a *CERKL* poden causar Retinosi Pigmentària, distròfia de cons i bastons, distròfia macular o altres patologies retinals.

Taula 2. Classificació de les mutacions descrites en *CERKL*.

Mutacions no-sinònimes (canvi de sentit i sense sentit) de <i>CERKL</i>				
Mutació	Localització	Canvi d'aminoàcid	Zigosi	Distròfia retinal
GAG-TAG	c.193G>T	p.E65*	HM [46] HT [47]	RCD, MD
CGT-TGT	c.316C>T	p.R106C	HT [46]	arRP
CGT-AGT	c.316C>A	p.R106S	HM [48]	arRP
GGT-GAT	c.356G>A	p.G119D	HT [49]	CRD
CTC-CGC	c.365T>G	p.L122R	HM [50]	RP
TGC-TGG	c.375C>G	p.C125W	HM [51]	CRD
CTA-CCA	c.398T>C	p.L133P	HT [52]	RP
TGG-GGG	c.451T>G	p.W151G	HT [53]	RD
CCG-CTG	c.497C>T	p.P166L	HT [54]	MD
AAA-TAA	c.598A>T	p.K200*	HT [55]	RP
CAG-TAG	c.664C>T	p.Q222*	HT [56]	arRP
GAT-GTT	c.674A>T	p.D225V	HT [57]	RP
GGA-AGA	c.772G>A	p.G258R	HT [58]	CRD
CTG-CCG	c.812T>C	p.L271P	HM [59]	RP
CGA-TGA	c.847C>T	p.R283*	HM [33] HT [47]	RP, CRD
ATA-ACA	c.890T>C	p.I297T	HM [60]	RP, RCD
TGC-TGA	c.999C>A	p.C333*	HM [61]	CRD
CGA-TGA	c.1090C>T	p.R364*	HM [62]	CD, CRD
TGT-TGA	c.1164T>A	p.C388*	HT [63]	RD
CAG-TAG	c.1270C>T	p.Q424*	HM [64]	RP
CGA-TGA	c.1381C>T	p.R461*	HT [65]	RP

AGC-TGC	c.1651A>T	p.S551C	HT [66]	MD, CD, CRD
Mutacions d'<i>splicing</i> de <i>CERKL</i>				
Mutació	Localització	Zigosi	Distròfia retinal	
IVS1 ds G-A +1	c.238+1G>A	HM [38]	RD	
IVS2 ds T-G +2	c.481+2T>G	HM [64]	CRD	
IVS9 as T-A -3	c.1212-3T>A	HT [67]	RP	
IVS11 as C-G -3	c.1347-3C>G	HT [68]	RD	
IVS1 ds T-C +2	c.238+2T>C	HT [69]	RP, CRD	
Petites deleccions de <i>CERKL</i>				
Mutació	Localització	Canvi d'aminoàcid	Zigosi	Distròfia retinal
CACTT ^{^139} GATCTtATTAATTTAA	c.420delT	p.(Ile141 Leufs*3)	HT [55]	RP
ACTGT ^{^149} GACATatGGTTTtagACA	c.450_451 delAT	p.(Ile150 Metfs*3)	HM [70]	CRD
GTA ^{^204} ACAA_EI_ GTAagTAATTTTCAG	c.613+4_613+5 delAG		HT [68]	RP
TA ^{^204} ACAA_EI_ GTAAgtaaTTTTcAGAAT	c.613+5_613+8 delGTAA		HM [71]	RP
TTTTCTAG_IE_ TGtT ^{^254} GTCTGTGTT	c.759delT	p.(Val254 Serfs*12)	HT [53]	RD
AATGCT ^{^278} GGGAtGGAAACAGAC	c.836delT	p.(Met279 Argfs*7)	HT [72]	RP
GAATC ^{^285} CTGACtCCTGTCAGAG	c.858delT	p.(Pro287 Leufs*10)	HT [55]	RP
ATTGCAC ^{^322} ATTatAATGG_EI_GTAAG	c.968_969delTA	p.(Ile323 Asnfs*46)	HM [73]	
GTTCTCA ^{^34} 8GCCatGTTTGGCTTT	c.1045_1046 delAT	p.(Met349 Valfs*20)	HM [47]	RD
AAA ^{^383} CTTAA_EI_ GTaagtCTTTTCTTA	c.1151+3_1151+6 delAAGT		HM [68]	RP
GCAGAA ^{^387} GACTgtGAAATATCAT	c.1164_1165 delTG	p.(Cys388*)	HT [74]	
CTGTT ^{^493} GAGGAaGTA AAAAGTTC	c.1482delA	p.(Val495*)	HM [75]	RD

Petites insercions de <i>CERKL</i>				
Mutació	Localització	Canvi d'aminoàcid	Zigosi	Distròfia retinal
GGGCATC ^{^52} TTCtGAGATCGGGA	c.156_157insT	p.(Glu53*)	HM [72]	RP
GCGAG ^{^66} CGAGC gagcACTGCGGTGG	c.197_200dup GAGC	p.(Leu68 Serfs*15)	HT [67]	MD, CD, CRD
TGAGACT ^{^490} TACttacACTGTTGAGG	c.1467_1470 dupTTAC	p.(Thr491 Leufs*4)	HM [76]	RP
ATCAGT ^{^547} CTTTctttATGGAGGAAG	c.1639_1642 dupCTTT	p.(Tyr548 Serfs*19)	HT [52]	RP
Grans delecions de <i>CERKL</i>				
Mutació	Localització	Zigosi	Distròfia retinal	
gDNA	Exó 1-2	HT [77]	RD	
gDNA	Exó 2	HT [67]	RP	
gDNA	Exó 2	HT [68]	MD, CD, CRD	
gDNA	Exó 1	HT [69]	RP, CRD	
gDNA	Exó 2	HT [69]	RP, CRD	

ar: Autosòmic recessiu. **HM:** Homozigosi. **HT:** Heterozigosi. **RD:** Distròfia de retina. **RP:** Retinosi Pigmentària. **CD:** Distròfia de cons. **CRD:** Distròfia de cons i bastons. **MD:** Degeneració macular. Llistat de mutacions extretes de la base de dades *Human Gene Mutation Database* (HGMD) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

La primera mutació descrita a *CERKL* va ser la p.R283* l'any 2004 en una família espanyola. Aquesta mutació produeix un codó d'aturada prematur a l'exó 5, trencant el domini DAGK [33]. Posteriorment, aquesta mutació s'ha trobat en molts més casos, tant en homozigosi com en heterozigosi (essent els pacients heterozigots composts), de fet és la mutació més prevalent a Espanya –i en tot el món– i pot causar tant RP com CRD [74], [78]. Aquesta mutació afecta a un exó que presenta *splicing* alternatiu.

En els últims quinze anys, el nombre de mutacions patogèniques identificades a *CERKL* ha augmentat molt notablement. Entre les mutacions amb un fenotip més sever, trobem la mutació d'*splicing* de l'exó 1 (c.238 + 1 G >A), que provoca la

retenció de l'intró 1 i la disrupció de tota la pauta de lectura, mutació identificada en una població iemenita. Aquesta mutació provoca una afectació macular molt severa i primerenca, i en alguns casos s'ha diagnosticat com a RP d'aparició precoç (*early-onset* RP) i en altres com a CRD [38]. Altres mutacions afecten a dominis funcionals de *CERKL*, com ara les mutacions p.R106C o p.R106S, localitzades al NLS-2 [48].

En resum, *CERKL* presenta una gran varietat de mutacions que afecten tant als dominis seus dominis com a les regions d'*splicing*, etc. i el fenotip causat no depèn ni de la mutació, ni de si la mutació es troba en homozigosi o doble heterozigosi. Val a dir que les afectacions més comuns quan *CERKL* es troba mutat són la Retinosi Pigmentària, de la que ja hem parlat anteriorment, i en menor quantia, la Distròfia de cons i bastons.

4.4.1 Distròfia de cons i bastons (CRD)

La CRD té una prevalença d'1 cada 30.000-40.000 individus i es caracteritza per la mort dels fotoreceptors, primer els cons i després, els bastons (a diferència de l'RP en que primer moren els bastons i, posteriorment, els cons). Els seus símptomes acostumen a aparèixer durant l'adolescència o inclús *a posteriori*, entre els quals s'observa un decrement en l'agudesia visual i un increment en la sensibilitat a la llum (fotofòbia). Aquests trets normalment van lligats a una deficiència en la visió en color, punts cecs al centre del camp de visió i pèrdua parcial de la visió perifèrica. Amb el temps, els pacients desenvolupen ceguera nocturna i acaben perdent la visió completament a causa de la mort dels bastons.

La CRD presenta una elevada heterogeneïtat genètica, amb més de 30 gens causals descrits que segueixen un patró d'herència mendeliana clàssic: autosòmic recessiu CRD (arCRD), autosòmic dominant CRD (adCRD) i CRD lligada al cromosoma X (X-CRD) encara que també pot presentar-se associada a síndromes, com són la

síndrome de Bardet-Biedl o l'atàxia espinocerebral del tipus 7 (SCA7). Els gens que causen CRD més freqüentment són: *ABCA4*, *CRX*, *GUCY2D* i *RPGR* [79]–[81].

5. Estrès cel·lular i malalties de la retina

En l'homeòstasi tissular hi ha un equilibri entre la taxa de creixement cel·lular net i la taxa de mort [82]. Davant d'un estrès cel·lular, aquesta homeòstasi fisiològica es posa en risc pel que, depenent del tipus d'estrès cel·lular i la seva severitat, les respostes poden ser diverses. Essencialment, si l'estímul d'estrès no sobrepassa cert llindar, les cèl·lules poden enfrontar-s'hi, ja que disposen de mecanismes protectors davant estímuls d'estrès, els quals estan dissenyats per assegurar la supervivència cel·lular. Pel contrari, la incapacitat en activar o mantenir una resposta cel·lular efectiva de protecció, comporta l'activació de cascades de senyalització en resposta a l'estrès que, finalment, poden dur a la mort cel·lular [83].

Les cèl·lules responen a l'estrès de maneres molt variades, des de l'activació de vies que suporten la supervivència fins a vies que duen a la mort cel·lular programada per eliminar les cèl·lules que han estat danyades. La resposta inicial d'una cèl·lula enfront de l'estímul d'estrès és intentar defensar-se i recuperar-se davant l'estímul nociu. D'altra banda, si l'estímul persisteix o la cèl·lula no pot resoldre la situació, s'activen les vies de senyalització d'apoptosi o mort cel·lular. El fet que la supervivència cel·lular depengui críticament de l'habilitat adaptativa de generar una resposta adient davant estímuls intracel·lulars o d'estrès ambientals, podria explicar perquè aquestes respostes estan tan altament conservades en l'evolució [83], [84].

Hi ha molts tipus diferents d'estrès i la resposta cel·lular dependrà del tipus i de la seva intensitat. Per exemple, respostes protectores, com ara la resposta *heat shock* o la resposta a proteïnes mal plegades, incrementa l'activitat de les proteïnes xaperones, el que millora la capacitat de les proteïnes per aconseguir la conformació

correcta i, per tant, contraresta els efectes de l'estrès i promou la supervivència cel·lular. La capacitat adaptativa cel·lular acaba determinant-ne el seu destí [83].

Si els mecanismes de supervivència no són suficient o no són exitosos, llavors els programes de mort cel·lular programada són activats per eliminar les cèl·lules danyades de l'organisme. Els mecanismes pels quals les cèl·lules moren poden ser diversos: apoptosi, necrosi, piroptosi o mort cel·lular autofàgica [83], [85].

5.1 Estrès oxidatiu (OS) i espècies reactives de l'oxigen (ROS)

La supervivència cel·lular requereix unes proporcions adequades de molècules d'oxigen i antioxidants. Les espècies reactives de l'oxigen (ROS), com ara l'anió superòxid ($O_2^{\cdot-}$), el peròxid d'hidrogen (H_2O_2), el radical hidroxil (OH^{\cdot}), el radical peroxi, així com el segon missatger òxid nítric (NO^{\cdot} , que pot reaccionar amb l'anió superòxid per formar el peroxinitrat, $ONOO^{\cdot}$), són el tipus d'OS més presents a nivell cel·lular, tot i que hi ha molts altres estímuls que causen estrès oxidatiu. Normalment, existeix un equilibri entre les espècies pro-oxidants i els mecanismes de defensa antioxidants, entre els que es troben els enzims que metabolitzen les ROS, com ara la catalasa, la glutatió peroxidasa o les superòxid dismutases (SODs). L'OS es dona quan hi ha un desequilibri entre els agents oxidants i antioxidants, la qual cosa està a l'inici de diversos processos patològics. Malgrat que la majoria d'estímuls d'OS poden ser superats amb èxit per les cèl·lules, perturbacions sostingudes d'aquest equilibri pot causar tant apoptosi com necrosi cel·lular [86]–[89].

Les espècies reactives de l'oxigen es produeixen durant alguns processos enzimàtics i en les reaccions d'oxidació. La cadena respiratòria dels mitocondris és la font principal de producció de ROS. A la membrana interna dels mitocondris, els electrons són transportats i l'oxigen es converteix en aigua. Sota condicions d'hipòxia, aquest procés no es pot dur a terme completament, el que incrementa la producció d'anions superòxid ($O_2^{\cdot-}$). La nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (NADPH) oxidasa (NOX) és la font de les ROS, derivades principalment dels

anions superòxid provinents de reaccions enzimàtiques. Dins de la família NOX hi ha set oxidases, entre les que trobem NOX4, que pot produir anions superòxid i peròxid d'hidrogen. L'òxid nítric (NO) es produeix per una reacció seqüencial d'oxidació/reducció de la L-arginina a L-citrulina per la sintasa d'òxid nítric (NOS), de la que existeix la forma induïble (iNOS), la neuronal (nNOS) i l'endotelial (eNOS) [90].

Aquests radicals lliures són molècules petites o ions que són reactius amb petites activacions d'energia i tenen una vida mitjana curta [91]. Hi ha molts agents ambientals que poden causar l'aparició de ROS, com ara la pol·lució, el fum (per exemple del tabac) i la llum del sol, encara que també poden formar-se en reaccions dins del propi cos, com ara en reaccions catabòliques incompletes, la destoxicació hepàtica o la producció d'energia [92]. Un increment intracel·lular dels nivells d'aquests agents oxidants presenta dos efectes: el dany de varis components cel·lulars, i l'activació de vies de senyalització específiques, els quals poden influenciar nombrosos processos cel·lulars lligats a l'envelliment i a les malalties relacionades amb l'envelliment [93]. L'OS pot danyar lípids, proteïnes, enzims, carbohidrats i el DNA de les cèl·lules, el que pot comportar la inducció de la mort cel·lular, ja que el DNA i l'RNA es fragmenten i els lípids es peroxiden. En humans, moltes malalties cardíaques, pulmonars i oculars estan associades amb aquests radicals lliures. Les conseqüències de l'OS són la base molecular, en concret, de molts tipus de càncer, de malalties neurodegeneratives, malalties cardiovasculars, diabetis i desordres autoimmunitaris (Figura 6) [94].

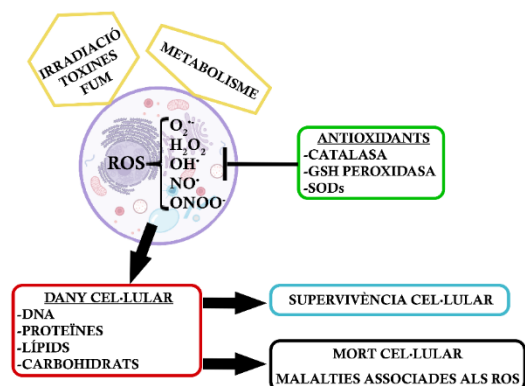


Figura 6. Esquema de l'estress oxidatiu, els seus efectes i del punt d'acció d'alguns antioxidants.

5.1.1 La pol·lució ambiental i el fum del tabac

El fum i la pol·lució són elements exògens que porten toxines productores de ROS. En el cas del tabac, la nicotina promou la producció d'òxid nítric (NO) i incrementa els nivells de factors proangiogènics [95], mentre que el cadmi del tabac s'acumula a l'RPE i a la coroida, el que augmenta la producció de ROS [96]. Addicionalment, la hidroquinona (HQ), un oxidant natural present en molts aliments, plàstics i la pol·lució ambiental, també s'indueix amb el fum del tabac. Finalment, hi ha estudis que han demostrat que l'extracte del fum de les cigarretes (CSE) indueix alteracions en la integritat mitocondrial i causa un increment en la peroxidació de lípids i en la mort de les cèl·lules de l'RPE [90], [97].

5.1.2 Estrès lumínic

Els humans són éssers diürns, pel que diàriament estan exposats a la llum solar, que provoca l'oxidació de proteïnes i lípids. La retina dels mamífers és especialment vulnerable a aquest tipus d'estrès. De fet, els fotoreceptors i l'RPE generen alts nivells de ROS a causa de diversos factors: I) els fotoreceptors estan contínuament exposats a la llum durant el dia i contenen diferents molècules fotosintetitzadores; II) ambdós tipus cel·lulars metabolitzen i treballen en condicions d'elevat oxigen, de fet, tota la retina es caracteritza per ser una gran consumidora d'oxigen; III) els discs membranosos dels fotoreceptors estan enriquits en àcids grassos poliinsaturats que són especialment susceptibles al dany per oxidació. El reciclatge dels discs dels fotoreceptors es duu a terme gràcies a que l'RPE els fagocita, pel que l'estrès oxidatiu genera que s'acumulin ROS no solament als fotoreceptors sinó també a l'RPE. La foto-oxidació provoca l'acumulació de lipofuscina, que és el producte de l'oxidació de lípids i lipoproteïnes que contenen fluoròfors foto-oxidables [98], [99]. Així doncs, l'estrès lumínic promou la mort cel·lular dels fotoreceptors i de la retina més interna [100], [101], així com pot afectar severament a la funció fagocítica de l'RPE [102].

5.1.3 La inflamació

La inflamació és un mecanisme de defensa natural contra patògens. Moltes malalties cròniques estan lligades a elevades produccions de ROS, resultat de l'OS i de l'oxidació de proteïnes. L'oxidació de proteïnes activa l'alliberament de molècules de senyalització inflamatòries, com ara la peroxiredoxina 2 (PRDX2).

La relació entre l'OS i la inflamació ha estat molt ben estudiada al llarg dels anys, evidenciant que l'OS juga un paper patogènic clau en les malalties inflamatòries cròniques [103]. Un exemple clar és que les citosines pro-inflamatòries, com ara TNF- α , l'interleucina-1 β o l'interferó- γ , indueixen la producció de ROS en cèl·lules de l'RPE humanes. De fet, aquestes citocines pro-inflamatòries estan sobre-regulades als ulls de pacients afectats per glaucoma, degeneració macular associada a l'edat, retinopatia diabètica o oclusió de la vena retinal. En particular, les cèl·lules endotelials es troben afectades per la inflamació, ja que indueix canvis en el fenotips d'aquest tipus cel·lular, tot incrementant l'expressió de mediadors inflamatoris, citocines i l'activació d' iNOS [90].

5.1.4 Estrès del reticle endoplasmàtic (RE)

El reticle endoplasmàtic (RE) és el compartiment cel·lular principal, encarregat de la biosíntesi i el plegament de proteïnes. Aquest orgànul cel·lular és un dels sensors cel·lulars principals en respondre a estímuls d'estrès. L'estrès del RE com a resultat de l'acumulació de proteïnes mal plegades permet l'activació de tres proteïnes transmembrana del RE amb activitat enzimàtica i senyalitzadora, l'*inositol-requiring enzyme 1 α* (IRE1 α), la *PKR-like ER kinase* (PERK) i el factor de transcripció activador 6 (ATF6), els quals inicien la resposta de les proteïnes mal plegades (UPR). Mentre que l'estrès transitori del RE pot ser superat amb la resposta UPR, la persistència d'aquest estímul causa l'expressió de gens de resposta inflamatòria [104], [105]. L'acumulació de proteïnes mal plegades té un paper molt important en el desenvolupament de malalties oculars tals com l'RP, MD o el glaucoma [104].

5.1.5 El paper dels antioxidants: Efecte dual de l'NF- κ B i l'antioxidant NRF2

Fins ara hem parlat de les ROS com agents tòxics per la viabilitat cel·lular, però si en parlem de manera més acurada, podríem dir que els ROS tenen un paper beneficiós quan es troben a baixos nivells en els processos d'inflamació o en la resposta immunitària, ja que són els responsables de l'activació de certes vies de protecció cel·lular davant d'un dany.

Per tal que les ROS no superin un llindar perjudicial per la supervivència, la cèl·lula controla el balanç d'agents oxidants/antioxidants. L'organisme humà té diferents mecanismes per contrarestar l'OS, per exemple, produint antioxidants endògens o adquirint antioxidants exògens mitjançant el menjar o suplementos. En ambdós casos, els antioxidants actuen com a cercadors i neutralitzadors de radicals lliures, per tal de prevenir i reparar els danys causats per les ROS i, així, millorar la defensa immunitària i reduir el risc de patir certes malalties.

Per prevenir l'OS, les cèl·lules han de respondre a les ROS muntant un sistema de defensa antioxidant per a regular les reaccions redox i, per això, la producció de factors de transcripció específics és essencial en la determinació del perfil d'expressió gènica i la resposta cel·lular davant l'estrès oxidatiu [106], [107].

El factor de transcripció nuclear κ B (NF- κ B) pertany a una família de factors de transcripció (FTs) amb una importància central en la inflamació i la immunitat. NF- κ B també juga un paper clau en altres processos, com ara el desenvolupament, el creixement cel·lular i la supervivència i la proliferació i, a més, està involucrat en moltes condicions patològiques.

NF- κ B té un paper dual davant l'estrès oxidatiu. Malgrat que en la majoria dels casos actua com un agent antioxidant i promou la supervivència cel·lular també és ben conegut que pot tenir un paper oxidant i promoure la mort cel·lular. Una de les vies més importants d'actuació d'NF- κ B sobre els nivells de ROS és l'increment de l'expressió de proteïnes antioxidants, tals com les SODs, la ferritina de cadena

pesada, les tioredoxines, la glutatió peroxidasa, la dihidrol deshidrogenasa, entre altres, la funció de les quals és protegir davant l'estrès oxidatiu, reduint els seus productes o neutralitzant-los. D'altra banda, NF- κ B té un paper molt important en la inflamació, i alguns enzims que promouen la producció de ROS també són la diana d'NF- κ B, entre els que trobem NOX2, iNOS, nNOS o la ciclooxigenasa 2, tots ells caracteritzats per produir ROS i estar implicats en la resposta inflamatòria o immunitària, i en alguns casos aquesta activació pot comportar la mort cel·lular [108], [109].

D'altra banda, el *nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2)* és un factor de transcripció que regula la defensa antioxidant. En condicions normals, NRF2 es troba al citoplasma interaccionant amb KEAP1, que afavoreix la seva degradació via proteasoma, per la qual cosa els seus nivells són baixos. Pel contrari, en condicions d'estrès oxidatiu, els seus nivells incrementen i es transloca al nucli, on dimeritza amb les proteïnes MAF i s'uneix als promotors de gens que codifiquen per agents antioxidants, com ara les SODs, la catalasa, la glutatió-S-transferasa que, en conjunt, tenen la funció de neutralitzar l'efecte de ROS [90].

NRF2 i NF- κ B regulen vies claus en un balanç cel·lular acurat de l'estat redox i les respostes a l'estrès i a la inflamació. La interacció entre aquestes dues vies succeeix a través de complexes interaccions moleculars que, sovint, depenen del tipus cel·lular i del context tissular. Aquestes interaccions operen a través de mecanismes transcripcionals i post-transcripcionals, tot permetent una fina sintonització de les respostes dinàmiques enfront d'un ambient canviant [109], [110].

5.2 Resposta cel·lular a l'estrès oxidatiu: formació de grànuls d'estrès (SG) i *P-bodies* (PB)

En resposta a l'estrès ambiental (calor, hiperosmolaritat, estrès oxidatiu, etc.), les cèl·lules eucariotes aturen la síntesi de proteïnes de forma estereotipada per conservar l'energia anabòlica i reparar el dany induït per l'estrès. L'aturada de la

traducció és selectiva: mentre que la traducció de transcrits que s'expressen contínuament (gens *housekeeping*) s'atura, la traducció de transcrits induïts per l'estrès que codifiquen per *heat shock proteins* i altres proteïnes de resposta a estrès, o bé es manté, o bé s'afavoreix [111]. Per tal de protegir a aquells mRNAs que no seran traduïts, la cèl·lula inicia una cascada de senyalització per a la formació de grànuls d'estrès (SG), un conjunt de proteïnes que embolcallen als RNAs per tal de protegir-los quan hi ha un estímul d'estrès i que no siguin danyats.

5.2.1 Els grànuls d'estrès (SG)

Al cim de les cascades de senyalització responsables de la reprogramació de la traducció proteica en les cèl·lules estressades, es troba la família de cinases serina/treonina que serveixen com a sensors de l'estrès ambiental. Dins d'aquesta família, cal remarcar: I) PKR, una cinasa depenent de RNA de doble cadena que s'activa amb infeccions víriques, calor o irradiació per llum ultraviolada; II) PERK/PEK, una proteïna del RE que s'activa quan proteïnes mal plegades s'hi acumulen; III) GCN2, un sensor dels nivells d'aminoàcids dins de la cèl·lula que respon a la privació d'aminoàcids; i IV) HRI, una cinasa hemo-regulada que assegura la síntesi equilibrada de cadenes de globina i hemo durant la maduració dels eritròcits. Tots aquests sensors fosforil·len eIF2 α , un component regulador crític del complex ternari (composat per eIF2 $\alpha\beta\gamma$ unit a tRNA^{iMet} i GTP) que carrega l'iniciador tRNA^{iMet} a sobre de la subunitat petita ribosòmica per a iniciar la síntesi de proteïnes. La fosforilació d'eIF2 α inhibeix la traducció de proteïnes, ja que redueix la disponibilitat del complex eIF2-GTP-tRNA^{iMet} [111].

Quan la traducció s'inicia en absència d'eIF2-GTP-tRNA^{iMet}, s'acobla un complex pre-iniciador deficient en eIF2/eIF5, que encalla el complex 48S* [112]. Els complexos pre-iniciadors deficients en eIF2/eIF5, juntament amb els seus mRNAs, són redirigits mitjançant un procés que requereix les proteïnes d'unió a l'RNA, TIA1 i TIAR. Tant TIA1 com TIAR es concentren al nucli, tot i que tenen una localització dinàmica entre nucli i citoplasma.

En resposta a l'estrès cel·lular, TIA1 i TIAR s'acumulen al citoplasma, on ràpidament formen els agregats coneguts com a grànuls d'estrès (SG) [111]. Els SGs són orgànuls sense membrana que es comporten com a gotes lipídiques [113]. L'absència de la subunitat ribosòmica gran en aquests agregats va descartar que els SGs fossin llocs de traducció proteica durant l'estímul d'estrès. De la mateixa manera, la presència de la subunitat petita en aquests *foci* indica que podrien estar relacionats amb els polisomes, ja que la seva composició és molt semblant a la dels SGs. La traducció s'inicia, normalment, quan en el complex pre-iniciador eIF5 hidrolitza GTP i els seus factors iniciadors són desplaçats per a permetre que la subunitat gran del ribosoma s'hi uneixi. L'acoblament addicional de ribosomes converteixen el complex RNA-proteïnes en un polisoma. En cèl·lules estressades, l'activació d'una o més cinases d'eIF2 α causen la seva fosforilació que, consegüentment, inhibeix eIF2B, el factor intercanviador de GTP/GDP que carrega el complex ternari eIF2 sobre la subunitat 40S que ja té unit el mRNA. La privació del complex eIF2-GTP-tRNAi^{Met} inhibeix l'inici de la traducció. Sota aquestes condicions, TIA1 i TIAR promouen l'acoblament del complex deficient eIF2/eIF5 que serà dirigit als SG. Proteïnes d'unió a l'RNA (com ara PABP) que poden tant promoure com inhibir l'estabilitat del mRNA també són reclutades als SGs, pel que el destí dels mRNAs serà determinat per l'activitat aquestes proteïnes. Els SGs són uns complexos altament dinàmics i el fet que els mRNAs entrin i surtin dels SGs fa que hi hagi un equilibri dinàmic entre polisomes i SGs (Figura 7) [111], [112], [114].

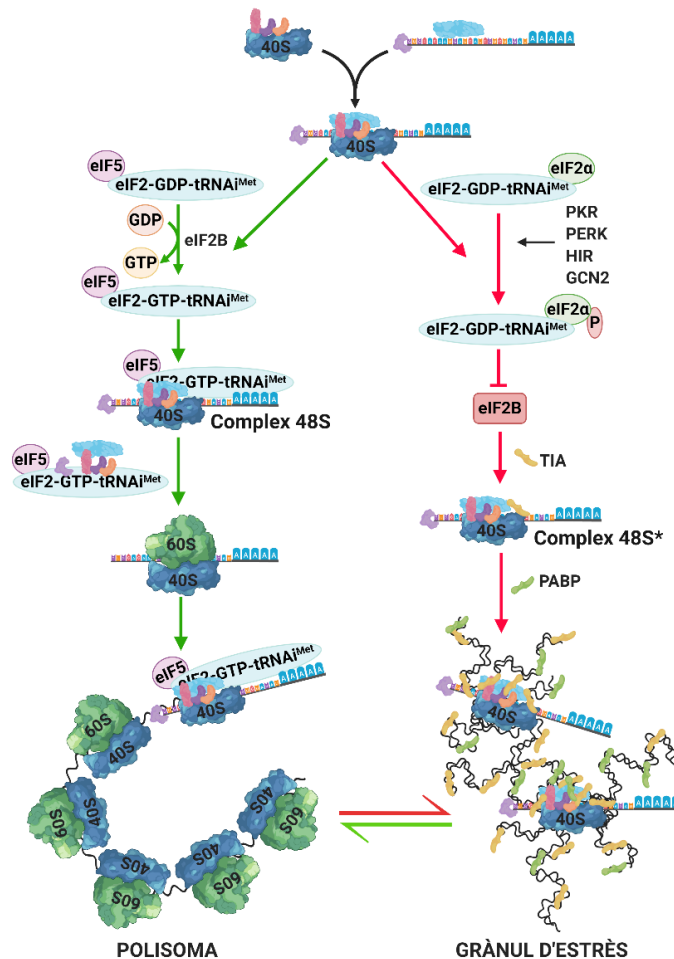


Figura 7. Inici de la traducció en situació o no d'estrès. En condicions normals (fletxes verdes), eIF2B promou l'intercanvi GDP per GTP i permet que eIF2-GTP-tRNA^{iMet} es carregui al complex 48S. Quan el complex ternari, està disponible el complex de pre-iniciació canònic 48S s'acoba a l'extrem 5' encaputxat de l'RNA. Un cop el codó d'iniciació és reconegut per l'anticodó tRNA^{Met}, eIF5 promou la hidròlisi de GTP i els factors iniciadors inicials són desplaçats per la subunitat ribosòmica 60S. Quan ribosomes addicionals s'afegeixen al transcrit, el mRNA es converteix en un polisoma. En condicions d'estrès (fletxes vermelles), la fosforilació d'eIF2α inhibeix a eIF2B, esgotant les reserves de eIF2-GTP-tRNA^{iMet}. Llavors, TIA és reclutat al complex pre-iniciador no canònic 48S*, deficient en eIF2/eIF5, que no pot iniciar la traducció. L'agregació de TIA promou l'acumulació d'aquests complexos al citoplasma formant els grànuls d'estrès (SGs). Addicionalment, es recluten altres proteïnes d'unió a l'RNA, com ara PABP. Els SGs són molt dinàmics i els mRNAs entren i surten d'aquests complexos depenent de la necessitat de traducció, pel que estan en equilibri amb els polisomes.

Recentment, s'ha caracteritzat el transcriptoma insoluble de les proteïnes d'unió a l'RNA (RNP) en resposta a diferents tipus d'estrès, com ara l'estrès del RE, l'estrès oxidatiu produït amb un tòxic com l'arsenit sòdic, o un xoc de temperatura (*heat shock*), elucidant que hi ha una distribució dinàmica i diferencial dels RNAs entre la part soluble del citoplasma i els RNPs, depenent del tipus d'estrès [115]. Conseqüentment, el reclutament diferencial dels RNAs en els SGs podria ser un dels principals mecanismes pels quals la cèl·lula regula l'expressió gènica i el transcriptoma funcional durant l'estímul d'estrès. Una regulació defectiva de la dinàmica subcel·lular dels RNAs, com ara una acumulació excessiva d'SGs o grànuls d'RNP, així com mutacions a les proteïnes implicades en la formació dels RNPs, ha estat relacionat amb moltes malalties humanes, incloent-hi el càncer i malalties neurodegeneratives [115], [116]. Aquestes patologies solen implicar una situació continuada d'estrès a nivell cel·lular i, per tant, la relació entre la dinàmica de l'RNA i l'estrès podria ser clau per entendre els mecanismes patogènics d'aquestes malalties [115].

5.2.2 Els *P-bodies* (PB)

Els *P-bodies* són un complex macromolecular citoplasmàtic i dinàmic compost per mRNAs traduccionalsment inactius i per proteïnes involucrades en la repressió de la traducció i el recanvi del mRNA, com la 3'-desadenilació, 5'-desencaputxament, activitat exonucleasa 5'-3', *nonsense mediated decay* (NMD) i silenciament de gens mediat per miRNA. Els PBs dels mamífers normalment contenen les proteïnes AGO1/3, DCP2, XRN4, EDC3, EIF4E-T, LSM1-7, SMG7, HNRNPM i CPEB1 i són visibles a nivell microscòpic, tant en condicions normals com d'estrès, tot i que l'estrès afavoreix que els complexos es facin més grans [114].

Donada la concentració de factors de degradació d'RNA als PBs, inicialment es va creure que eren llocs de degradació d'mRNA però, recentment, s'han trobat evidències que els PBs no són exclusivament llocs de degradació dels mRNAs, sinó que també poden actuar com a lloc d'emmagatzematge de mRNAs reprimits, els

quals podrien ser alliberats i expressats segons les necessitats cel·lulars. El fet que hi hagin mRNAs intactes i factors de degradació d'RNA als PBs sembla contradictori, però reflexa la complexitat del control cel·lular que, d'una banda requereix producció de moltes proteïnes i, alhora, protecció d'mRNAs concrets per proteïnes específiques d'unió a l'RNA i repressors de la traducció que inhibeixen la seva degradació [114], [117], [118].

5.2.3 Paral·lelismes i diferències entre els SGs i els PBs

Els PBs i els SGs comparteixen al voltant del 10-15% dels seus components proteics, incloent-hi moltes proteïnes d'unió a l'RNA, com ara AGO1/2, EDC3/4, eIF4E, LSM1/3, PATL1 [114]. Algunes de les característiques que comparteixen els PBs i els SGs: I) són agregats citoplasmàtics que no es troben embolcallats per membranes i presenten un comportament similar a les gotes lipídiques; II) tot i que els PBs estan sempre presents, ambdós, PBs i SGs, s'indueixen sota condicions d'estrès; III) la mida dels dos tipus de complexos depèn del transport retrògrad a través dels microtúbuls; IV) tant els PBs com els SGs estan en recanvi constant amb els polisomes per tal de regular la traducció proteica; V) com ja hem mencionat anteriorment, comparteixen una extensa llista de proteïnes que formen part d'ambdós complexos [119].

Malgrat les moltes semblances que presenten, en realitat són complexos amb clares diferències. En condicions d'estrès es troben molt propers dins les cèl·lules, pel que es pensava que hi havia un intercanvi d'RNAs entre ells, però actualment s'ha vist que aquest intercanvi és molt infreqüent. Tot i que poden compartir els mateixos mRNAs, l'estat en que es troba l'RNA és diferent. En els SGs, els mRNAs estan poliadenilats, i el fet que es trobin units a eIF4 γ i a PABP suggereix que podrien estar circulars, mentre que als PBs, els mRNAs no es troben poliadenilats, de fet es creu que és un dels requeriments essencials en la formació inicial dels PBs. D'altra banda, les vies de senyalització que desencadenen la formació dels SGs o els PBs són diferents, la formació dels PBs està regulada per la MAPK, mentre que com ja

hem vist, la formació dels SGs està regulada per la fosforilació d'eIF2 α . Encara que els dos complexos han estat altament estudiats al llarg del temps, encara queda bastant per ser descobert, especialment la seva funció, el repartiment dels mRNAs entre ells i la manera per la que alguns mRNAs són capaços d'escapar a la degradació en els PBs [114], [119].

5.3 Estrès oxidatiu: Causant de malalties oculars

L'estrès oxidatiu és un factor important en el desenvolupament i la progressió de múltiples desordres neurodegeneratius –incloent-hi l'esclerosi lateral amiotròfica (ALS), el Parkinson, l'Alzheimer i la malaltia de Huntington– i també, en diferents malalties oculars. L'envelliment, les mutacions gèniques, i l'exposició excessiva a agents oxidants externs (com ara l'exposició a la llum) incrementen l'estrès oxidatiu a l'ull [90].

5.3.1 Malalties de la superfície ocular

Malgrat que la lent i la retina són els principals elements de l'ull que es veuen afectats per l'estrès oxidatiu, la superfície de l'ull és l'àrea més exposada a l'ambient i, per tant, la primera barrera contra oxidants exògens. Una de les patologies més freqüents és la conjuntivitis al·lèrgica, causada per l'hipersensibilitat a certs tipus de pol·lens o a contaminants ambientals (fums dels cotxes, tabac, etc.), que incrementen la producció de ROS intracel·lular i desencadenen una cascada de senyalització encapçalada pels mastòcits, la qual acaba reclutant i acumulant cèl·lules del sistema inflamatori a la conjuntiva de l'ull [120], [121].

Curiosament, una de les condicions més comuns associada a l'estrès oxidatiu a la superfície de l'ull és la resposta iatrogènica als col·liris que contenen clorur de benzalconi. Hi ha estudis que demostren que és un agent citotòxic que actua a través de l'activació del receptor de mort cel·lular P2X7, associat amb l'OS i l'apoptosi [121].

Un element de la superfície de l'ull que està subjecte a elevats nivells d'OS i, consegüentment, s'hi associen moltes malalties és la còrnia.

- En la inflamació aguda de la còrnia, les ROS estan molt implicades. De fet, una de les teràpies emprades per curar les úlceres provocades durant la inflamació és l'aplicació d'antioxidants que continguin superòxid dismutasa [122].
- Pacients que pateixen d'ulls secs presenten marcadors de ROS, com ara la peroxidació de lípids i l'activitat mieloperoxidasa elevats, el que implica una resposta inflamatòria. Aquestes reaccions poden causar un dany sever a l'ull, ja que els radicals lliures i la inflamació estan involucrats en l'avenç de la malaltia dels ulls secs [123]. La lactoferrina, l'àcid ascòrbic, l'àcid úric i la cisteïna, antioxidants present a les llàgrimes, protegeixen a la superfície ocular de la radiació ultraviolada (UV), a més de protegir dels danys causats per la sequedat de l'ull [121], [124].
- El queratocon és una condició ocular en que la còrnia s'aprima progressivament cap endavant, recordant a la forma d'un con, el que causa dificultats visuals. La peroxidació de lípids i una capacitat antioxidant reduïda s'associen al desenvolupament d'aquesta patologia, el que suggereix que les ROS estan implicats en el seu desenvolupament [125].
- La distròfia endotelial de Fuch, caracteritzada per la pèrdua progressiva de cèl·lules endotelials de la còrnia, pot comportar queratopatia bullosa, ja que a causa de la disfunció endotelial es formen ampolles subepitelials plenes de líquid. En aquesta malaltia, la còrnia presenta peroxinitrat juntament amb peroxidació de lípids [126].

Diferents malalties de la còrnia estan relacionades amb el dany causat per l'estrès oxidatiu, no obstant, cada malaltia presenta un perfil de molècules de ROS produïdes diferent [127]. Una exposició perllongada a la UV provoca dany oxidatiu al DNA de les cèl·lules de la còrnia. L'estrès oxidatiu juga un paper molt important en la propagació del dany cel·lular, que acaba causant malalties com les que ja hem descrit, entre altres com la conjuntivocalasis, excés de plegaments a la conjuntiva

entre el globus ocular i el lacrimal, i el dany epitelial causat per la llum UV i el tabac. Endemés, l'OS s'ha vist implicat en la patogènesi i la patofisiologia de malalties cornials com ara el pterigió, un creixement anormal per la inflamació del teixit de la conjuntiva que tendeix a dirigir-se cap a la còrnia, provocant l'aparició de queratocon i tot un conjunt de condicions inflamatòries, metabòliques, degeneratives i iatrogèniques [94], [121].

5.3.2 Malalties de la lent

Una de les malalties més freqüents que afecten a la lent són les cataractes, caracteritzades per l'opacitat progressiva del cristal·lí. Tot i que poden tenir un origen congènit, en la majoria dels casos es troben associades a l'envelliment. Hi ha tres tipus de cataractes diferents segons on apareix l'opacitat: –Cataracta subcapsular posterior, en que les cèl·lules epitelials posteriors de la lent migren a l'equador; –Cataracta Morgagniana, en que s'acumula fluid eosinofílic entre les cèl·lules de la lent, el que porta al desplaçament i la degeneració de les cèl·lules de la vora; i –Cataracta d'anell de Soemmering, caracteritzada per presentar una forma de *donut* a causa de la pèrdua del nucli de la lent i la major part del còrtex anterior i posterior, a més de presentar cèl·lules proliferatives epitelials a la perifèria i a l'equador de la lent (Pernick N. Lens and vitreous: cataract. PathologyOutlines.com website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/eyelenscataract.html>).

Caldria esperar que a la lent no hi hagués el problema acusat de l'estrès oxidatiu, ja que presenta una baixa taxa metabòlica i hi ha pocs mitocondris però, de fet, és el teixit que probablement pateix més OS en el cos. El major causant és la fotooxidació produïda per l'exposició constant a la llum, que no solament danya el DNA sinó que oxida els grups tiol de la lent a ponts disulfur, tot resultant en l'agregació proteica que provoca cataractes. A la lent, la protecció a la llum UV es basa en un grup de molècules sintetitzades a partir del triptòfan, essent el principal protector el glucòsid 3-hidroxiquinurènic. Aquest glucòsid és danyat al ser irradiat pels rajos UV i és destoxificat per agents antioxidants, que protegeixen a les cèl·lules de la lent del

dany. Aquesta protecció és important, atès que el cristal·lí no regenera. Aquests filtres moleculars que protegeixen a la lent de la radiació UV, no són específics solament de la lent humana sinó també dels primats [128].

La proteïna α -cristal·lina present a la lent no té una paper merament estructural sinó que actua com a xaperona i controla el plegament de les proteïnes. La lent es troba en un medi aquós, pel que el mal plegament de les proteïnes pot comportar la seva agregació i fer que la lent es torni opaca. Canvis en la composició proteica així com en les modificacions post-traduccionals de les proteïnes, com ara la glicosilació, oxidació o desamidació poden provocar l'aparició de cataractes [121], [129].

La peroxidació dels lípids de les membranes cel·lulars de la lent també és un factor que promou l'aparició de cataractes, ja que molts efectes de l'OS es deuen a canvis en la composició lipídica que actuen com a segons missatgers tòxics [94], [121], [130].

5.3.3 Malalties de la retina

El glaucoma

L'estrès oxidatiu danya el DNA de la xarxa trabecular (TM). La TM, una xarxa de teixits esponjosos situats al voltant de la base de la còrnia prop del cos ciliar, és la responsable del drenatge de l'humor aquós des de la cambra anterior de l'ull. L'OS pot causar canvis crònics en l'humor aquós i vitri. A més, en pacients afectats per glaucoma s'ha trobat un increment en l'expressió de NOS i nitrosina a la TM [94].

El glaucoma no solament afecta a la TM, sinó que és una retinopatia òptica, en la que es veu afectat el nervi òptic i la pèrdua de cèl·lules ganglionars. El dany axonal causat per l'increment de la pressió ocular que desemboca en l'apoptosi de les cèl·lules ganglionar provoca la generació de ROS, que llavors contribueixen a la mort de cèl·lules ganglionars que no havien estat danyades per la pressió ocular. Les ROS poden actuar com a molècules de senyalització cel·lular, el que comporta una disfunció de les cèl·lules de la glia i una estimulació de la presentació d'antígens.

Tanmateix, la pressió intraocular és el factor més important en la mort de les cèl·lules ganglionars en el glaucoma, encara que factors vasculars que promouen una reducció en la perfusió del disc òptic –el que es tradueix en hipòxia– activen l'expressió de molts gens tant a la retina com en el nervi òptic que, juntament amb les ROS, afavoreixen la progressió del glaucoma [121].

Degeneració macular associada a l'edat (AMD)

L'AMD és una de les principals causes de ceguera als països desenvolupats, caracteritzada per la pèrdua de cèl·lules de l'RPE i fotoreceptores a la zona de la màcula. L'AMD es caracteritza per la presència de deposicions extracel·lulars, conegudes com a druses, entre la membrana de Bruch i l'RPE [131]. L'RPE és molt propens a presentar ROS degut a l'elevada taxa metabòlica. A més, les cèl·lules també estan exposades a les ROS com a conseqüència de l'acumulació d'ions de ferro, l'exposició a la llum solar o al fum del tabac. El pigment macular format per dos dihidroxicarotenoids, la luteïna i la zexantina, és una barrera natural que protegeix a la màcula enfront de l'OS [94]. Sovint, en estadis inicials d'AMD s'observa dany l'RPE, però no s'ha pogut establir un clar vincle entre el dany directe de l'RPE causat per l'estrès oxidatiu amb la progressió de l'AMD [132], tot i haver casos en que s'han trobat productes finals de glicació avançada (AGEs) i adductes de carboxietilpirrol produïts per l'oxidació d'àcids grassos a les puntes dels fotoreceptors, a les druses [131]. A més, les cèl·lules de l'RPE danyades per les ROS alliberen citocines i quimiocines que recluten i activen a les cèl·lules dendrítiques de la coroide; aquestes amplifiquen el procés inflamatori mitjançant el contacte cèl·lula-cèl·lula, el que condueix a un estat crònic d'inflamació que es considera clau en la patogenicitat de l'AMD [133].

Retinosi Pigmentària (RP)

L'RP té un origen genètic però l'OS juga un paper en la seva patogènesi. En els últims anys s'ha demostrat el tractament amb antioxidants preserva durant més temps la funció dels cons i, a més, es perllonga la supervivència dels bastons.

Aquests estudis demostraren que l'OS provinent del metabolisme, com ara la peroxidació lipídica o el dany al DNA, així com provinent de factors exògens, com ara la llum, contribueix a la mort dels fotoreceptors. A més, la pròpia mort dels bastons causa que hi hagi una major quantitat d'oxigen al teixit, el que progressivament produeix dany oxidatiu i afavoreix la mort dels cons. Finalment, les NOX tenen un paper essencial en l'estrès oxidatiu que promou la mort dels cons [94], [134], [135].

Retinopatia diabètica (DR)

La DR és una de les complicacions més comuns de la Diabetis *mellitus*. No s'ha determinat completament el mecanisme pel qual nivells elevats de glucosa causen ceguera. La hiperglicèmia crònica permet una sèrie de canvis bioquímics entre els que trobem l'activació de la proteïna cinasa C, l'acumulació de poliols a través de la via de la reductasa d'aldoses, un increment en la producció d'AGEs i la sobreproducció de radicals lliures. Aquests radicals lliures es generen a partir de reaccions d'auto-oxidació de sucres i adductes de sucres conjugats a proteïnes. Aquests canvis metabòlics incrementen les citocines pro-inflamatòries, les quimiocines i altres mediadors de la resposta inflamatòria, que estimulen un influx de leucòcits i alteren la permeabilitat vascular, el que en conjunt afavoreix la degeneració de la retina [94], [133].

Retinopatia òptica de Leber (LHON)

La LHON és potser l'exemple més clar de retinopatia associada a l'estrès oxidatiu. Aquesta malaltia es caracteritza per la degeneració de les cèl·lules ganglionars causada per la mutació en algun dels gens mitocondrials que codifiquen per la NADH deshidrogenasa de la cadena de fosforilació oxidativa als mitocondris. Aquestes mutacions provoquen un decrement en la síntesi d'ATP i incrementen l'estrès oxidatiu. L'apoptosi de les cèl·lules ganglionars està relacionada amb un transport defectuós de glutamat i un increment en les ROS causat per la disrupció de la cadena de transferència d'electrons mitocondrial [121], [136].

6. Models animals, cèl·lules humanes pluripotents induïdes (hiPSCs) i estratègies de teràpia

Les distròfies de retina no són exclusives dels humans i han estat descrites en altres mamífers. En aquesta Tesi ens centrarem en els models animals que s'han descrit per a l'RP, tant models animals naturals que s'han generat espontàniament a la naturalesa, com models animals generats gràcies a la manipulació genètica, el que permet l'estudi de qualsevol mutació i la seva patogenicitat, així com establir noves estratègies terapèutiques [137].

Els models animals per a estudiar la retina poden ser molt diversos, des del peix zebra i el gripau africà *Xenopus*, fins a rates i ratolins, gossos i micos. El model animal més utilitzat és el ratolí, ja que és un organisme fàcilment manipulable genèticament, permet l'estudi en grans grups i, a més, té una esperança de vida d'aproximadament dos anys, pel que es pot estudiar amb facilitat la neurodegeneració de la retina, un procés que en humans triga dècades en produir-se. Malgrat que molts dels gens murins tenen el seu homòleg en humans, hi ha diferències genètiques i metabòliques remarcables entre humans i ratolins, tanmateix el model animal és una eina d'aproximació que ens ajuda a entendre millor el comportament o la funció dels gens i les vies de senyalització.

6.1 Models animals murins d'RP

A la naturalesa s'han identificat soques de ratolins mutants que presenten degeneració de la retina i s'ha aprofitat per estudiar-ne la malaltia en funció del gen que tingueren mutat. D'altra banda, gràcies als avenços de l'enginyeria genètica s'han pogut generar models animals de manera artificial. Aquestes tècniques han permès generar models delecionant el gen sencer o trencant-ne la pauta de lectura, per tal d'eliminar l'expressió del gen i generar el que es coneix com a *knockout* (KO). En el cas que el que interessa és estudiar l'efecte de mutacions concretes, l'enginyeria genètica permet introduir mutacions puntuals, per exemple, en els models animals

knockin (KI). A la Taula 3 es mostra el llistat de ratolins transgènics naturals de degeneració retinal i ratolins generats per estratègies d'enginyeria genètica, essent la diana, els gens causant d'RP fins al moment.

Taula 3. Models murins naturals de degeneració retinals i models murins transgènics de gens que causen RP.

Models murins naturals de degeneració retinal			
Gen	Soca	Mutació	Fenotip
<i>Agtpbp1</i>	pcd	-	Als 18-25 dies comencen a aparèixer cèl·lules picnòtiques als fotoreceptors, el que causa la seva degeneració; al cap d'un any, els fotoreceptors han degenerat completament [138].
<i>Cacna1f</i>	nob2	Inserció d'un element transposable a l'exó 2	Anormalitats funcionals i estructurals de la retina [19].
<i>Cep290</i>	rd16	Deleció en pauta de 298 aa als exons 35-39	Degeneració molt ràpida, a les sis setmanes ja no hi ha resposta electrofisiològica [139].
<i>Cln6</i>	nclf	Inserció d'1 bp a l'exó 4, que genera canvi de pauta de lectura a p.P102	Degeneració de la ONL a partir dels quatre mesos; als nou mesos la retina està completament atrofiada [138], [140], [141].
<i>Cln8</i>	mnd	Inserció d'1 bp	Degeneració retina severa a partir de P15, amb una greu afectació a la capa dels fotoreceptors [142].
<i>Cnga3</i>	cpfl5	T165A	Degeneració dels cons amb migració dels cossos del cons a l'OPL [143]
<i>Col2a1</i>	sedc	R1417C	Retinòsquisi [144].
<i>Crb1</i>	rd8	Deleció d'1 bp a l'exó 9 (nt 3481)	Degeneració progressiva i lenta de la retina. L'electrofisiologia es manté estable un any [139], [145].
<i>Dcc</i>	rd14	-	Degeneració lenta de la retina amb aparició de punts blancs [19].
<i>Gnat1</i>	rd17	Deleció de 57 bp a l'intró 4 del gen transducina α , altera lloc donador d' <i>splicing</i> i causa truncament prematur proteïna	Degeneració lenta de la retina i resposta electrofisiològica pobre [146].
<i>Gnat2</i>	cpfl3	Inserció de 4 bp a l'exó 7, genera un canvi de pauta de lectura	Model de degeneració de la retina amb electrofisiologia indetectable a les 9 setmanes. Model d'acromatòpsia [147].

<i>Gnb1</i>	rd4	Inversió en el cromosoma 4	Letal en homozigosi. En heterozigosi, hi ha una degeneració de la ONL als 10 dies, que desapareix a les 6 setmanes completament [148].
<i>Grm6</i>	nob3	Canvi de C per T a l'intró 1 generant un nou donador d' <i>splicing</i> , inserta 65 nt entre l'exó 1 i 2	Anormalitats funcionals i estructurals de la retina [19].
<i>Gucy2e</i>	cpfl9	Deleció de 25 bp a l'exó 9	A les tres setmanes, la resposta electrofisiològica dels cons es veu molt afectada, i als 11 mesos, els bastons també es veuen afectats [149].
<i>Hcn1</i>	cpfl6	-	Degeneració de la retina d'inici precoç, però de lenta progressió, on primer degeneren els cons i, posteriorment, els bastons [150].
<i>Lpcat1</i>	rd11	Inserció d'1 bp i canvi de pauta de lectura	Ràpida degeneració dels fotoreceptors, primer dels bastons, seguit dels cons [151].
<i>Mdm1</i>	arrd2	R399X	Degeneració lenta de la retina, als 14 mesos presenten atenuació dels vasos sanguinis i atròfia de l'RPE; als 24 mesos els fotoreceptors han degenerat completament [152].
<i>Mfrp</i>	rd6	Deleció de l'exó 4	Degeneració lenta i progressiva dels cons i dels bastons. Presenten una aparició de dipòsits subretinals al llarg de la retina [153].
<i>Mitf</i>	vutiligo	D222N	Degeneració progressiva de la retina amb una gradual despigmentació [138], [154].
<i>Nr2e3</i>	rd7	Inserció d'un retrotransposó LINE (L1) a l'exó 5	Lenta degeneració de la retina, tot i que presenten un increment en la quantitat de cons que expressen S-opsina. S'assembla a ESCS en humans [139], [155].
<i>Pax2</i>	krd	Deleció gran al cromosoma 9	Reducció en el nombre de cèl·lules de la retina [156].
<i>Pde6b</i>	rd1	Y347X	Degeneració dels bastons durant les primeres setmanes de vida, tot i que els cons també acaben degenerant [157].
<i>Pde6b</i>	rd10	R560C	Degeneració de la retina, a partir de les 3 setmanes es detecten alteracions i als dos mesos ja no es detecta activitat electrofisiològica [138], [139].
<i>Pde6c</i>	cpfl1	Inserció de 116 bp entre els exons 4 i 5 i deleció d'1 bp a l'intró 7	Degeneració completa dels cons des de les 3 setmanes, però no dels bastons. S'assembla molt a l'acromatòpsia humana [138], [158].

<i>Prom</i>	rd19	Transversió d'una A>T que genera un codó d'aturada	Vasos sanguinis atenuats a les 2 setmanes i el 20-30% dels fotoreceptors degenerats a les tres setmanes. La degeneració és lenta [19].
<i>Prph2</i>	rd2	Inserció de 9,2 Kb a l'exó 2	Degeneració lenta dels fotoreceptors a partir de les 7 setmanes de vida. A l'any, ja no tenen ONL [138], [159].
<i>Rd3</i>	rd3	R107X	Degeneració severa de la capa dels fotoreceptors a partir de la segona setmana; a partir de la vuitena setmana, els fotoreceptors han desaparegut, s'assembla molt a la LCA [160].
<i>Rpe65</i>	rd12	R44X	Degeneració retinal a partir dels cinc mesos; amb els temps, l'electrofisiologia es veu atenuada [161].
<i>Rpgr-ORF15</i>	rd9	Duplicació de 32 bp a l'ORF-15 que genera un codó d'aturada prematur	Degeneració progressiva de la retina interna, així com dels cons i dels bastons, a partir de les 6 setmanes. S'assembla molt a l'RP [162].
<i>Rpl24</i>	bst	Deleció de 4 bp al primer intró, que causa la seva retenció	Atròfia òptica [19].
<i>Tub</i>	rd5	Mutació G>T a la posició 18.626 del gen, trenca lloc donador d' <i>splicing</i> , trunca 44 aa proteïna	Als cinc mesos hi ha una atenuació dels vasos sanguinis de la retina i pèrdua de l'RPE; a partir dels 6 mesos, la retina degenera juntament amb una pèrdua d'audició [138], [139].
<i>Tulp1</i>	rd18	-	Degeneració de la retina [19].
>10 gens candidats	nr	Cromosoma 8	Degeneració ràpida dels fotoreceptors fins a P13-P19; posteriorment, és més gradual [163], [164].
-	Cpfl2	-	Degeneració dels cons als 4 mesos i dels bastons als 8 mesos; model d'acromatòpsia i distròfia progressiva dels cons, a més presenten rosetes a la retina central [165].
-	cpfl4	-	Degeneració dels cons als 4 mesos i dels bastons als 8 mesos, model d'acromatòpsia i distròfia progressiva dels cons [166].
-	cpfl7	-	Degeneració retinal a partir dels tres mesos [167].
-	rd15	-	Degeneració de la retina amb distròfia de la OPL [168].

Models murins artificials dels gens d'RP		
Gen	Transgènic	Fenotip
<i>Abca4</i>	KO	Disrupció del gen <i>Abcr</i> . Els ratolins presenten retard en l'adaptació a la foscor, increment de <i>all-trans-retinaldehid</i> i elevats nivells de fosfatidiletanolamida als OS [169].
<i>Adipor1</i>	KO	Afectació severa de la retina i de la visió [170].
<i>Agbl5</i>	KO	Afectació en l'espermatogènesi, compromet la fertilitat masculina [171].
<i>Ahr</i>	KO	Els ratolins presenten infertilitat, anormalitats en el fetge, i defectes cardiovasculars; les retines no presenten major afectació, tot i que a nivell ocular tenen nistagmus [172].
<i>Arl2bp</i>	KO	Decrement de la funció dels fotoreceptors als 16 dies, a més d'estar altament desorganitzats [173].
<i>Arl3</i>	KO	Mal desenvolupament de les cèl·lules fotoreceptores de l'OS, seguit d'una ràpida degeneració [174].
<i>Arl6</i>	KO	Model de BBS, els ratolins presenten degeneració de la retina, entre altres trets fenotípics [175], [176].
<i>Bbs2</i>	KO	Degeneració de la retina, obesitat i cists renals [177].
<i>Best 1</i>	KI	Acumulació de lipofuscina a l'RPE [178].
<i>Ca4</i>	KO	Són ratolins menys viables i neixen menys femelles [179].
<i>Cerkl</i>	KD (deleció exó 5)	Cap fenotip aparent a la retina respecte a la producció de Cer i Cer-1-P [180].
	KD (deleció promotor i exó 1)	Alteració en l'electrofisiologia de les cèl·lules ganglionars [181].
<i>Clrn1</i>	KO	No desenvolupen un fenotip de retina, el fenotip que s'observa està associat a la còclea [182].
<i>C2orf71</i>	KO	Degeneració retinal ràpida i severa [183].
<i>Cngb1</i>	KO	Degeneració progressiva i lenta de la retina causada per mort cel·lular i gliosi [184].
<i>Crb1</i>	KI	Degeneració de la retina a partir de 18 mesos [185].
	KO	Desorganització de la retina i severa degeneració, model de LCA [185].
<i>Crx</i>	KI	Degeneració de la retina, segons la mutació introduïda i la zigosi, la progressió és més o menys ràpida [186].
	KO	Degeneració molt severa de la retina a estadis molt primerencs [187].
<i>Dhdds</i>	KI	Als 3 mesos d'edat els ratolins presenten degeneració retinal, amb una reducció dels OS i del gruix de la ONL [188].
	KO	El KO total és letal, pel que es va generar el KO condicional, on sol mancava el gen als fotoreceptors [189].
<i>Fam161a</i>	KO	Degeneració progressiva de la retina i pèrdua de la visió [190].
<i>Fscn2</i>	KO	Degeneració de la retina a les 24 setmanes [191].

<i>Guca1b</i>	KO	Els bastons del model són més fotosensibles que els dels animals controls i triguen més a recuperar-se després de rebre llum [192].
<i>Hgsnat</i>	KO	No presenta cap fenotip de retina. Estudis sobre teixit neuronal que presenta defectes mitocondrials i inflamació [193].
<i>Idh3b</i>	KO/KI	El KO és letal. El KI presenta degeneració retinal a edat avançada del ratolí; l'heterozigot compost té una degeneració més severa que el KI [194].
<i>Ifi172</i>	KO	Degeneració ràpida de la retina, al mes els fotoreceptors ja no responen electrofisiològicament als dos mesos, l'ONL ha desaparegut per complet [195].
<i>Impdh1</i>	KO	Degeneració progressiva de la retina, la resposta electrofisiològica encara és normal als 12 mesos [196].
<i>Impg1</i>	KO	No mostra defectes retinals estructurals ni funcionals [197].
<i>Impg2</i>	KO	Deslocalització de les opsines, interacció defectuosa entre la retina i l'RPE i degeneració de la resposta electrofisiològica a partir dels 8 mesos [197].
<i>Lrat</i>	KO	Els OS dels fotoreceptors presenten un 35% d'escurçament i la resposta electrofisiològica es veu reduïda a edat jove [198].
<i>Mertk</i>	KO	Degeneració ràpida i progressiva de la retina amb absència de fagosomes a l'RPE [199].
<i>Neurod1</i>	KO	El KO és letal. Es genera un <i>knockout</i> condicional en el que s'observa una completa degeneració dels fotoreceptors als quatre mesos [200].
<i>Nr2e3</i>	KO	Retines amb menys nombre de nuclis a la ONL i formació de rosetes, també excés de cons, essent un model de ESCS [201].
<i>Nrl</i>	KO	Retines amb absència completa de bastons [202].
<i>Ofd1</i>	KO	Els ratolins presenten malformacions severes [203].
<i>Pde6a</i>	ENU	Degeneració dels fotoreceptors [204].
<i>Pde6b</i>	KO	Degeneració severa de la retina a les tres setmanes de vida [205].
<i>Pde6g</i>	KI	Model de nictalopatia estacionària [206].
	KO	Degeneració severa i ràpida de la retina amb manca de bastons [207].
<i>Pomgnt1</i>	KO	Desenvolupament de l'ull anormal, amb defectes a la retina i el nervi òptic [208].
<i>Prcd</i>	KO	Degeneració lenta i progressiva de la retina a partir de les 20 setmanes [209].
<i>Prpf3</i>	KI	Els ratolins mostren alteracions en l'RPE [210].
	KO	La deleció del gen és letal en homozigosi. Els heterozigots no mostren alteracions en els fotoreceptors [211].
<i>Prpf8</i>	KI	Els ratolins mostren alteracions en l'RPE [210].
<i>Prpf31</i>	KI	En homozigosi la mutació introduïda és letal. En heterozigosi, els ratolins mostren alteracions en l'RPE [210].
	KO	Els ratolins mostren alteracions en l'RPE [210].
<i>Rbp3</i>	KO	Degeneració de la retina [212].

<i>Rdh12</i>	KO	Els ratolins no presenten un fenotip retinal aparent [213].
<i>Reep6</i>	KO	Degeneració retinal, increment en el nombre de mitocondris i expansió del reticle endoplasmàtic [214].
<i>Rgr</i>	KO	Afectació molt subtil en la resposta electrofisiològica, diferències en la capacitat adaptativa a la foscor [215].
<i>Rho</i>	KI	La introducció de la mutació P23H permet que els bastons es desenvolupin normalment, però els OSs són més curts. Hi ha una degeneració progressiva dels fotoreceptors [216].
	KI	Degeneració severa de la retina quan presenten la mutació P347S [217].
	KI	Introducció de GFP al locus de <i>Rho</i> causa una degeneració dels discs membranosos dels fotoreceptors [218].
	KI	La mutació Q344X causa que la transducció sigui lenta, com també és lenta la degeneració de la retina [219].
	KO	L'estructura de la retina es preserva intacta, tot i que els bastons són totalment no funcionals [220].
<i>Rlbp1</i>	KO	No hi ha degeneració de la retina, tot i que l'adaptació a la foscor és més lenta [221].
<i>Rom1</i>	KO	Els discs dels fotoreceptors presenten una elevada desorganització i moren lentament [222].
<i>Rp1</i>	KI	Q662X causa una degeneració de la retina caracteritzada per la desorganització dels fotoreceptors [223].
	KO	A partir del dia 7 les retines presenten alteracions [224].
<i>Rp111</i>	KO	Degeneració suau i lenta dels fotoreceptors [225].
<i>Rp2</i>	KO	Degeneració molt lenta de la retina amb cap alteració severa [226].
<i>Rpe65</i>	KI	R91W presenten molta dificultat per recuperar-se de l'adaptació a la foscor; preserven l'estructura de la retina, tot i que s'hi acumulen retinil èsters [227].
	KO	Degeneració progressiva de la retina [228].
<i>Rpgr</i>	KO	Degeneració molt subtil dels fotoreceptors [229].
<i>Sag</i>	KO	Les retines són més fotosensibles i la resposta electrofisiològica és normal pels cons, però anormal pels bastons [230].
<i>Sema4a</i>	KO	A les 14 setmanes els ratolins presenten una degeneració severa de la retina i atenuació dels vasos sanguinis [231].
<i>Slc7a14</i>	KO	Degeneració de la retina amb una resposta electrofisiològica anormal [232].
<i>Snrnp200</i>	KO	Letal embrionari en homozigosi [233].
<i>Spata7</i>	KO	Degeneració de la retina a partir del dia 15 de vida, amb desorganització dels OSs [234].
<i>Ttc8</i>	KO	Degeneració molt severa als 25 dies, però no progressa amb el temps [235].
<i>Topors</i>	KO	Elevada taxa de mortalitat perinatal i transformacions malignes en molts teixits [236].
<i>Tulp1</i>	KO	Degeneració molt ràpida de la retina causada per una mort accelerada dels fotoreceptors [237].

<i>Ush2a</i>	KO	Degeneració progressiva de la retina acompanyada d'una sordesa moderada que no progressa [238].
--------------	----	---

KO: *Knockout*, **KI:** *Knockin*, **KD:** *Knockdown*, **ENU:** N-etil-N-nitrosurea, **Bp:** parell de bases, **nt:** nucleòtid, **aa:** aminoàcid. Els buits a la taula indiquen que no es coneix el gen o bé la mutació. Informació extreta de *The Jackson Laboratory* (<https://www.jax.org/>), *Mouse Genome Informatics* (MGI) (<http://www.informatics.jax.org/>) i Veleri, *et. al.*, *Disease Models and Mechanisms*, 2015.

Actualment, gràcies als avenços en l'enginyeria genètica i al descobriment de CRISPR/Cas9 i les seves aplicacions, es poden generar models animals de quasi qualsevol gen, molt fàcilment i a un cost raonable. Dels gens causants d'RP que no es troben a la Taula 3, segurament existeix algun altre model generat per cases comercials, però cap grup de científics l'ha utilitzat per estudiar-ne el fenotip. Com es pot observar en alguns casos concrets que s'ha generat el model animal per un gen específic, no s'ha descrit cap fenotip de retina, o bé no s'ha estudiat en aquell cas concret, com és el cas d'*Aghl5*, en el que els animals presenten problemes en l'espermatogènesi, la qual cosa no significa que no tinguin un problema de degeneració de la retina, sinó que probablement no hagi estat de l'interès del grup que l'ha generat i no l'ha estudiat. Pel que fa a les semblances entre la malaltia humana i el model de ratolí, trobem que segons la mutació puntual o el *knockout* generat tenen un fenotip semblant tot i que, de vegades, és notablement més sever o més moderat. Malgrat aquestes diferències, els models animals són una eina d'aproximació molt útil que permet estudiar en profunditat, no solament l'efecte d'una mutació puntual sinó la funció o via de senyalització en que està implicat un gen.

Respecte els models murins de *Cerkl* –el gen d'interès en aquesta Tesi– segons com s'hagin generat, o bé no s'ha estudiat a fons la retina, o bé presenten un fenotip molt lleu, amb els potencials oscil·latoris de les cèl·lules ganglionars lleugerament alterats i una davallada en el contingut lipídic de la retina. Això es deu a que, com ja hem esmentat anteriorment, tot i haver deletat una part del gen no s'ha aconseguit fer

un *knockout* total, ja que *Cerkl* presenta una elevada taxa d'*splicing* alternatiu i pot generar moltes de les isoformes funcionals [180], [181].

D'altra banda, s'han generat models de *cerkl* a peix zebra. Mentre que el *knockdown* generat amb *morpholinos* va mostrar una alteració major en el desenvolupament dels fotoreceptors i una desorganització de l'estructura de la retina en general [239], el *knockout* generat amb TALENS ha demostrat que la manca de *cerkl* provoca problemes en la fagocitosi de l'RPE, en l'organització dels OSs i alteracions de l'autofàgia a la retina [240], [241].

Estudis en cèl·lules han permès determinar que CERKL podria tenir un paper important en la resposta a l'estrès cel·lular i la resiliència enfront d'aquest estímul [41]. A desgrat de tots aquests intents per aportar llum a la funció de *CERKL*, la manca d'un model murí, que no expressi el gen i que presenti un fenotip, així com la poca proximitat entre humans i peixos zebra, fa que encara estem lluny de dilucidar per complet la funció de *Cerkl* i la via de senyalització en la que està implicat, com tampoc coneixem encara per què mutacions en aquest gen causen RP o CRD.

L'escassa caracterització funcional del gen *CERKL* i la manca d'un model que pugui reproduir el fenotip humà posa de manifest la necessitat de generar un nou model que ens permeti abordar l'estudi d'aquest gen, per tal d'atribuir-ne una funció i assignar-li una via de senyalització, i així, determinar possibles dianes terapèutiques que aportin esperança al pacients que pateixen RP o CRD causada per mutacions a *CERKL*.

6.2 Nous models: Cèl·lules humanes pluripotents induïdes (hiPSCs)

Les cèl·lules iPSCs són cèl·lules adultes que han estat reprogramades a un estat semblant al de les cèl·lules mare embrionàries. Per aconseguir-ho, han estat forçades a expressar gens i factors importants per redefinir-se com a cèl·lules mare. L'any 2006 es van generar per primera vegada iPSCs de ratolí i un any després, l'any 2007,

es van generar les iPSCs humanes, essent capaces de generar característiques cel·lulars de les tres capes germinals (NIH Stem Cell Information Home Page. <https://stemcells.nih.gov/info/basics/6.htm>).

Les hiPSCs són una eina molt potent que permet la diferenciació dirigida a la majoria de tipus cel·lulars, incloent-hi els de la retina [242]. Inicialment, les cèl·lules que es van utilitzar van ser de fibroblasts adults, ja que aquest tipus cel·lular és relativament accessible via una biòpsia a la pell, mínimament invasiva. Actualment, hi ha casos de producció d'hiPSCs d'altres fonts, a partir de cèl·lules de la sang o de l'orina, que requereixen procediments menys invasius o inclús no invasius. No hi ha un consens del tipus cel·lular somàtic més adequat per produir hiPSCs, per això, per a decidir quin tipus cel·lular utilitzar, cal tenir en compte l'invasivitat del procediment per obtenir les cèl·lules, la plasticitat de les cèl·lules mare resultants i la capacitat per rediferenciar-se, en el cas que ens ocupa, a varis tipus cel·lulars de la retina [243]. A diferència dels cultius primaris, les hiPSCs estan immortalitzades de manera natural, ja que expressen telomerasa amb les característiques de cèl·lules mare embrionàries, pel que poden ser mantingudes en cultiu de manera indefinida. Generar una línia d'hiPSCs consisteix en una sèrie de passos i decisions claus, com ara el tipus de cèl·lula somàtica de la que es partirà, l'estratègia de reprogramació i establir un protocol concret de diferenciació. És molt important el tipus de cèl·lula somàtica que s'utilitza, ja que tenen memòria epigenètica, el que pot afectar a la capacitat de diferenciació [244], [245].

Un dels majors impediments per entendre les malalties neurodegeneratives, com ara l'RP, és la poca accessibilitat al teixit afectat, en aquest cas, la retina [246]. Fins fa relativament poc temps, els models d'estudi de malalties humanes han sigut els models animals, principalment els murins, que com ja s'ha esmentat amb anterioritat, presenten diferències respecte els humans, essent en alguns casos difícil mimetitzar el fenotip dels pacients. En el cas de la retina, els ratolins són animals nocturns i presenten una major proporció de bastons i els manca la fòvea, a més

d'haver-hi diferències segons el fons genètic. D'altra banda, les mostres *post mortem* humanes són molt difícils d'aconseguir actualment, i en el cas de la retina, al tractar-se d'un teixit neural, és dels primers en que les cèl·lules moren, la qual cosa dificulta el seu estudi, a més de l'escassetat de mostres per a dur a terme experiments amb replicats [244].

Per aquestes raons, les hiPSCs són una eina molt valuosa per estudiar la patofisiologia d'una malaltia com l'RP, ja que es poden obtenir cèl·lules somàtiques d'un pacient afectat i d'un control, i reprogramar-les perquè derivin a cèl·lules de la retina. Endemés, les hiPSCs, tenen la capacitat de reorganitzar-se i formar organoides, donant lloc a estructures estratificades que simulen el teixit i òrgan en què s'estan diferenciant [244], [246].

Els agregats homogenis d'hiPSCs s'organitzen espontàniament en organoides tridimensionals de retina que presenten totes les capes i cèl·lules presents a la retina neural.

Aquests nous models d'estudi no solament permeten estudiar el desenvolupament de la retina i l'evolució de les seves malalties, sinó provar de manera relativament ràpida noves teràpies específiques de pacient (medicina personalitzada), sobretot en aquells casos que el model animal no recapitula el fenotip de la malaltia, a més de ser una font pel reemplaçament cel·lular i d'òrgans [243], [244], [247].

En resum, les hiPSCs són un recurs innovador i il·limitat que permet disseccionar l'RP, segons la mutació del pacient, a nivell molecular, cel·lular i funcional. A més, els organoides poden ser generats en condicions *xeno-free* i *free-feeder* el que permet que es puguin criopreservar sense perdre les seves característiques fenotípiques, el que és clau per fer possibles transplants autòlegs pel tractament de la degeneració retinal en el futur [244], [247]–[249].

6.3 Estratègies terapèutiques per a malalties degeneratives de la retina

Durant dècades, les distròfies de retina hereditàries (IRDs) s'han considerat medicament intractables, però després d'un llarg camí de progrés científic i clínic, s'han iniciat assajos clínics de teràpia gènica i cel·lular, aportant esperança a tots els pacients, fins ara orfes de cap tractament realment efectiu [250], [251].

Fins arribar a trobar una cura o implementar un tractament comercial per les IRDs, cal passar per una prova de concepte, assajos pre-clínic i clínics, resultats eficaços i comercialització del producte [250]. Val a dir que el tractament de les IRDs, com per a qualsevol malaltia genètica hereditària, és personalitzat, depèn del gen i de la mutació, pel que per una mateixa malaltia s'hauran de dissenyar diferents teràpies segons el gen i la mutació que presentin els pacients. A la Taula 4, s'han recopilat els assajos clínics que s'estan duent a terme actualment [250], [251].

Taula 4. Assajos clínics d'IRDs classificats segons el tipus de teràpia. (Informació extreta de I. Vázquez-Domínguez, *et al.*, *Genes* 2019, A. V. Garafalo, *et al.*, *Progress in Retinal and Eye Research*, 2020 i <https://clinicaltrials.gov/>).

Assajos clínics amb teràpies gèniques de DNA			
Gen	Molècula terapèutica	ID de l'assaig clínic	Estat
Addició gènica			
<i>ABCA4</i>	SAR422459	NCT01367444	Reclutant (Fase I/II)
	SAR422459	NCT01736592	Participant per invitació (Fase I/II)
<i>CHM</i>	AAV2-hCHM	NCT02341807	Actiu (Fase I/II)
	AAV2-REP1	NCT03496012	Reclutant (Fase III)
	AAV2-REP1	NCT03507686	Reclutant (Fase II)
	AAV2-REP1	NCT02407678	Actiu (Fase II)
	rAAV2.REP1	NCT02671539	Actiu (Fase II)
	rAAV2.REP1	NCT02077361	Completat
	rAAV2.REP1	NCT01461213	Completat
	AAV2-REP1	NCT03584165	Participant per invitació
	AAV2-REP1	NCT02553135	Completat
<i>CNGA3</i>	AGTC-402	NCT02935517	Reclutant (Fase I/II)

	AAV2/8-hG1.7p.coCNGA3	NCT03758404	Reclutant (Fase I/II)
	rAAV.hCNGA3	NCT02610582	Actiu (Fase I/II)
CNGB3	rAAV2tYF-PR1.7-hCNGB3	NCT02599922	Reclutant (Fase I/II)
	AAV2/8-hCARp.hCNGB3	NCT03001310	Reclutant (Fase I/II)
	AAV-CNGB3	NCT03278873	Reclutant (Fase I/II)
MERTK	rAAV2-VMD2-hMERTK	NCT01482195	Reclutant (Fase I)
MYO7A	UshStat	NCT02065011	Participant per invitació (Fase I/II)
PDE6B	AAV2/5-hPDE6B	NCT03328130	Reclutant (Fase I/II)
RPE65	AAV OPTIREP	NCT02946879	Reclutant
	rAAV2-CBSB-hRPE65	NCT00481546	Actiu (Fase I)
	AAV2-hRPE65v2-	NCT00516477	Actiu (Fase I)
	AAV2-hRPE65v2	NCT00999609	Actiu (Fase III)
	AAV2-hRPE65v2	NCT01208389	Actiu (Fase I/II)
	AAV2-hRPE65v2	NCT03602820	Actiu
	tgAAG76 (rAAV2/2.hRPE65p.hRPE65)	NCT00643747	Completat
	rAAV2-CB-hRPE65	NCT00749957	Completat
	rAAV2-hRPE65	NCT00821340	Completat
	rAAV2/4.hRPE65	NCT01496040	Completat
	AAV RPE65	NCT02781480	Completat
RLBP1	CPK850	NCT03374657	Reclutant (Fase I/II)
RPGR	AAV8-RPGR	NCT03116113	Reclutant (Fase I/II)
	AAV2/5-hRKp.RPGR	NCT03252847	Reclutant (Fase I/II)
	rAAV2tYF-GRK1-RPGR	NCT03316560	Reclutant (Fase I/II)
RS1	AAV8-scRS/IRBPhRS	NCT02317887	Reclutant
	rAAV2tYF-CB-hRS1	NCT02416622	Actiu
Edició gènica			
CEP290	EDIT-101 (AGN-151587)	NCT03872479	Reclutant
Optogenètica			
RP avançada	RST-001	NCT02556736	Reclutant (Fase I/II)
RP no-sindròmica	GS030-DP	NCT03326336	Reclutant

Assajos clínics usant teràpies d'RNA			
Gen	Molècula terapèutica	ID de l'assaig clínic	Estat
<i>CEP290</i>	QR-110	NCT03140969	Actiu
	QR-110	NCT03913130	Reclutant
	QR-110	NCT03913143	Reclutant
<i>USH2A</i>	QR-421a	NCT03780257	Reclutant
Assajos clínics usant teràpies farmacològiques			
Gen	Molècula terapèutica	ID de l'assaig clínic	Estat
<i>ABCA4</i>	ALK-001	NCT02402660	Reclutant
	Zimura	NCT03364153	Actiu
	Emuxustat	NCT03772665	Reclutant
	Emuxustat	NCT03033108	Completat
<i>RPE65</i>	QLT091001	NCT01014052	Completat
	QLT091001	NCT01521793	Completat
	QLT091001	NCT01543906	Completat
<i>RS1</i>	Dorzolamide 2% TID o brinzolamide 1% TID	NCT02331173	Completat

6.3.1 Teràpia d'addició gènica

Una còpia normal del gen mutat s'introdueix a la cèl·lula hoste mitjançant l'ús de vectors terapèutics. L'àcid nucleic terapèutic d'interès pot ser DNA, mRNA, un anàleg d'RNA o un oligonucleòtid. D'aquests possibilitats, la que actualment és la més emprada, és la introducció del gen via DNA, ja que el DNA és molt estable i, per millorar la visió de forma estable, cal una producció continuada de la proteïna. El gen entra al nucli on es manté de manera episomal (o també es podria integrar), i la maquinària de transcripció cel·lular facilitaria la seva expressió [252].

Normalment, el DNA és introduït dins les cèl·lules retinals mitjançant virus adeno-associats (AAVs), vectors d'elecció per la seva baixa immunogenicitat, tot i que també s'utilitzen lentivirus i nanopartícules, ja que tenen una capacitat de càrrega major [251].

L'any 2017, la FDA (*Food and Drug Administration*, USA) va aprovar la teràpia gènica *in vivo* per mutacions bi-al·lèliques a *RPE65*. El medicament dissenyat és *voretigene neparvovec* (VN, LuxturnaTM, SparkTherapeutics), un AAV que conté el cDNA humà de *RPE65* (AAV2-hRPE65v2), que s'injecta a l'espai subretinal dels pacients.

La seguretat i l'eficàcia d'aquest agent terapèutic va ser comprovada a la fase III d'assajos clínics, amb resultats positius. Per a explicar la variabilitat del rescat fenotípic en els pacients, s'addueixen diferències en l'eficàcia i la durabilitat entre els assajos de teràpia gènica, l'efecte distint de les diferents mutacions del mateix gen, la composició del vector viral, els constituents del vehicle, com els surfactants, i els mètodes d'alliberament del vector. Els resultats obtinguts fins el moment mostren que el tractament presenta millors resultats en la millora de l'agudesa visual en pacients més joves, d'aproximadament 10 anys, que en pacients més adults, tot i que caldria provar-ho amb més pacients i d'edats més petites.

Cal remarcar que aquest sistema és un tractament, no una cura, amb una estabilitat d'aproximadament tres anys (no es pot saber encara la duració final de la teràpia), però únicament aquells privilegiats que tinguin aproximadament un milió dòlars podran accedir-hi, encara que hi ha algunes assegurances i serveis de sanitat públics que es fan càrrec de part dels costos [253].

6.3.2 Teràpia d'edició gènica

Actualment, hi ha dos abordaments pels quals es pot editar el genoma, d'una banda els TALENs i ZNFs (Nucleases *Zinc-Finger*), amb els que la mutació del pacient es corregeix *ex vivo* i seguidament es trasplanten les cèl·lules corregides, i de l'altra, la tècnica CRISPR/Cas9 que, a més de la correcció *in vitro*, permet corregir mutacions *in vivo*, és a dir, directament, dins de la retina del pacient.

TALENs i ZNFs

Aquests enzims estan dissenyats per a introduir modificacions al DNA dels cromosomes generant un tall a la doble cadena que, seguidament, es repararà o bé per recombinació amb homologia de seqüència (HDR) o bé per recombinació sense homologia (*non-homologous end joining*, NHEJ).

Els ZNFs s'han utilitzat com a prova de concepte en el tractament de la mutació p.P23H de *Rodopsina* [251].

CRISPR/Cas9

És la tècnica més innovadora d'edició gènica usada fins al moment. Aquesta tècnica té la capacitat d'introduir una o més mutacions al mateix gen o a diferents gens, usant una guia d'RNA. Únicament es requereix introduir l'endonucleasa Cas9 juntament amb la guia d'RNA que facilitarà el tall del genoma a un lloc cromosòmic específic.

S'han realitzat proves de principi en iPSCs emprant la tècnica de tall per CRISPR/Cas9, seguida específicament de HDR per corregir mutacions als gens *RPGR*, *MERTK*, *PDE6B*, *MAK* i *CEP290*, i després poder realitzar trasplantaments autòlegs als pacients [254].

Actualment, *Editas Medicine* (una empresa *spin-off* fundada per Feng Zhan, un dels científics més coneguts en el món de les aplicacions de CRISPR) està reclutant pacients per tal d'introduir mitjançant injecció subretinal, AAVs terapèutics que portin els gens per a fabricar les guies d'RNA i l'enzim Cas9 per tal de fer directament *in vivo* l'edició gènica d'una mutació *deep-intronic* al gen *CEP290* [255].

Actualment, aquesta és la tècnica més eficient d'edició genètica, pel que molts investigadors es centren en implementar aquesta tècnica per corregir les mutacions en gens implicats en IRDs donada la seva versatilitat i eficàcia, i així en un futur poder generar una teràpia [256].

6.3.3 Optogenètica

L'optogenètica combina la manipulació genètica i l'òptica. Aquesta tècnica consisteix en la introducció d'un gen que codifiqui per una proteïna sensible a la llum a una neurona amb el propòsit d'estimular-la amb la llum. D'aquesta manera, s'introdueix un vector fotosensible a les cèl·lules de la retina, convertint les neurones secundàries i terciàries en primàries. Les opsines són els elements més utilitzats en l'optogenètica, i poden ser d'origen microbià (Tipus I) o animal (Tipus II). Aquesta tècnica és molt atractiva, però té dues limitacions majors, la primera és que els pacients que han de ser tractats han d'estar en etapes poc avançades de la malaltia, ja que les cèl·lules han d'estar vives; el segon inconvenient és que la incorporació de les opsines limita la fotorecepció (i la visió) a una longitud d'ona concreta. D'altra banda, una de les avantatges de l'optogenètica és que es pot utilitzar independentment del defecte genètic primari per tal de restaurar la visió, a més de ser més precís que els implants electrònics de retina. Tot i la varietat de promotors que s'han utilitzat –incloent-ne d'ubics, específics de fotoreceptors, de cèl·lules bipolars i de ganglionars–, la millor cèl·lula a la que s'hauria de dirigir el tractament encara no està clara, així com tampoc el procediment quirúrgic per realitzar-ho. No obstant, els assajos pre-clínic que s'estan duent a terme són molt prometedors per la restauració de la visió, encara que els resultats de la Fase I/II en humans estan en procés i no han sigut publicats ni analitzats [257].

6.3.4 Teràpia de modulació de l'*splicing*

Molts gens causant d'IRDs presenten mutacions que afecten a l'*splicing*, pel que causen que es produeixin transcrits aberrants i no funcionals [258].

Oligonucleòtids antisentit (AONs)

Els AONs són molècules petites d'RNA o DNA modificades químicament, que s'uneixen per complementarietat de bases al pre-mRNA. Segons les modificacions químiques i el seu disseny poden exercir diferents funcions: I) exclusió d'exons i

pseudoexons; II) inclusió d'exons; III) degradació del transcrit i IV) bloqueig de la traducció [258].

Aquesta tecnologia s'ha emprat per corregir defectes en el procés d'*splicing* en mutacions a *CEP290*, *OPA1*, *CHM*, *USH2A* i *ABCA4* [251].

U1 *Spliceosomal* RNA

Mutacions que afecten al lloc d'*splicing* causen que l'*spliceosome*, la maquinària d'*splicing*, no es pugui unir al pre-mRNA. Un element necessari per al reconeixement dels llocs d'*splicing* és el complex *U1 small nuclear RNA* (snRNA); quan algun nucleòtid de la regió donadora d'*splicing* està mutat, el complex no la pot reconèixer i no es pot produir el procés de maduració i empalmament de l'mRNA.

La tècnica correctiva que s'ha emprat és utilitzar un U1 snRNA modificat i adaptat a la mutació, que afavoreix, d'aquesta manera, que es doni l'*splicing*. Aquest mètode ha estat assajat amb eficàcia amb mutacions a *RHO*, *BBS1* i *RPGR* [251], [259].

Trans-*splicing*

El trans-*splicing* es produeix quan el procés d'*splicing* es dona entre dues molècules d'RNA. Aquesta tècnica s'ha utilitzat per corregir mutacions de l'mRNA, ja que introduint la molècula exògena d'RNA que conté un domini d'unió a l'mRNA diana, s'activa el procés de trans-*splicing*.

Aquest sistema ha estat efectiu corregint mutacions en *RHO* i *CEP290* [251], [260].

6.3.5 Teràpia de silenciament gènic post-transcripcional

El silenciament gènic és un procés natural que succeeix a les cèl·lules eucariotes. Normalment es dona perquè els RNAi inhibeixen l'expressió d'un gen en unir-se a l'mRNA, tot bloquejant-lo.

RNAi

S'ha aconseguit introduir RNAs d'interferència per a degradar transcrits de *RHO* mutats i aconseguir, d'aquesta manera, que no s'expressi l'al·lel mutat [261].

AONs depenents d'RNAsa H

Aquesta tècnica es basa en que els híbrids de DNA/RNA són degradats per l'RNAsa H. Així doncs, es poden dissenyar AONs específics que vagin dirigits a un transcrit concret i el degradin gràcies a l'acció de l'RNAsa H.

Aquesta eina s'ha emprat per a corregir mutacions en *RHO in vivo*, i també *in vitro* per a mutacions en *NR2E3* [251], [262].

6.3.6 Teràpies farmacològiques

L'heterogeneïtat de les IRDs, així com la barrera hemato-retiniana compliquen que un medicament pugui arribar a la retina sense disseminar-se per l'organisme. D'altra banda, la diversitat dels gens i, per tant, de vies de senyalització dificulten generar un medicament genèric que sigui efectiu.

Tot i això, hi ha diversos assajos clínics que empren medicaments químics convencionals amb l'objectiu de millorar la visió o, inclús, restaurar-la en pacients amb mutacions a *ABCA4*, *RPE65* i *RS1* [251].

6.3.7 Sistemes d'alliberament de gens

La retina és un element aïllat protegit per la part anterior de l'ull i per la barrera hemato-retiniana, pel que aconseguir que les teràpies dissenyades arribin a la cèl·lula objectiu no és fàcil, ja que els tractaments no es poden subministrar de manera sistèmica perquè no hi arribarien. Els mètodes més comuns per aplicar el tractament són la injecció subretinal i la injecció intravítrea. La injecció subretinal, tot i alliberar el contingut genètic més a prop dels fotoreceptors i de l'RPE –les cèl·lules que normalment són l'objecte del tractament terapèutic– és un mètode invasiu i arriscat

de dur a terme ja que pot causar que la retina es desenganxi de l'RPE, tot generant despreniment de retina, el que pot ser un problema major en aquells pacients que presenten una mala integritat retinal. Pel que fa a la injecció intravítrea, és molt eficient per tractar problemes a la lent o la retina més interna, però l'eficiència a l'hora de transduir les cèl·lules fotoreceptores o l'RPE es menor que la injecció subretinal. No obstant, aquest tipus d'alliberament presenta menys complicacions a nivell de procediment, i de recuperació després de la intervenció quirúrgica [263].

El sistema de transport i entrega de gens més àmpliament utilitzat són els sistemes virals, concretament, els virus adeno-associats (AAVs), tot i que n'hi ha d'altres com els lentivirus o els adenovirus. Els AAVs presenten una baixa toxicitat i immunogenicitat. A més, transdueixen les cèl·lules fàcil i ràpidament, i fan que l'expressió del transgen sigui estable. Malgrat les nombroses avantatges que presenten aquests sistemes, tenen una limitació molt important: la capacitat de càrrega gènica és restringida, essent de 4,7 Kb, el que limita enormement la teràpia per addició gènica [251], [264].

Hi ha altres sistemes d'alliberament de DNA que no són sistemes virals. El DNA pot ser introduït directament a les cèl·lules, però no és gens eficient ja que les cèl·lules estan preparades per a no deixar entrar molècules exògenes al seu interior, així que aquest mètode no sembla molt factible per utilitzar-lo en teràpia retinal.

Un altre mètode per alliberar DNA dins les cèl·lules són els liposomes i les nanopartícules (NP). Els liposomes, o lípids catiónics, presenten la gran limitació que generen toxicitat i s'agreguen, mentre que les NP obren un camp a explorar ja que, en molts casos, es poden fabricar de materials que no presenten citotoxicitat, poden variar en mida i forma per tal d'escollir la que més convingui segons el teixit, a més de no presentar limitacions en la mida del DNA a carregar [251], [265].

En aquesta Tesi explorarem un tipus de NP com a prova de concepte com a mètode d'alliberament de càrrega gènica a la retina, així com la seva via d'entrada a la

cèl·lula, per tal d'ampliar el ventall de possibilitats de sistemes d'entrada d'agents terapèutics a la retina.

Objectius

OBJECTIUS

CERKL és un gen causant de Retinosi Pigmentària, una malaltia genètica de caràcter mendelià, malaltia caracteritzada per la mort dels fotoreceptors i que, amb el pas del temps, desemboca en ceguera. Malgrat els esforços de diferents grups d'investigació, incloent-hi el nostre grup (que va ser el descobridor del gen), la funció de *CERKL* encara roman desconeguda. Els intents a l'hora de generar un model animal que mimetitzi el fenotip humà han dificultat l'estudi funcional d'aquest gen i, conseqüentment, s'ha alentit poder trobar una teràpia efectiva que pugui aturar la progressió de la malaltia o curar als pacients amb mutacions a *CERKL*. Per aquest motiu, en aquesta Tesi ens plantejarem estudiar el paper de *CERKL* a la retina i així, apropar-nos al disseny efectiu d'una teràpia o tractament que millori el pronòstic de la malaltia.

Els objectius concrets plantejats en aquesta Tesi són:

1. Generació i caracterització d'un nou model murí de *Cerkl*
 - 1.1. Generació de ratolins *Cerkl knockout* mitjançant la tècnica d'edició gènica CRISPR/Cas9
 - 1.2. Caracterització fenotípica de la retina dels ratolins *Cerkl knockout* en comparació amb ratolins control (*wild-type*)
2. Determinació del paper de CERKL davant un estímul d'estrès oxidatiu tan *in vitro* com *in vivo*
 - 2.1. Estudi de la dinàmica cel·lular de CERKL *in vitro*
 - 2.2. Identificar el rol de CERKL en resposta a un estímul d'estrès oxidatiu o lumínic *in vivo* i *ex vivo*
 - 2.3. Generar i caracteritzar l'expressió de CERKL en organoides tridimensionals de retina a partir de fibroblasts d'un pacient i un control
 - 2.4. Determinar la resposta front a l'estrès oxidatiu en els organoides

- 2.5. Comparar l'efecte de l'estrès oxidatiu en el model humà d'organoides i les retines del model murí

3. Comprovar l'efectivitat de l'alliberament d'àcids nucleics mitjançant nanopartícules d'or com a prova de principi de teràpia gènica
 - 3.1. Determinar el sistema d'entrada de les nanopartícules en cèl·lules en cultiu
 - 3.2. Comprovar l'eficiència d'entrada de les nanopartícules en cèl·lules en cultiu en comparació amb els lipoplexes convencionals
 - 3.3. Explorar la possibilitat d'alliberar àcids nucleics terapèutics mitjançant nanopartícules en retines *ex vivo*

Resultats

INFORME DE LA DIRECTORA

Com a directora d'aquesta Tesi Doctoral, titulada “La funció de *CERKL* a la retina: generació d'un model de ratolí i anàlisi de la seva implicació en la resposta a estrès oxidatiu”, realitzada per l'Elena Borrego Domènech, confirmo que es presenta com a compendi de 3 publicacions (amb feina per una altra publicació, en preparació). La participació de la doctorand en cada publicació és la que es detalla a continuació:

PUBLICACIÓ 1: *A new Cerkl mouse model generated by CRISPR-Cas9 shows progressive retinal degeneration and altered morphological and electrophysiological phenotype.* **Elena B. Domènech**, Rosa Andrés, M José López-Iniesta, Serena Mirra, Rocío García-Arroyo, Santiago Milla, Florentina Sava, Jordi Andilla, Pablo Loza-Álvarez, Pedro de la Villa, Roser Gonzàlez-Duarte, Gemma Marfany. **Investigative Ophthalmology and Visual Science (en premsa).**

Aquest article és un dels articles de major rellevància dins d'aquesta Tesi, perquè presenta una bona part de la feina feta per la doctorand durant la seva Tesi doctoral, que ha consistit en la generació i caracterització fenotípica d'un model de ratolí *knockout* del gen *Cerkl*, mitjançant l'ús del sistema CRISPR/Cas9, en dos fons genètics, el fons *black* i l'albí. A més, com que la deleció total del gen ha sigut letal, va construir i mantenir les soques com a doble heterozigot *Cerkl^{KD/KO}*, mitjançant l'encreuament amb un model anterior. De les 8 figures principals de l'article i de les 6 figures suplementàries, l'Elena ha fet la feina experimental i ha obtingut la figura final en 7 de les figures principals, i en 4 de les suplementàries, sent amb diferència la persona que més hi ha treballat i contribuït. Aquest model presenta una degeneració lenta de la retina, similar a la que succeeix en humans, i és un excel·lent model per a estudiar l'efecte de l'estrès lumínic sobre la retina quan el gen *Cerkl* està mutat o deplecionat. Aquest article suposa l'acompliment de l'objectiu 1 d'aquesta Tesi doctoral.


PUBLICACIÓ 2: *The Relevance of Oxidative Stress in the Pathogenesis and Therapy of Retinal Dystrophies.* **Elena B. Domènech** and Gemma Marfany. **Antioxidants, 9 (4): 347, 2020.**

En aquesta revisió molt completa sobre la rellevància de l'estrès oxidatiu en les patologies mendelianes i complexes de degeneració de la retina i altres teixits oculars, amb més de 150 referències, la participació de l'Elena ha sigut la cerca bibliogràfica exhaustiva, la generació de diverses figures originals, la discussió activa de les dades i les hipòtesis presentades, que constitueixen una part rellevant de la introducció, disseny d'experiments i discussió de resultats de l'objectiu 2 de la seva Tesi. Cal esmentar que aquesta revista és una de les més rellevants en el camp específic de l'estrès oxidatiu.

PUBLICACIÓ 3: *In Vitro Gene Delivery in Retinal Pigment Epithelium Cells by Plasmid DNA-Wrapped Gold Nanoparticles.* Sònia Trigueros, **Elena B. Domènech**, Vasileios Toulis and Gemma Marfany. **Genes, 10 (4): 289, 2019.**

Aquest article suposa una prova de concepte per a intentar fer entrega d'àcids nucleics directament a la retina de ratolí usant nanopartícules d'or com a vectors, tant per a fer transgènesi transitòria com teràpia gènica. Entra totalment dins de l'objectiu 3 d'aquesta Tesi. Aquesta prova de concepte es va realitzar en cèl·lules de l'epiteli pigmentari de retina en cultiu, i és un primer pas per tal de realitzar l'entrega de gens a fotoreceptors i altres tipus cel·lulars en explants de retina *ex vivo*, i, fins i tot, *in vivo* en un futur.

Barcelona, Juny del 2020



Gemma Marfany Nadal

Capítol 1

Generació i caracterització fenotípica
d'un nou model murí de *Cerkl*

Publicació 1

A new Cerkl mouse model generated by CRISPR-Cas9 shows progressive retinal degeneration and altered morphological and electrophysiological phenotype

PUBLICACIÓ 1**TÍTOL**

*“A new *Cerkl* mouse model generated by CRISPR-Cas9 shows progressive retinal degeneration and altered morphological and electrophysiological phenotype”*

AUTORS (ANY)

Elena B. Domènech, Rosa Andrés, M José López-Iniesta, Serena Mirra, Rocío García-Arroyo, Santiago Milla, Florentina Sava, Jordi Andilla, Pablo Loza-Álvarez, Pedro de la Villa, Roser González-Duarte, Gemma Marfany (2020).

REFERÈNCIA

Investigative Ophthalmology and Visual Science, en premsa (Índex d'impacte 3,812)
Q1 Ophthalmology.

RESUM

Aproximadament un centenar de gens causen Retinosi Pigmentària (RP), una malaltia rara que afecta a 1:4.000 persones arreu del món. Mutacions en el gen *Ceramide Kinase-like (CERKL)* són una de les causes més prevalents que causen RP i distròfia de cons i bastons (CRD) autosòmiques recessives, tot i que la funció d'aquest gen a la retina roman desconeguda, ja que la manca d'un model animal que presenti un fenotip similar a la malaltia dificulta la realització d'estudis funcionals i l'assaig amb noves teràpies potencials. Un model previ fet per membres del grup, basat en la deleció via cre/loxP del promotor i exó 1 de *Cerkl* va resultar ser un *knockdown* enlloc d'un *knockout*, atès que *Cerkl*, tant a humà com a ratolí, presenta promotors alternatius i roman, aproximadament, un 40% de transcripció basal del gen. En aquesta Tesis, hem aconseguit delecionar el locus de *Cerkl* (aproximadament 97 kb) mitjançant la tècnica d'edició gènica CRISPR/Cas9, usant la variant *nickase* Cas9 D10A. La deleció en homozigosi del locus *Cerkl* ha resultat

ser letal, pel que hem generat un ratolí doble heterozigot que expressa menys d'un 10% d'expressió residual de *Cerkl*. La caracterització fenotípica d'aquest model, *Cerkl*^{KD/KO}, mostra alteracions morfològiques de la retina, amb un nombre reduït de cons i la pèrdua progressiva de fotoreceptors. A més, les membranes dels segments externs dels fotoreceptors estan mal empaquetades, l'epiteli pigmentari presenta una fagocitosi defectuosa i la resposta electrofisiològica de retines d'animals es veu progressivament alterada amb l'edat. Aquest nou model murí de *Cerkl* mimetitzava molts dels trets fenotípics, incloent-hi la lenta i progressiva degeneració de la malaltia, que s'observen en pacients amb mutacions bi-al·lèliques a *CERKL*.

APORTACIÓ PERSONAL AL TREBALL

Aquest treball ha estat realitzat per diverses persones del grup de la Dra. Marfany i la Dra. Roser González-Duarte, i també hem col·laborat amb el grup del Dr. Pablo Loza (ICFO) i del Dr. Pedro De la Villa (Universidad de Alcalà de Henares).

La meua aportació ha estat la totalitat de la part experimental de la caracterització fenotípica i funcional del model *Cerkl*^{KD/KO}, així com l'anàlisi dels resultats obtinguts. En concret: a) manteniment de la colònia de ratolins i generació de la colònia albina, així com l'obtenció d'embrions per determinar el punt de la letalitat (Figures 1C i 1D); b) dissecció de teixits i extracció d'RNA per realitzar les RT-qPCRs i així determinar els nivells d'expressió dels gens d'interès (Figures 1E i 1F); c) dissecció dels teixits, preparació de les mostres per l'observació de les mostres al microscopi confocal o electrònic de transmissió, l'anàlisi per *western-blot*, i la participació en la realització dels ERGs (Figures 2A i C; i Figures 3, 4, 5, 6 i 8).

A new *Cerkl* mouse model generated by CRISPR-Cas9 shows progressive retinal degeneration and altered morphological and electrophysiological phenotype

Elena B. Domènech ^{1,2}, Rosa Andrés ^{1,2}, M José López-Iniesta ¹, Serena Mirra ^{1,2}, Rocio García-Arroyo ¹, Santiago Milla ³, Florentina Sava ¹, Jordi Andilla ⁴, Pablo Loza-Álvarez ⁴, Pedro de la Villa ^{3,5}, Roser González-Duarte ^{1,2,6}, Gemma Marfany ^{1,2,6,7*}

¹ Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Avda. Diagonal 643, Universitat de Barcelona, Barcelona 08028, Spain

² CIBERER, ISCIII, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

³ Department of Systems Biology, University of Alcalá, 28871, Madrid, SPAIN

⁴ ICFO-Institut de Ciències Fòniques, The Barcelona Institute of Science and Technology, 08860 Barcelona, Spain

⁵ IRYCIS, Madrid, SPAIN

⁶ DBGen Ocular Genomics, Barcelona, Spain

⁷ Institute of Biomedicine (IBUB, IBUB-IRSJD), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

* corresponding author: gmarfany@ub.edu

Abstract

Purpose: Close to one hundred genes cause retinitis pigmentosa, a mendelian rare disease that affect 1:4000 people worldwide. Mutations in the ceramide kinase-like gene (*CERKL*) are one of the prevalent causes for autosomal recessive cause retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy, but the functional role of this gene in the retina is yet to be fully determined. We aimed to generate a mouse model that resembles the phenotypic traits of patients carrying *CERKL* mutations to undertake functional studies and assay therapeutic approaches.

Methods: The *Cerkl* locus has been deleted (around 97 kb of genomic DNA) by gene editing using the CRISPR-Cas9 D10A nickase. Since the deletion of the *Cerkl* locus is lethal in mice in homozygosis, a double heterozygote mouse model with less than 10% residual *Cerkl* expression has been generated. The phenotypic alterations of the retina of this new model have been characterized at the morphological and electrophysiological levels.

Results: This *Cerkl*^{KD/KO} model shows retinal degeneration, with a decreased number of cones and progressive photoreceptor loss, poorly stacked photoreceptor outer segment membranes, defective RPE phagocytosis, and altered electrophysiological recordings in aged retinas.

Conclusions: For the first time, a *Cerkl* mouse model mimics many of the phenotypic traits, including the slow but progressive retinal degeneration, shown by human patients carrying *CERKL* mutations. This useful model will provide unprecedented insights into the retinal molecular pathways altered in these patients and will enable the design of effective treatments.

Introduction

Retinitis Pigmentosa (RP) (OMIM # 268000) belongs to a group of heterogeneous inherited retinal dystrophies (IRDs) that affect 1 in 3,000-5,000 people worldwide [1]–[3]. RP, a highly clinically and genetically heterogeneous disease, is characterized by the degeneration of the photoreceptors, with a main alteration of rods at early stages followed by cone death at later stages of the disease [1]. Mutations in *CERKL* cause non-syndromic autosomal recessive RP (OMIM # 608380), although it has been also associated to autosomal recessive cone-rod dystrophy (CRD) (first alterations detected in cones, and later in rods) [4]–[8].

CERKL shares more than 50% homology to *CERK*, a kinase that phosphorylates ceramide to ceramide 1-phosphate (C1P), a sphingolipid metabolite involved in proliferation, apoptosis, phagocytosis and inflammation [9]–[11], yet no kinase activity has been confirmed for *CERKL* so far [12]. *CERKL* shows a highly dynamic subcellular localization, as it can shift from nucleus to cytoplasm, and has been also associated to the Golgi vesicles and the endoplasmic reticulum and mitochondria membranes [13], [14]. Previous results support that it is involved in protecting cells against oxidative stress injury [13] [15]. *CERKL* is not only expressed in the retina but also in several adult and fetal tissues in human and mouse. In humans, the highest expression of *CERKL* is detected in the retina, some brain regions, lung and kidney [4] while in adult mouse, the highest levels of expression can be detected in the retina, liver and testis [16].

The attempts to generate a mouse model to both unveil the physiological function of *CERKL* and generate an RP model to study the progression of the retinal disorder have not been successful [17]. A *knockout* murine model generated by deleting the proximal promoter and the first exon of *CERKL* using *cre/loxP* turned into a knockdown, due to the use of alternative promoters. The levels of sphingolipids were altered in the model [13], but no retinal morphological degeneration was detected except for electroretinographic alterations in the oscillatory potentials of the retinal ganglion cell layer [18]. It is plausible that the high transcriptional complexity of *CERKL*, which produces more than 20 transcript isoforms in human and mouse due to the combination of extensive alternative splicing and the use of additional promoters hampers the generation of a mouse model that mimics the human phenotype [16]. Nonetheless, the morpholino-knockdown of *Cerkl* in zebrafish embryos caused abnormal eye development, and the retina showed lamination defects, altered photoreceptor outer segments and increased apoptosis, thus supporting the relevance of *Cerkl* for survival and protection of the retina [19]. On the other hand, the study of the retinal neurodegeneration phenotype in morpholino-treated zebrafish embryos cannot be easily extrapolated to adult humans, and therefore, the generation of a genetically amenable model to unveil the physiological role of *CERKL* and study the effect of associated mutations still remains a challenge.

In this work, we have generated the deletion of the whole *Cerkl* locus (approximately 100 kb) by gene editing using a CRISPR-Cas9 D10A nickase. Unexpectedly, the complete ablation of *Cerkl* in homozygosis resulted in embryonic/perinatal lethality in mouse. We have thus generated a new double heterozygote model in which the expression of *Cerkl* is reduced to less than 10% in the retina.

Materials and Methods

Animal handling and ethics statement

Murine tissue samples were obtained from C57BL/6J and Albino B6(Cg)-Tyrc-2J/J (Jackson Laboratories) background mice at different ages. Animal handling was performed according to ARVO statement for the use of animals in ophthalmic vision research, as well as the regulations of the Animal house Care facilities at the University of Barcelona (UB). All procedures were evaluated and approved by the Animal Research Ethics Committee (CEEA) of the Universitat de Barcelona.

Cerkl^{KO/KO} mouse model generation by CRISPR/Cas9 system

The CRISPR/Cas9 system was used to generate a *Cerkl*^{KO/KO} mouse model by deleting the whole *Cerkl* locus, approximately 97Kb. To minimize potential off-targets, we used the D10A Cas9 nickase (Addgene). For the deletion, two guides per site were designed (a total of four) (Fig. 1) and injected in murine zygotes together with the endonuclease Cas9-D10A mRNA. To facilitate the generation of a recombinant deletion allele, ssODNs with the flanking sequence of the expected deleted allele were also microinjected. In our conditions, ssODNs appeared integrated in the target site in some alleles but did not enhance deletion, since none of the recovered alleles in the mosaic pups contained precisely the designed allele. All embryonic procedures up to the generation of the founder mice were performed at the Mouse Mutant Core Facility, Institute for Research in Biomedicine (Barcelona, Spain). Mosaic pups were genotyped and DNA samples from ear punches were screened by PCR using specific primers for detection of gene edited alleles (only at 5' or 3' sites, full deletion, inversion) (Table 1). PCR products were electrophoresed in resolutive high concentration agarose gels and gene edition was confirmed by Sanger sequencing. To confirm that the CRISPR/Cas9 technique did not introduce any off-target deletion/mutation, all the potential off-target sequences determined by a prediction software (up to three mismatches with sgRNA) were analyzed. PCR primers for potential off-target regions are listed in Supplementary Table 1. After discarding any off-target events or on-target chromosomal rearrangements (inversions/duplications), selected founder animals were crossed with either wild type black or albino animals in order to transmit the *Cerkl* allele bearing the 97 Kb deletion to the offspring. Additional matings with a floxed *Cerkl*^{KD} model [18] were performed to obtain the heterozygote *Cerkl*^{KD/KO} lineage both in the C57BL/6J and Albino B6 murine backgrounds.

For arborization studies, selected matings between two strains, the transgenic Thy1-YFP-H mice (a kind gift from Ángel Carrión [20]) and *Cerkl*^{KD/KO} mice (generated in this work) were performed to generate a new mouse line, *Cerkl*^{KD/KO}/Thy1-YFP.

Genomic DNA and Genotyping by PCR

DNA for genotyping was extracted from ear punches from weaning mouse pups, following standard procedures. In brief, each sample was lysed in a mild lysis buffer, incubated overnight with proteinase K and the nucleic acid was precipitated with ethanol. Primers for genotyping each strain are depicted in Fig. 1 and listed in Table 1. Three-step PCR conditions for amplification of genomic DNA were used for individual genotyping.

RNA isolation and RT-qPCR

For each genotype, 3-6 independent animal samples were homogenized using a Polytron PT1200E homogenizer (Kinematica, AG, Lucerne, Switzerland). Total RNA was isolated using the RNeasy mini kit (Qiagen, Germantown, MD), following the manufacturer's instructions with minor modifications (treatment with DNase I during 1h). Reverse transcription reactions were carried out using the qScript™ cDNA Synthesis Kit (Quanta BioSciences, Inc, Gaithersburg, MD). Real time PCR (qPCR) was performed using LightCycler® 480 SYBR Green I Master and a LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 (Roche Applied Science) in a final reaction volume of 10 µl (Primers listed in Table 1). Raw data were analyzed with the with the Advanced Relative Quantification method (LightCycler® 480). The Mann-Whitney test was performed to assess statistical significance.

Cell culture and constructs

The coding region of hCERKL532 cDNA (NM_201548.4) and mCerk1525 cDNA were cloned into pcDNA3.1. Site directed mutagenesis by inverse PCR was performed into the coding mCerk1525 cDNA (NM_001048176.1) to generate constructs carrying the deletion of exon 2, exon 5 and exon 12 in frame. The constructs were transfected in HEK293 using Lipotransfectine (Nirbolab). After 4 h post-transfection the medium was changed, and cells were harvested after 48 h growth for subsequent assays.

In-house antibody generation

We generated in-house anti-CERKL antibodies against specific mouse CERKL antigenic peptides. CERKL2 (peptide encoded in exon 2): CLKEQRNKLKDSLTL; CERKL5 (peptide encoded in exon 5): CSEARALLLRAQKNAGVE; CERKL12 (peptide encoded in exon 12): CVDGDLMEAAASEVHIR. Peptides were conjugated to the KLH carrier and subsequently injected into rabbits together with CFA or IFA adjuvants for antibody production. These antibodies were used for western blot, immunofluorescence and immunoprecipitation assays. The specificity of the antibodies was tested using constructs with specific in-frame deletions spanning the immunogenic peptides.

Western-Blot immunodetection

Adult retinas and other tissue samples were lysed in RIPA buffer 50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, protease inhibitors whereas transiently transfected HEK293 cells were lysed using Laemmli buffer 1x. Samples were electrophoresed in a SDS-PAGE gel and transferred onto a PVDF western-blotting membrane (Roche Applied Science), which was blocked with 5% non-fat dry milk and 5% BSA (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EE.UU) in PBS containing 0.1% Tween 20 (PBST). Primary antibodies were incubated overnight at 4°C followed by incubation with the corresponding secondary antibodies for 1h at RT using standard procedures. Rabbit αCERKL2 (1:1000 in house), Rabbit αCERKL5 (1:1000 in house), Mouse αGFAP (1:500, MAB8360 Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA), Mouse αGAPDH (1:1000 ab8245, Abcam, Cambridge, UK), Peroxidase-Conjugated αMouse (1:2000, AB5706, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) ECL™ Peroxidase-Conjugated αRabbit (1:2000, NA934VS, GE HealthCare, Chicago, Illinois, USA).

Immunohistochemistry on mouse retina cryosections

Eyes from 2 to 18 month-old mice were enucleated, fixed and embedded as described elsewhere [21]. Cryosections (12 μm section) were collected and kept frozen at -80°C until used. For immunohistochemistry (IHC), cryosections were air-dried for 10 min and rehydrated with PBS 1x (3 x 5 min) and blocked in blocking solution (PBS 1x containing 2% Sheep Serum and 0.3 % Triton X-100) 1h at RT. Primary antibody incubation was performed O/N at 4°C . After three rinses with PBS 1x (10 min each) cryosections were incubated 1h at RT with the corresponding secondary antibodies conjugated to a fluorophore. Finally, the slides were washed with PBS 1x (3 x 10 min) and cover-slipped with Fluoprep (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, France). Primary antibodies and dilutions used were: Rabbit αCERKL2 (1:200, in house), Rabbit αCERKL5 (1:100, in house), Mouse $\alpha\text{Rhodopsin}$ (1:300, ab5417, Abcam, Cambridge, UK), Rabbit $\alpha\text{L/M Opsin}$ (1:300, AB5405, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA),), Rabbit $\alpha\text{S-Opsin}$ (1:300, AB5407, Burlington, Massachusetts, USA), DAPI (1:1000, 10236276001, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), Mouse αGFAP (1:200, MAB8360 Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA), PNA (1:50, L32460, Invitrogen, Carlsbad, California, USA), Mouse $\alpha\text{TUJ-1}$ (1:1000, 801201 BioLegend, San Diego, California, USA). Image visualization was performed using confocal microscopy and optical transmission microscopy (Zeiss LSM 880, Thornwood, NY, USA), (LEICA TCS-SP2, Wetzlar, Germany) and high-resolution microscopy (LEICA SP5 STED CW).

Retinal sections for morphometrical measurements and Transmission Electron Microscopy (TEM)

Eyes from *Cerkl^{KD/KO}* and *Cerkl^{WT/WT}* mice (albino strain) were perforated using a needle and eyes were immersed in fixative solution (2.5% glutaraldehyde, 2% PFA in 0.1 M phosphate buffer) incubation at 4°C overnight, rinsed with buffer, post-fixed in 1% osmium tetroxide 0.8% $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ in the dark for 2 h at 4° temperature, and rinsed again in double distilled water to remove osmium. Eyes were dehydrated in ascending concentrations of acetone, infiltrated and embedded in Epon (EMS). Blocks were obtained after polymerization at 60°C for 48 h. Semithin sections of 1 μm in thickness were obtained using a UC6 ultramicrotome (Leica Microsystems, Vienna, Austria), dyed with 0.5% methylene blue and observed in an optic microscope Leica DM200 (Leica Microsystems, Vienna, Austria). Sections containing the optic nerve were photographed under a stereo microscope (MZFLIII, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and ZOE™ Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Fiji software was used to measure retinal layer thickness at 200 μm intervals.

For TEM imaging ultrathin (60 nm) sections were obtained using a UC6 ultramicrotome (Leica Microsystems, Austria), stained with 2% UranylLess and lead citrate, and observed in a Jeol EM J1010 (Jeol, Japan). Images were acquired at 80 kV with a 1k x 1k CCD Megaview camera. For RPE phagosome/lysosome distribution analysis, the RPE cell is longitudinally divided in two halves (basal and apical) and the number of each vesicle type are counted by eye.

Retinal whole mount

For whole mount retina staining, retinas from 2 to 18 month-old *Cerkl^{WT/WT}*, *Cerkl^{WT/KO}* and *Cerkl^{KD/KO}* mice were placed on glass slides "photoreceptors side up", flattened by cutting the

edges, fixed in 4 % paraformaldehyde for 1 h at RT and rinsed with PBS 1x (3 x 5 min). Afterwards, the retinas were blocked in blocking solution (PBS 1x containing 2% Sheep Serum and 0.3 % Triton X-100) for 1 h at RT, and incubated for 1 h with PNA-Alexa Fluor 647 (Invitrogen Life Technologies) in blocking solution (1:50). Retinas were washed with PBS 1x (3 x 5 min), mounted with Fluoprep (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, France) and photographed with a confocal microscope (LEICA TCS-SP2, Wetzlar, Germany). For arborization studies, retinas from 3 month-old *Cerkl^{WT/WT}/Thy1-YFP* and *Cerkl^{KD/KO}/Thy1-YFP* were placed on glass slides "ganglion cells up", flattened by cutting the edges, fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h at RT, rinsed with PBS 1x (3 x 10 min) and permeabilized in PBS 1x with 0.1% Triton X-100 for 15 min. Blocking was performed for 1 hour in 1% fetal bovine serum (Roche Diagnostics) in PBS. Rabbit anti-GFP primary antibody (Abcam ab290) was used (1:50) overnight at 4°C to amplify the YFP signal. Retinal whole mounts were rinsed for 10 min in PBS (3x) and incubated at room temperature for 1 hour with secondary antibody conjugated to Alexa-488 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 1:100 and DAPI. After 3 washes in PBS 1x (10 min), retinas were mounted with Mowiol.

Primary retinal ganglion cell culture

For primary RGC culture, coverslips were coated with poly-ornitine (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). A drop of complete neurobasal medium (Neurobasal™-A medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) supplemented with 0.06% D-Glucose, 0.0045% NaHCO₃, 1mM L-Glutamine and 1% Penicillin/Streptomycin) plus 10 µg/mL Laminin (Roche, Saint Louis, Missouri, USA) was added on coated coverslips and incubated overnight at 37°C, and washed 3X with complete neurobasal medium, all before cell culture. P0 mouse retinas were dissociated using the Neural Tissue Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach, Germany) following the manufacturer's instructions with minor modifications. Approximately 100,000 cell/well were seeded onto freshly prepared coverslips in a 24 well/plate. Neuronal supplements and factors were added: 1X B27 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 5 µM Forskolin (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), 50 ng/mL Human BDNF (Peprotech, Rock Hill, New Jersey, USA), 20 ng/mL Rat CNTF (Peprotech, Rock Hill, New Jersey, USA). After 7 days of *in vitro* neuron differentiation (7DIV), cells were fixed with 4% PFA for 20 min, washed 3 times with PBS 1X and cryoprotected (30 % Glycerol, 25 % Etilenglicol 100 % and 0.1M PBS) for further experiments.

In vivo and *in vitro* arborization studies

Image visualization was performed using confocal microscopy (Zeiss LSM 880, Thornwood, NY, USA). There are more than 30 distinct ganglion cell subtypes in the mouse retina, which can be distinguished by their morphological and functional features [22], [23]. *In vitro* cultured mouse RGCs were recognized by their morphology and long axons after immuno-staining for TUJ-1. For analysis of *in vivo* RGC morphology, YFP-positive RGCs from *Cerkl^{WT/WT}/Thy1-YFP* and *Cerkl^{KD/KO}/Thy1-YFP* were identified by the presence of an axon and the morphology of large field retinal ganglion cells [22]. For arborization quantification, confocal images were analysed using the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD), and dendritic arbors of ganglion cells were traced on projected z-stacks using a Fiji NeuronJ plugin.

ERGs

A total of 8 *Cerkl^{wt/wt}* type mice, and a group of 8 *Cerkl^{KD/KO}* mice were used for electroretinogram recordings. Dark-adapted animals were anaesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (95 mg/kg; Ketalar, Parke-Davis, Wellington, New Zealand) and xylazine (5 mg/kg; Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany) in saline solution (NaCl 0.9%). Pupils were dilated with 1% tropicamide (Alcon Cusi S.A., El Masnou, Barcelona, Spain). A corneal electrode (Burian-Allen, Hansen Ophthalmic Development Lab, Coralville, IA) was used to record ERGs from the right eye. Electrode was placed 1-2 mm from the cornea, and a drop of 2% methyl-cellulose (Methocel, Ciba Vision, Hettingen, Switzerland) was placed between the cornea and the electrode to ensure electrical conductivity. Animal handling was performed under dim red light (> 640 nm) and mice were maintained for >5 min in absolute darkness before recording. Mouse temperature was maintained at 37°C with a water-content heating pad. Full-field flash ERG was performed, with a Ganzfeld dome. The intensity of light stimuli was measured with a photometer (Mavo Monitor USB, Gossen, Nürenberg, Germany) at the level of the eye. At each light intensity, 4-6 consecutive recordings were averaged. The interflash interval in scotopic conditions ranged from 3 s for dim flashes up to 30 s for the highest intensity stimuli. Under photopic conditions the interval between light flashes was fixed at 1 s. ERG signals were amplified and bands filtered between 0.3 and 1000 Hz with a Grass amplifier (CP511 AC amplifier, Grass Instruments, Quincy, MA). Electrical signals were digitized at 2 kHz with Labchart Pro software and Power Lab data acquisition board (AD Instruments, Chalgrove, UK). Bipolar recording was performed between the corneal electrode and a reference electrode located into the mouth, with a ground electrode located in the tail. The stimulation protocols were designed according to the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision [24]. Rod mediated responses were recorded under dark adaptation using light flashes of 0.01 Cd·s/m². Mixed rod and cone mediated responses were recorded in response to light flashes of 3 Cd·s/m². Cone mediated responses were obtained to light flashes of 3 Cd·s/m² on a rod saturating background of 30 Cd/m². Oscillatory potentials (OP) were isolated using white flashes of 3 Cd·s/m² and band pass filtered between 100-10,000 Hz. The amplitudes of the a-wave, b-waves and OP were measured off-line [24] and results were averaged in both animal groups. The amplitude of the ERG recorded traces was measured by an observer blind to the animal genotype. ERG parameters recorded from *Cerkl^{wt/wt}* and *Cerkl^{KD/KO}* animals of different ages were statistically analyzed by a T-Student test.

Results

CRISPR/Cas9 deletion of the *Cerkl* locus

To produce the deletion of the whole *Cerkl* locus (97 Kb) and minimize potential off-target effects, the gene editing strategy selected relied on the use of the D10A Cas9 nickase, which requires four guides (gRNAs), two per site (Fig. 1A, and Supplementary Figs. S1 for guide RNA positions and details). This deletion encompassed from the proximal promoter to exon 12 but did not affect exon 13, which is also transcribed in the opposite direction as part of the *Integrin- α 4* 3'UTR. The mRNA encoding Cas9-D10A as well as the four gRNAs were injected into zygotes. Mosaic pups were genotyped by PCR to identify those carrying gene-edited alleles. Nearly 50 % of the microinjected mice were genetically modified at the target gene, either at the 5' and/or 3' gRNA target sites. Six out of 46 mice (13 %) carried the expected 97 Kb deletion (Fig. 1B), which

confirmed that large deletions could be generated with the same frequency as moderate deletions (less than 1 kb) with the Cas9 nickase. The microinjection of Cas9 mRNA instead of an expression plasmid restricted the action to the first zygote divisions, so that the number of alleles per mosaic was very low (mainly one –rarely two– modified alleles plus the wild-type). Specific primer pairs were designed to check both the deletion of the full locus as well as the gene edition at any of the two cleavage sites (Table 1). Once the specific band for the deletion or gene modification was identified, gene editing was confirmed by Sanger sequencing of the PCR bands (Supplementary Figs. S2). Our results showed that guides at 5' were much more successful than guides at 3', suggesting preferences in the endonuclease action probably by sequence context, secondary structure, and/or closeness between the PAM sequences of the two guides. Each of the six *Cerkl* deleted alleles showed different gene-edited sequences around the PAM sites (Supplementary Figs. S2). All the mosaic animals carrying the full *Cerkl*^{KO} allele were checked for off-target modifications (see Material and Methods section) and/or chromosomal rearrangements in the *Cerkl* locus, but none was identified (data not shown).

Table 1. Sequences of primers used in different PCR assays.

Name	Forward (5'→3')	Assay	Name	Reverse (5'→3')	Assay
<i>Cerkl</i> UF ₂	GAAGCCCTGA	CRISPR/Cas9	<i>Cerkl</i> UR	CTCTACCTGG	CRISPR/Cas9
	AGGAGACAAC TC			ATGCCGACAGC	
<i>Cerkl</i> DF	GAAAACCTGG	CRISPR/Cas9			
	GGCTATCTGG T				
<i>Cerkl</i> UF	CAGGACAGTT	CRISPR/Cas9 Genotyping	<i>Cerkl</i> DR	GGGAGCAGGG	CRISPR/Cas9 Genotyping
	CTGGAGTTGA TG			CTAGAGAGTA T	
<i>Cerkl</i> F ₁	ACACATTAGA AGCCCTGAAG GA	Genotyping	<i>Cerkl</i> R ₁	TCTTTGTGCTG	Genotyping
				TAGCAGTGAC	
			<i>Cerkl</i> R ₂	C TCTCCCGCTG TGATTGC	
<i>Thy-1</i> F	TCIGAGTGGCA AAGGACCTTAG G	Genotyping	<i>Thy-1</i> R	CGCTGAACTIG	Genotyping
				TGGCCGTTTAC G	
<i>NeuroD1</i> Fw	AACAAACAGGA AGTGGAACA TGACC	Real-Time qPCR	<i>NeuroD1</i> Rv	ACACTCATCT	Real-Time qPCR
				GTCCAGCTTG GG	
<i>Integrin α4</i> Fw	CAGTGGAGAG CCTTGTGGGA A	Real-Time qPCR	<i>Integrin</i> <i>α4</i> Rv	GTGCCACAA	Real-Time qPCR
				GTCACGATAG AGC	
<i>Actin β</i> Fw	GATGACCCAG ATCATGTTTGA GACC	Real-Time qPCR	<i>Actin β</i> Rv	CTCCGGAGTC	Real-Time qPCR
				CATCACAATG C	

***Cerkl* complete ablation causes embryonic/perinatal lethality**

To generate the *Cerkl*^{KO/KO} model, heterozygous mice were mated (in black and albino backgrounds). Unfortunately, after repeated attempts none of the live offspring mice were homozygous for the *Cerkl* deletion in any background. These unexpected results suggested that either the complete ablation of *Cerkl* expression or the deletion of nearly 100 kb of the *Cerkl* genomic locus was lethal. To test whether this lethality occurred during embryonic or perinatal stages, embryos (age E13-E18) from selected matings were genotyped. Only one out of 35 embryos was homozygous for the deletion, but no gross abnormalities could be observed in the *Cerkl*^{KO/KO} embryo (Fig. 1C).

Since the full *Cerkl* knockout model was lethal, we resorted to generate a new animal model in which the expression of *Cerkl* was extremely reduced, the double heterozygote *Cerkl*^{KD/KO}. *Cerkl*^{KD/KO} mice carry the knockout allele (KO) in trans with the knockdown allele *Cerkl*^{KD} (generated previously [18]). Of note, the matings between *Cerkl*^{KD/KO} double heterozygotes never produced a homozygote *Cerkl*^{KO/KO} animal. Altogether, considering all the live mice (67) and embryos (35) obtained by these multiple crossings, only one E18 embryo out of 102 animals was a full knockout, which confirms the lethality of this CRISPR gene edited allele in homozygosis (Chi-square test, $p < 0.0001$, Fig. 1D). The work presented here relies on the *Cerkl*^{KD/KO} mice as a model to study the retinal phenotype caused by *Cerkl* mutations.

***Cerkl* expression in the *Cerkl*^{KD/KO} murine retinas**

The murine *Cerkl* gene maps at chromosome 2 between *NeuroD1*, which is transcribed in the same direction as *Cerkl*, and *Itga4*, transcribed in the opposite direction. The *Cerkl* locus is relatively large and may contain regulatory region of the adjacent genes, and therefore, *Cerkl* deletion might alter their expression. The expression of *Cerkl* and flanking genes was quantified in adult murine retinas *Cerkl*^{KD/KO} (P60) by RT-qPCR and compared to other genotypes. In average, the expression levels of *Cerkl* in the retina were reduced down to 71% in the *Cerkl*^{WT/KO}, down to 42% in *Cerkl*^{KD/KD} (as reported previously [18]), and down to 8.5% in *Cerkl*^{KD/KO}. This drastic decrease in *Cerkl* expression in our model was statistically significant in comparison to *Cerkl*^{WT/WT} and any of the other genotypes (Fig. 1E), indicating that the double heterozygote could be used as a knockdown that barely expressed *Cerkl*. On the other hand, *Itga4* was apparently expressed at very similar levels in the different *Cerkl* genotypes (Fig. 1E). In contrast, *NeuroD1* expression was significantly reduced in *Cerkl*^{KD/KO} retinas in comparison with those of *Cerkl*^{WT/WT} ($p < 0.05$). *NeuroD1* expression was lower in all the genotypes that carried one allele with the full deletion of *Cerkl* in heterozygosis (Fig. 1E), and highly correlated with that of *Cerkl* in the different genotypes (Fig. 1F). These results may reflect the fact that *Cerkl* and *NeuroD1* share the same promoter (the *NeuroD1* promoter is an alternative promoter of *Cerkl*), but may also indicate that the *Cerkl* locus contains regulatory sequences of *NeuroD1*.

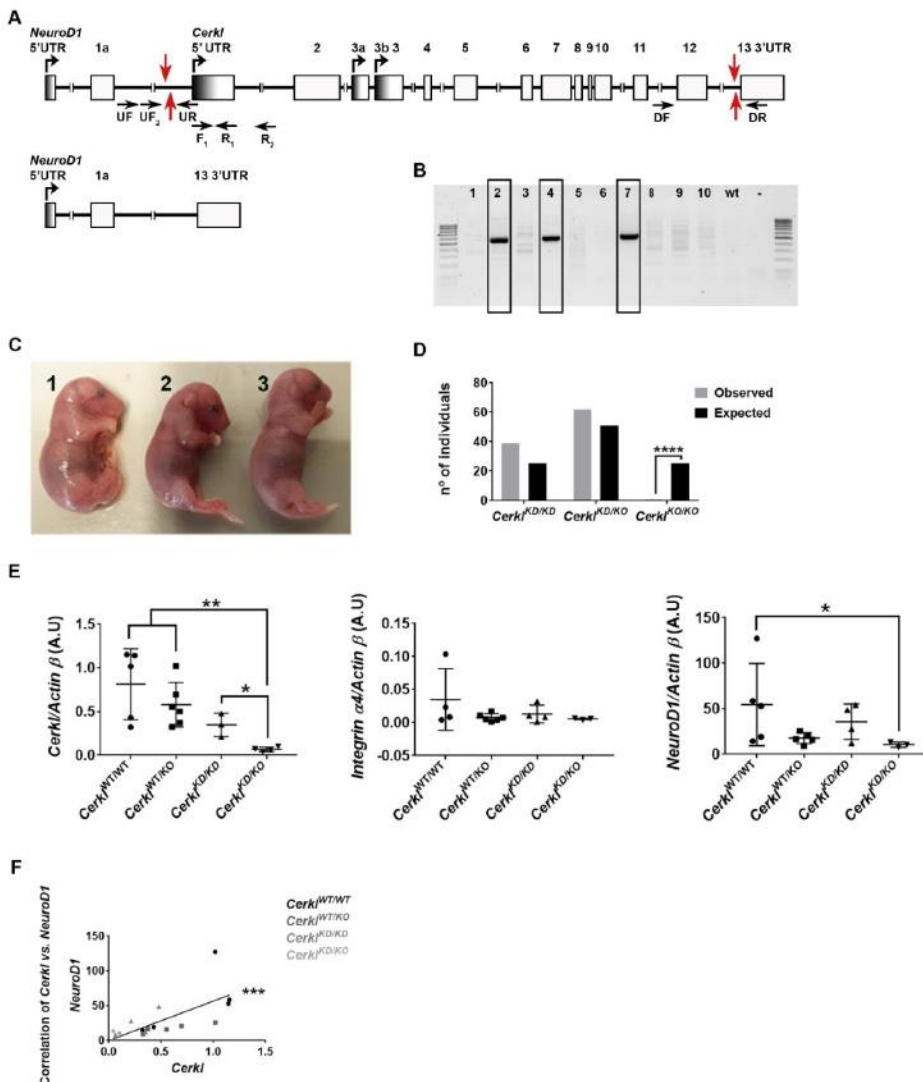


Figure 1. Generation of a *Cerkl*^{KO/KO} mouse model by CRISPR/Cas9 gene editing. (A) Representation of the *Cerkl* locus with the position of exons and active promoters in the retina, and of the targeting sequences for the four CRISPR guideRNAs (red arrows). The resulting gene structure of the CRISPR-edited allele with a full deletion from the proximal promoter to exon 13 is indicated below. Black arrows indicate the position of the primers used for genotyping. (B) PCR genotyping analysis (using primers UF and DR) of the mosaic *Cerkl*^{KO} pups obtained after CRISPR/Cas9 zygote microinjections. (C) Image of three E18 embryos, showing the only homozygous *Cerkl*^{KO/KO} mouse recovered (1) and the other two siblings, whose genotype was *Cerkl*^{KO/KO} (2 and 3). No gross morphological alterations were observed. (D) Complete ablation of the *Cerkl* locus causes perinatal lethality in mice. Only 1 embryo (E18, shown in C) out of 102 mice (adding embryos and newborns) from matings between *Cerkl*^{KO/KO} heterozygotes was a *Cerkl*^{KO/KO} homozygote. Chi-square test $p < 0.0001$ showed statistically significant differences among the expected (25%) and the observed results (0.98%) of the *Cerkl*^{KO/KO} genotype. The offspring of the matings was 1:2 instead of 1:2:1, thus supporting the lethality of the *Cerkl*^{KO/KO} genotype. (E-F) Effect of the *Cerkl* knockout allele on the expression levels of genes in the same locus. Transcriptional levels of *Cerkl*, *Integrin α4* and *NeuroD1* (E) in the retinas of *Cerkl* CRISPR-ed P60 mice ($n = 3-6$), C57BL/6J mice strain. Levels were normalized against *Actin B* expression. Statistical significance is indicated with asterisks (* p -value < 0.05 , ** p -value < 0.01 ; Mann-Whitney test). Correlation analysis between the *Cerkl* vs *NeuroD1* values (F) is also shown. Statistical significance, assessed by the Spearman correlation test, confirmed a strong correlation between the expression of *Cerkl* and *NeuroD1* genes (*** p -value < 0.001).

CERKL isoforms are differentially expressed in the murine retina

Cerkl shows a high transcriptional complexity with more than 20 transcripts and more than a dozen protein isoforms, due to alternative splicing and the use of at least three different alternative promoters [16]. To detect different CERKL isoforms several in-house antibodies were generated against the mouse protein, selecting domains that were not highly conserved between human and mouse sequences: anti-CERKL5 recognizes a peptide encoded in exon 5 whereas anti-CERKL2 recognizes a peptide encoded in exon 2. The specificity of the antibodies was tested against proteins encoded by CERKL constructs bearing deletions of the target peptide region of each antibody, and they showed specificity for the mouse but not the human CERKL protein (Fig. 2A). The antibodies were also tested using different mouse tissues, but the number and size of protein isoforms recognized by each antibody was difficult to assess due to the high number of protein isoforms produced by *Cerkl* (Fig. 2A).

These antibodies were used for immunohistochemistry on retinal cryosections to observe the spatial pattern of CERKL in the retina. CERKL expression was detected in the ganglion cell, inner nuclear and photoreceptor layers. Interestingly, when using anti-CERKL5 rods appeared more intensely labelled in contrast to the pattern detected with anti-CERKL2, which primarily labelled cones and their nuclei (Fig. 2B). These results indicated that different protein isoforms could be detected with antibodies against different domains. Using high-resolution confocal microscopy and focusing exclusively in the photoreceptor layer, we observed that the antibodies did not exclusively label rods or cones, but rather they recognized protein isoforms preferentially expressed in rods (anti-CERKL5) or cones (anti-CERKL2) (Fig. 2C, upper panel). These results indicate that distinct alternatively spliced isoforms carrying different protein domains are enriched in specific photoreceptor cell types. The specificity of these antibodies was validated on retinal cryosections of our *Cerkl^{KD/KO}* model, in which we barely detected CERKL expression, thus confirming the results of transcript analysis (Fig. 2C, lower panel). CERKL was also highly expressed in the retinal pigment epithelium (RPE), as detected by immunodetection with the two antibodies (Supplementary Figs. S3).

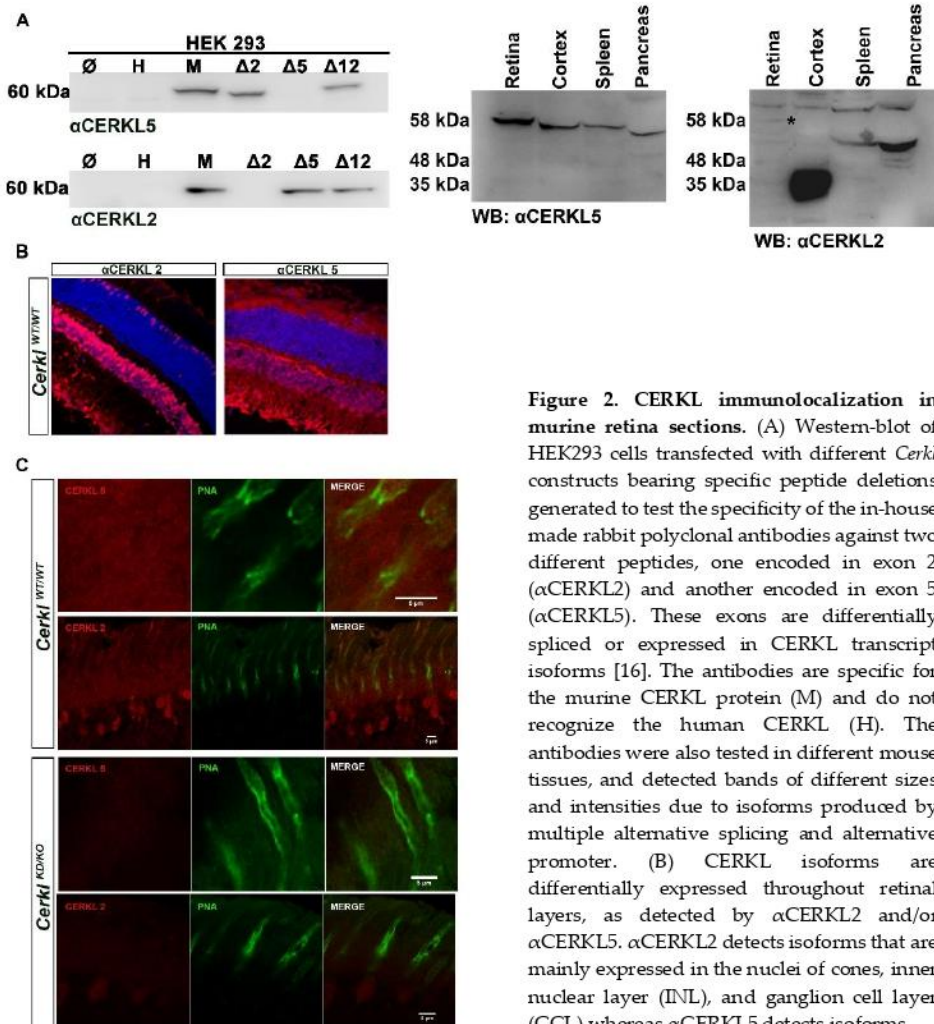


Figure 2. CERKL immunolocalization in murine retina sections. (A) Western-blot of HEK293 cells transfected with different *Cerkl* constructs bearing specific peptide deletions generated to test the specificity of the in-house made rabbit polyclonal antibodies against two different peptides, one encoded in exon 2 (α CERKL2) and another encoded in exon 5 (α CERKL5). These exons are differentially spliced or expressed in CERKL transcript isoforms [16]. The antibodies are specific for the murine CERKL protein (M) and do not recognize the human CERKL (H). The antibodies were also tested in different mouse tissues, and detected bands of different sizes and intensities due to isoforms produced by multiple alternative splicing and alternative promoter. (B) CERKL isoforms are differentially expressed throughout retinal layers, as detected by α CERKL2 and/or α CERKL5. α CERKL2 detects isoforms that are mainly expressed in the nuclei of cones, inner nuclear layer (INL), and ganglion cell layer (GCL) whereas α CERKL5 detects isoforms

highly expressed in rods, outer plexiform layer (OPL), inner nuclear and plexiform layers (INL and IPL) and ganglion cell layer. (C) High resolution confocal microscopy confirmed this preferential CERKL isoform distribution in photoreceptors, being the isoforms detected by α CERKL2 preferentially detected in cones (nuclei, inner and outer segments) and more weakly in rods, in contrast to the isoforms detected by α CERKL5, which are highly expressed in the inner and outer photoreceptor segments (both rods and cones), but undetectable in photoreceptor nuclei. Immunodetection of CERKL in the *Cerkl*^{KD/KO} mice retinas is strongly decreased, as expected by the low remaining levels of CERKL expression (below 20% of the *Cerkl*^{WT/WT} controls). CERKL (in red), PNA - peanut agglutinin (in green); nuclei counterstained with DAPI (in blue). All animals were C57BL/6J.

***Cerkl*^{KD/KO} retinas show photoreceptor cell layer alterations with a decreased number of cones**

We hypothesized that the low expression of *Cerkl* in our mouse model might mimic the effect of *CERKL* mutations in human patients. In humans, mutations in *CERKL* cause both retinitis pigmentosa (RP) or cone-rod dystrophy (CRD), and the phenotypic traits are usually reported in late teens or young adults. Therefore, we surmised that an age around 1 year old was an appropriate timeframe to detect retinal alterations solely due to the depletion in *Cerkl* expression and before age-related neurodegeneration might blur the genetic effect.

As a first approach, a comparative morphometric analysis of retinal morphology and layer structure between retinas from *Cerkl*^{KD/KO} and *Cerkl*^{WT/WT} mice were performed (Fig. 3). Regional differences in retinal thickness were clearly observed in the *Cerkl*^{KD/KO} retinas, which displayed a wavy outer nuclear layer, with zones with fewer nuclei and others with an increased number of nuclei compared to the wild-type counterparts (Fig. 3A, zoom magnification). Consistent observations showed that in the whole retina, half seemed thicker (with enlargement of the inner nuclear and plexiform layers) whereas the other half was apparently thinner in the *Cerkl*^{KD/KO} retinas (Fig. 3B, upper left panel). The most relevant observation was the consistent and significant decrease in the number of nuclei rows in the outer nuclear layer of the *Cerkl*^{KD/KO} mice detected in both sides of the retina. Notably, the number of photoreceptor nuclei rows was statistically significantly decreased along the whole retina of the *Cerkl*^{KD/KO}, which is a hallmark of severe retinal degeneration (Fig. 3B, upper right panel). Therefore, the *Cerkl*^{KD/KO} mice retina in comparison with the *Cerkl*^{WT/WT} exhibited irregular thickness along the retina, severe layer organization defects and a decreased number of photoreceptor nuclei.

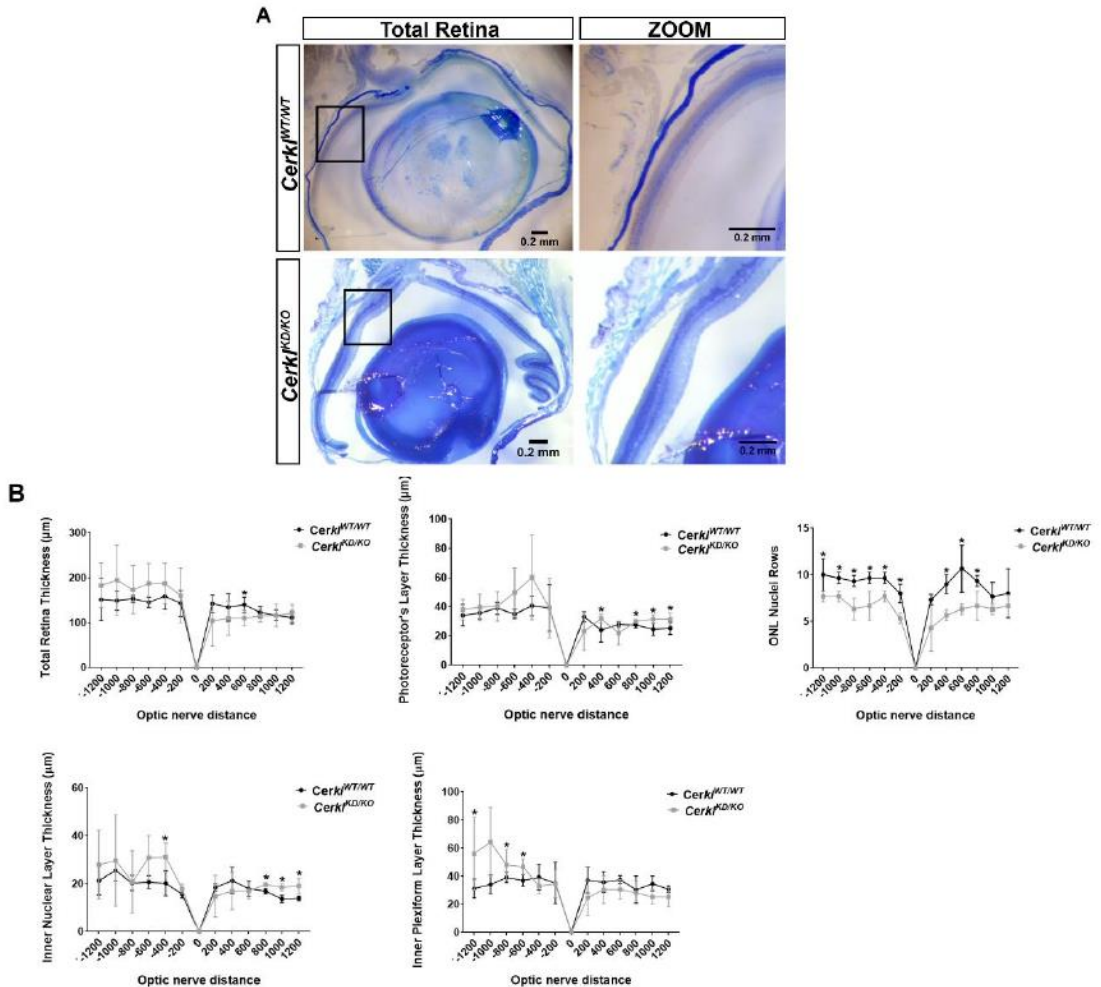


Figure 3. Retinal morphometric measures of *Cerk1^{KD/KO}* and *Cerk1^{WT/WT}* mice. (A) Stereo microscope representative images of *Cerk1^{KD/KO}* and *Cerk1^{WT/WT}* mouse retinas (semi-thin sections of epoxy-embedded eyes of 1-year-old mice) used for morphometry (n=3 per group). (B) The thickness of each retinal layer along the retina was measured at every 200 µm from the optic nerve, which was set up as point 0. Differences in retinal layer thickness were detectable in *Cerk1^{KD/KO}* retinas compared to controls. Statistically significant differences are indicated with asterisks (* p-value < 0.05, Mann-Whitney test). Scale bar in black (200 nm). Control and mutant animals were from Albino B6(Cg)-Tyrc-2/J/J strain background.

These results prompted us to determine whether rods or cones were most affected in the *Cerk1^{KD/KO}* mouse model. To study whether the decrease in the number of nuclei was progressive, the retinas of young (2 month-old) and older mice (≥ 11 month-old) were compared. The attrition of cone photoreceptors was evaluated by whole mount of retina stained with PNA to visualize and quantify the number of cones (Fig. 4, and Supplementary Figs. S4). The number of cones in old *Cerk1^{KD/KO}* mice (from 11-18 months of age, heretofore ≥ 11 month-old) was notably diminished in comparison to *Cerk1^{WT/WT}* (Fig. 4). This decrease in the number of cones is statistically significant,

and it is also detected in younger mice (2 months), when the values obtained within each genotype are more robust and compact. With age, the number of cones was more variable in both genotypes, but as mentioned, the decrease was more apparent in the *Cerkl*^{KD/KO} retinas. Therefore, the depletion of *Cerkl* expression caused an early-onset decrease in the number of cones, as detected in both young and old animals.

Of note, and as an external ocular phenotype, the lens of old, but not of young animals presented non-uniform calcified cataracts, which were not present in the wild-type animals (Supplementary Figs. S5). Although not often, some human patients bearing *CERKL* mutations have been reported to develop posterior subcapsular cataracts, very similar to those observed in our model [25], [26].

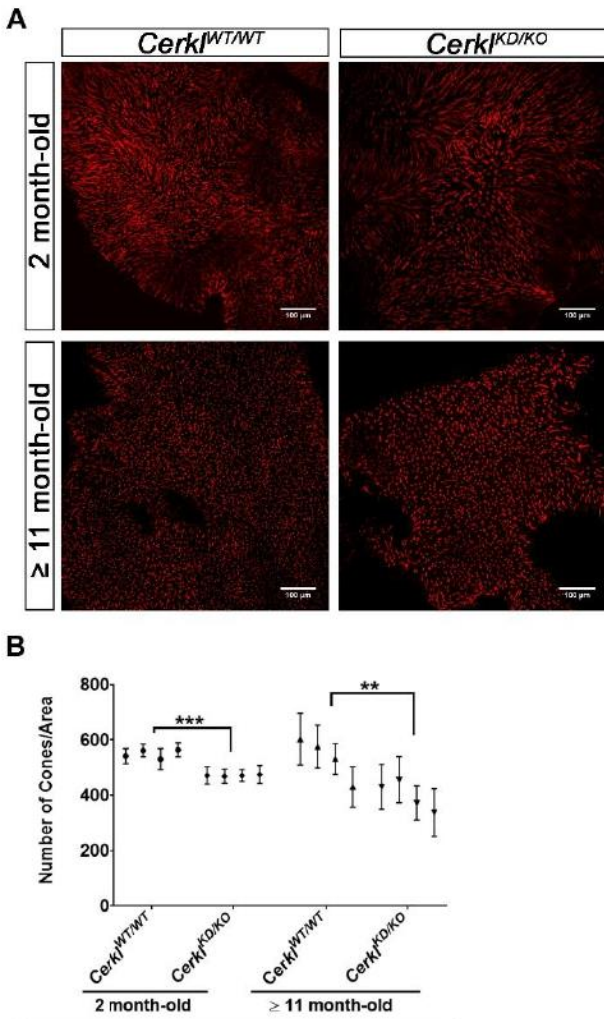


Figure 4. Cone count in whole mount retinas. (A) Murine retinas of *Cerkl*^{WT/WT} and *Cerkl*^{KD/KO} mice (n=4) at 2 months and ≥ 11 months of age were flattened, fixed and stained with PNA (peanut agglutinin) conjugated to AlexaFluor647 (in red). The number of cones was counted by positioning three ROIs (regions of interest) (area $164.79^2 \mu\text{m}^2$) in different parts of the image and summing the cones of each ROI. For each retina we analyzed 10-12 images in order to cover up the whole retina. (B) Statistical significance showed differences among genotypes by Two-Way ANOVA test, indicated with asterisks (** p-value <0.01 , *** p-value <0.001). Scale bar in white ($100 \mu\text{m}$). All animals were C57BL/6J.

whereas M/L-Opsin cones are more concentrated in the dorsal retina [27], [28] (blue and red gradient lines in the scheme on top in Fig. 5 indicate the opposing gradient of M/L- and S-opsin cones, respectively).

After immunodetection of rods (Rhodopsin) and cones (S-Opsin, M-Opsin and PNA, which stains all cone types), *Cerkl^{KD/KO}* retinas showed statistically significant longer rod outer segments (OSs) and cone sheaths along the dorsal retina of the retina, doubling the length of those in *Cerkl^{WT/WT}* (Fig. 5A and 5B, black bars at the side, 2 month-old mice). Besides, in these regions, S-Opsin and M-Opsin proteins are detected up to the mid of the cone sheath compared to what is observed in the *Cerkl^{WT/WT}* retinas (Figure 5, quantification panels at the right). In contrast, the length of rod OSs and cone sheaths, and the distribution of cone-opsins gradually returns to similar values of those of controls in the S-cone rich ventral retina (Fig. 5C). These results were also consistent in aged retinas (data not shown).

One of the traits of retinal neurodegeneration is retinal gliosis, which indicates a glial response to retinal dysfunction. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is considered a macroglia marker. *Cerkl^{KD/KO}* retinas show a marked and statistical increase in GFAP expression, thus indicating reactive gliosis due to retinal stress (Fig. 5D and 5E).

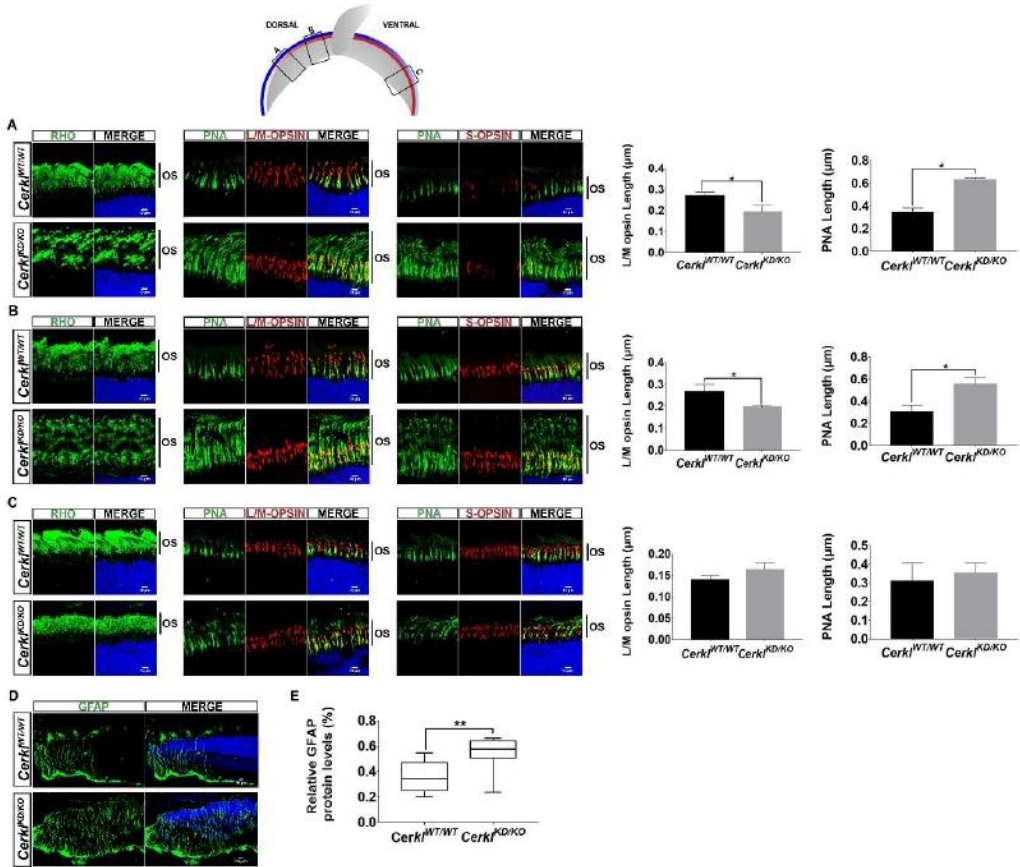


Figure 5. Alteration of photoreceptor OS length in *Cerkl^{KD/KO}* mice. The scheme at the top shows the position of the images in the dorsal and ventral retina. L/M- (line in blue) and S-opsin (line in red) cones are distributed in an opposing gradient. (A-C) Immunodetection of rhodopsin (green), L/M-Opsin and S-Opsin (each in red) in retinal cryosections at the optic nerve level of *Cerkl^{KD/KO}* versus the *Cerkl^{WT/WT}* mouse retinas showed a notable enlargement of the photoreceptor layer due to the elongation of the rod outer segments (OS) and cone sheaths (stained by PNA), as indicated by vertical bars. This OS elongation in *Cerkl^{KD/KO}* mice showed a consistent gradient distribution along the retina, being much more prominent at different locations of the dorsal retina (low number of S-opsin cones and high number of M-opsin cones) as shown in the (A) and (B) panels, and slowly decreasing to normal OS length in the ventral retina (higher number of S-Opsin cones and lower number of M-cones) in (C). Images representative of 3 different animals (2 months old). Quantification of cone sheath length (PNA) and L/M-Opsin localization in regions (A) and (B) show an elongation of the sheath and a shorter opsin-functional outer segment in *Cerkl^{KD/KO}* compared to *Cerkl^{WT/WT}* and suggest opsin mislocalization in dorsal but not in ventral retina (* $p < 0.05$ Mann-Whitney test). (D) Increased levels of GFAP (in green) were detected in retinal cryosections comparing *Cerkl^{WT/WT}* and *Cerkl^{KD/KO}* mice, which are indicative of macrogliosis. (E) The GFAP increase in the *Cerkl^{KD/KO}* mouse retinas compared to *Cerkl^{WT/WT}* was quantified by Western immunodetection and showed statistical significance ($n=8$ per group) (T-Student Test ($p < 0.01$)). In all images, nuclei are counterstained with DAPI (in blue). Scale bar in white (10 μm). All animals were C57BL/6J.

Stacking defects of the photoreceptor membraneous disks in the *Cerkl^{KD/KO}*

The ultrastructural alterations of the photoreceptor layer in this model were analysed by transmission electron microscopy (TEM) in old animals (Fig. 6). In wild-type retinas, photoreceptor OSs are ordered in parallel and packed with closely stacked membraneous disks (where photoreception and phototransduction occurs). However, *Cerkl^{KD/KO}* photoreceptors display disordered and loosely stacked disks, and the OS appear disarrayed (Fig 6A and 6B) (additional images in Supplementary Figs. S6). Quantification of photoreceptor OS length confirms that *Cerkl^{KD/KO}* photoreceptors are significantly longer than those of the controls (Fig 6A right panel) in accordance to what we observed in the confocal IHC images (Fig 5). Moreover, photoreceptor OSs in *Cerkl^{KD/KO}* show double membrane vesicles (indicated with a V) that disrupt the stacking of disks (Fig. 6C).

Increasing the magnification, the retinal pigment epithelium (RPE) morphology can be also studied. RPE performs the daily shedding of the photoreceptor OS tips by phagocytosis. A possible explanation for the extreme length of photoreceptor OSs observed in *Cerkl^{KD/KO}* retinas could rely on the alteration of RPE phagocytosis. This hypothesis is in accordance with the highly disorganized microvilli observed in this model compared to control retinas (Fig. 6B, indicated with an M). In this context, it is worth remarking that *Cerkl* is highly expressed in the RPE (Supplementary Figs. S3). According to our results, microvilli from control retinas surround the tip of photoreceptor OSs whereas *Cerkl^{KD/KO}* microvilli are disarrayed and do not wrap the OS tips, thus pointing to defective phagocytosis. Once within the RPE cell, the trafficking of the phagosome vesicles until fusion with lysosomes can be observed. Early and late phagosome vesicles can be distinguished from lysosomes by the density and colour of the captured material. We performed TEM imaging in albino strains, whose RPE does not have pigment in the melanosomes, and studied the number and distribution between apical and basal phagosomes/endosomes as well as lysosomes in old mouse RPEs (Fig. 6D). Although the number of total phagosomes does not significantly differ between *Cerkl^{KD/KO}* and control retinas of the same age (Fig. 6E, left), their distribution is altered and the number of basal endosomes is statistically significantly increased in the *Cerkl^{KD/KO}* model (Fig. 6E right). Besides, the total number of lysosomes is also altered between the two groups of animals, and increases close to two-fold in the RPE *Cerkl^{KD/KO}* (Fig. 6F).

In summary, *Cerkl^{KD/KO}* mouse retinas show: i) disarrayed photoreceptor segments, with disorganized and loosely stacked disks; ii) defects in retinal pigment epithelium microvilli; iii) round vesicles within photoreceptor OSs; iv) increased number of basal phagosomes/endosomes and total lysosomes in the RPE compared to *Cerkl^{WT/WT}*, all of which are highly indicative of retinal dysfunction and vision impairment.

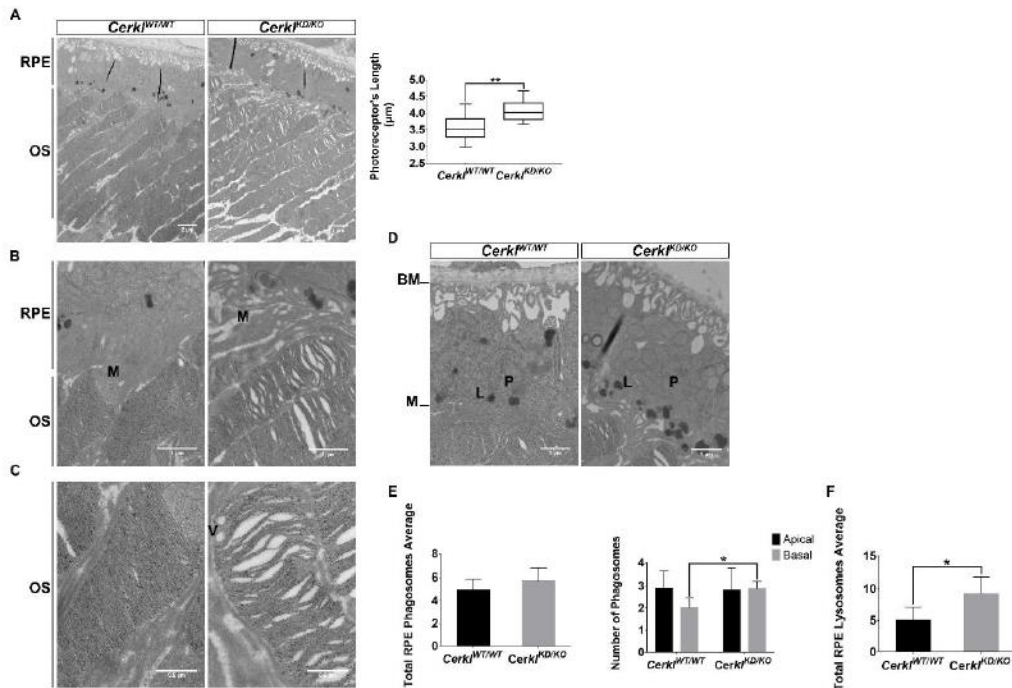


Figure 6. *Cerkl^{KD/KO}* retinas show defects in the photoreceptor outer segments and alterations in the RPE-mediated phagocytosis. (A-C) Retinas of *Cerkl^{KD/KO}* compared to *Cerkl^{WT/WT}* mice (all albino B6(Cg)-Tyrc-2/J/J mice) showed clear defects on photoreceptor OSs as revealed by transmission electron microscopy (TEM) at increasing magnifications (5000x, 20000x, 40000x). (A) The membranous disks of *Cerkl^{KD/KO}* photoreceptor OSs were loosely stacked and showed vacuoles in between disks compared to the compact disk staking in control retinas. Quantification of the photoreceptor OS length showed significant longer OSs in *Cerkl^{KD/KO}* photoreceptors compared to those of *Cerkl^{WT/WT}* mice (T-Student test (** $p < 0.01$) three measures per animal $n=3$ per genotype). (B) Besides, microvilli (indicated by M) from *Cerkl^{KD/KO}* mice retinal pigment epithelium (RPE) appeared disorganized instead of closely wrapped around the photoreceptor tips as observed in *Cerkl^{WT/WT}* RPE. (C) High magnification of the photoreceptor OS tips focusing on the disk disorganization in *Cerkl^{KD/KO}* compared to *Cerkl^{WT/WT}*. Double membrane vesicles (V) disrupt the membrane disk stacking in *Cerkl^{KD/KO}* OSs. Scale bars 2 μm , 1 μm , 0.5 μm , respectively. (D-F) TEM high magnification of *Cerkl^{KD/KO}* and *Cerkl^{WT/WT}* retinas to analyse the number and distribution of phagosomes and lysosomes within RPE cells. (D) Representative RPE images of *Cerkl^{KD/KO}* and *Cerkl^{WT/WT}* for analysing phagosomes (P) and lysosomes (L). Microvilli (M) are formed at the apical region whereas the Bruch membrane (BM) indicates the basal region. (E) The total number of phagosome/endosome vesicles are not significantly different (left), but a higher number of vesicles are observed in the RPE basal vs apical region in *Cerkl^{KD/KO}* compared to controls (right). (F) The total number of lysosomes is also increased in the RPE cells of *Cerkl^{KD/KO}*. (* $p < 0.05$, Mann-Whitney test; 15 representative images per retina, three animals per group). Scale bar is 1 μm . All animals were from Albino B6(Cg)-Tyrc-2/J/J mice strain.

In vitro and *in vivo* studies of neurite arborization in *Cerkl^{KD/KO}* in retinal ganglion cells

In the previous knockdown *Cerkl^{KD/KO}* mouse model, the retina showed no clear phenotype except for mild, although consistent and statistically significant, electrophysiological alterations in the oscillatory potentials (OPs) of retinal ganglion cells (RGCs). Since the double heterozygote *Cerkl^{KD/KO}* shows a lower level of *Cerkl* expression (less than 10% compared to controls), RGCs might be even more affected at the morphological and functional levels. To analyse the RGC

population phenotypic traits, we dissected retinas and cultured primary RGCs (P0-P1) for longer than one week *in vitro*. After one week, ganglion cells spread neurites, dendrites and axon, which could be distinguished and analysed (Fig. 7A). Notably, the axons of the *Cerkl^{KD/KO}* RGCs are shorter than those of control RGCs (Fig. 7B). Besides, the total number of neurites is statistically significantly higher (Fig. 7C), but the average length appears to be shorter (Fig. 7D). In fact, the number of primary neurites is increased although their length is not different (Fig. 7E). In summary, *in vitro* RGC primary cultures of *Cerkl^{KD/KO}* show differences in the arborization response, display shorter axons and increased number of neurites, although the length of the dendritic projections remains unaltered.

For the *in vivo* analysis of RGC's arborization, we used a Thy1-YFP-H transgenic line in which the YFP transgene is controlled by the Thy-1 promoter and expressed in a small fraction of RGCs [20]. We analysed the dendritic morphology of large field ganglion cells (Material and Methods) in flat whole mount retinas from *Cerkl^{KD/KO}/Thy1-YFP* adult mice compared to *Cerkl^{WT/WT}/Thy1-YFP* controls (Fig. 7G). The area of the dendritic field was determined as the area of a polygon obtained by joining the distal dendritic extremities. Besides, RGC dendrites were traced to determine the total dendritic length and the number of primary dendrites. In contrast to the *in vitro* results, no clear morphological differences were apparent between RGCs from *Cerkl^{WT/WT}/Thy1-YFP* and *Cerkl^{KD/KO}/Thy1-YFP* retinas, neither in total dendrite length, dendritic field area nor number of primary dendrites (Fig. 7H-J), pointing to a differential response to the stress of dissection and culture more than to an intrinsic trait.

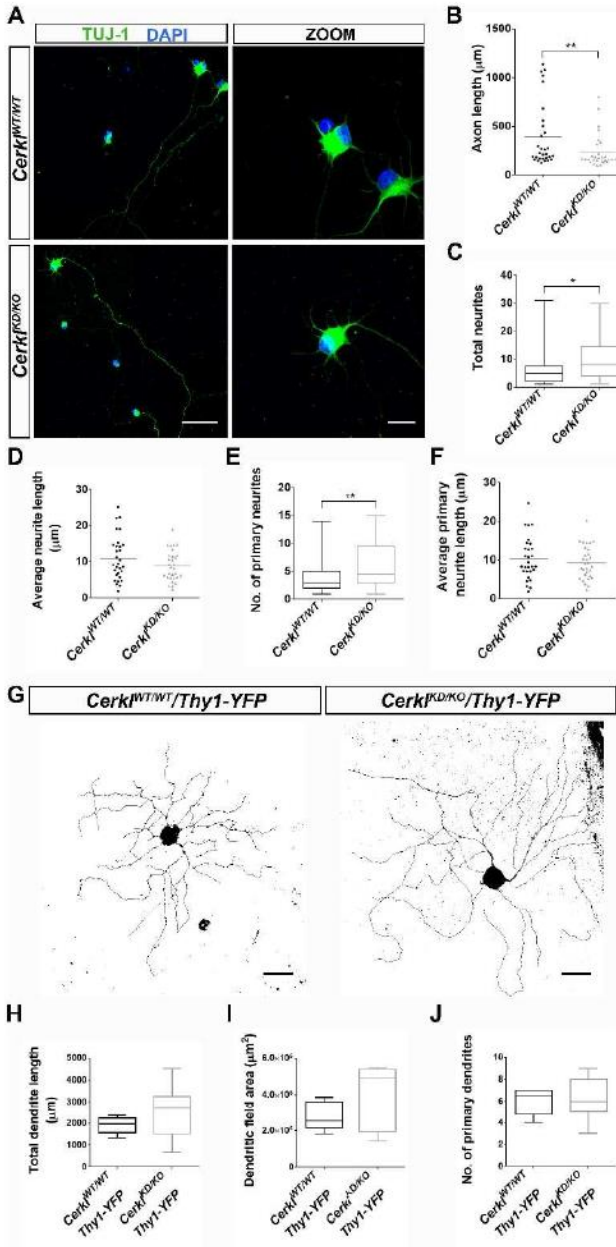


Figure 7. Differences in neurite arborization between *Cerkl^{DKKO}* and *Cerkl^{WT/WT}* retinal ganglion cells (RGCs). (A-F) *in vitro* RGC neurite arborization after one week of primary cell culture of P0 retinas. (A) Representative confocal images of primary RGCs from *Cerkl^{WT/WT}* and *Cerkl^{DKKO}* mice. TUJ-1 labels neuronal cells (green) and nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bars: 50 μm , and 15 μm in high magnification micrographs. (B) Axon length quantification showed that axons were significantly shorter in *Cerkl^{DKKO}* RGCs compared to those in *Cerkl^{WT/WT}*. (C-D) Analysis of total RGC neurites, showed that although the total number was slightly higher in *Cerkl^{DKKO}* compared to *Cerkl^{WT/WT}* mice (C), their average length was very similar between the two genotypes (D). (E-F) Analysis of primary RGC neurites pointed to slight significant differences in the number (E) but not in their average length (F) between genotypes. Results are presented as mean \pm SEM (n = a total of 30 neurons from 4-6 animals per group). (G-J) *In vivo* RGC neurite arborization. (G) Dendritic arborization of retinal ganglion cells *in vivo* in *Cerkl^{WT/WT}/Thy1-YFP* and *Cerkl^{DKKO}/Thy1-YFP* transgenic mice. Projected z-stacks of YFP-labelled large field ganglion cells in *Cerkl^{WT/WT}/Thy1-YFP* and

Cerkl^{DKKO}/Thy1-YFP adult mice. Scale bar: 100 μm (H-J) No significant differences were found between genotypes when measuring *in vivo* total dendritic length (H), dendritic field area (I) and number of primary dendrites (J). Results are presented as mean \pm SEM (n = 6-7 neurons from 3-5 animals). Statistical analyses were performed by either T-test (C-F) or Mann-Whitney test (B, H-J), depending whether they adjusted or not to normality, respectively. (* p-value \leq 0.05, ** p-value \leq 0.01).

Retinal electrophysiology of the *Cerkl^{KD/KO}* mice

In the previous knockdown *Cerkl^{KD/KD}* mouse model, the ERGs or the retinal morphology did not show any clear retinal neurodegeneration phenotype except for the alterations in the oscillatory potentials (OPs). This phenotype remained consistent and was not progressive with age. We surmised that this new model, with a lower expression of *Cerkl*, might show some retinal neurodegeneration detectable by ERGs. In young-adult mice (from 6 to 10 month-old) we do not observe significant changes in any of the ERG measurements in comparison with wild-type animals (Fig. 8A). Since Retinitis Pigmentosa in humans is characterized by the progressive loss of photoreceptors, we deemed it reasonable to study the same cohort of animals (the two groups of animals) at older ages. Retinal degeneration is clearly observed in 18 month-old *Cerkl^{KD/KO}* compared to *Cerkl^{WT/WT}* mice (Fig. 8B). Rod (b-scot) and cone (b-phot) activity is statistically significantly diminished, particularly in cones. These alterations are also reflected in postsynaptic photoreceptor activity (b-mix). In accordance with the previous mouse model, the response of OPs, mostly contributed by the electrical activity of retinal ganglion cells (RGCs) and amacrine cells, is the most affected recording. Taking the morphometric and retinal morphology studies together with the ERGs, the *Cerkl^{KD/KO}* retinas show clear phenotypic structural alterations from a young age, but the electrophysiological response is not affected initially. However, with time, the abrogation of *Cerkl* expression causes progressive retinal dysfunction and vision impairment, similarly to what occurs in humans carrying mutations in the *CERKL* gene.

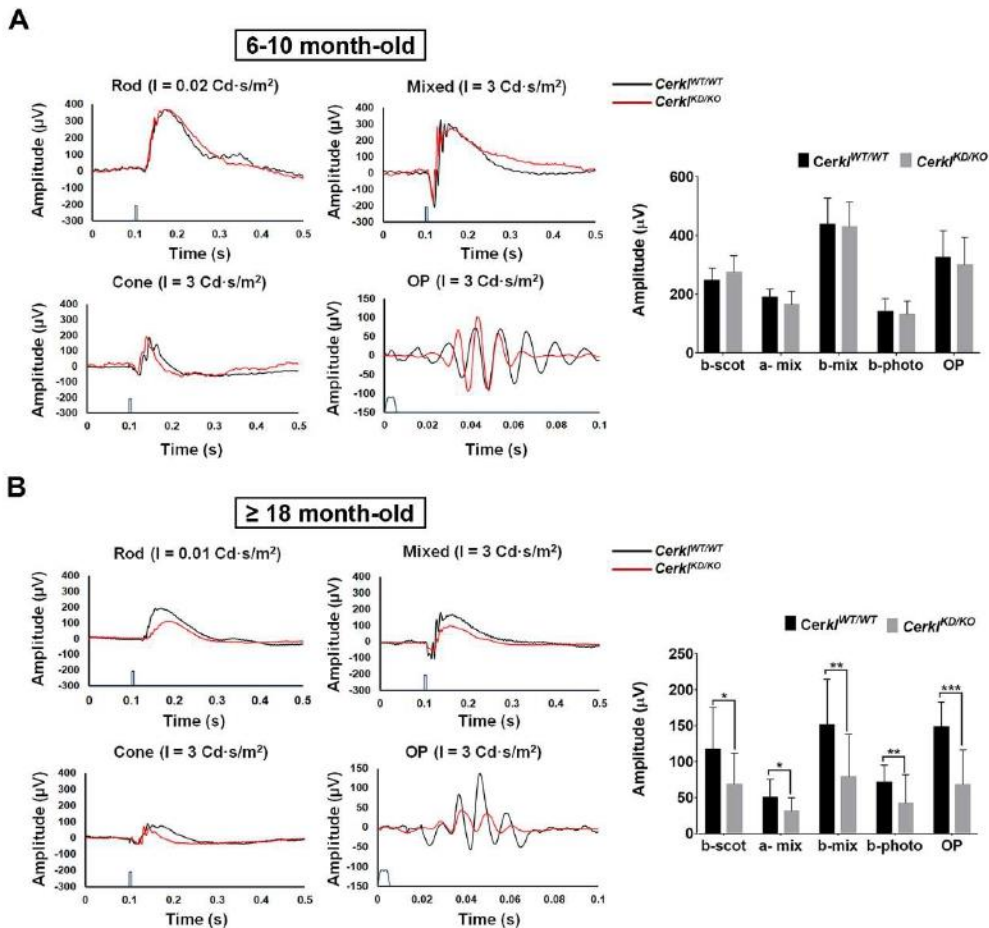


Figure 8. Electrophysiological recordings (ERGs) of *Cerkl*^{KD/KO} show progressive neurodegeneration and functional alteration of both rods and cones in aged mice. Representative ERG recordings obtained from one *Cerkl*^{WT/WT} animal (black traces) and one *Cerkl*^{KD/KO} animal (red traces), and histogram representation of the averaged ERG wave amplitude for the two animal groups. (A) ERG measurements in young *Cerkl*^{KD/KO} mice (6-10 months) show no clear alteration in neither photoreceptor function in scotopic (rods) and photopic (cones) conditions nor post-synaptic activity compared to age-matched controls (n = 6-8 animals per group). (B) In contrast, after aging (≥ 18 months), the same cohort of animals show scotopic (b-scot) and photopic (b-photo) alterations in *Cerkl*^{KD/KO} retinas, with a clear decrease in photoreceptor activity (a-mix, considering both rod and cone activity). This decrease is also observed in post-synaptic activity (b-mix) and is particularly evident in oscillatory potentials (OP) reflecting the synaptic activity of RGC and amacrine cells, overall indicating a progressive functional impairment of the retina in *Cerkl*^{KD/KO} mice. Timing of stimulus application is shown on the time scale (for light stimuli details see the Material and Methods section). Bars represent data (Mean ± SD) of b-scot, a-mix, b-mix, b-photo and OP from *Cerkl*^{WT/WT} and *Cerkl*^{KD/KO} mice. Statistical significant differences (one tailed T-student test) are indicated above the histogram bars (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001). All the recordings were obtained from C57BL/6J mice strain.

Discussion

Previous attempts to generate animal models to unveil *CERKL* physiological function have been hampered by the high transcriptional complexity of *CERKL* [16]–[19]. Our first mouse model retained the expression of several *Cerkl* isoforms (40% of *Cerkl* expression) and did not show any severe retinal disorder but for a mild RGC alteration [18]. *CERKL* is one of the most prevalent genes in the Spanish cohort of patients affected with autosomal recessive RP or CRD (5% prevalence) [26]. Since no other mouse model of retinal degeneration was available for this gene, we generated a novel *Cerkl* knockout mouse model by CRISPR/Cas9 gene-editing. Unfortunately, the complete ablation of *Cerkl* is not viable in homozygosis. Therefore, we generated the double heterozygote *Cerkl*^{KD/KO}, which retains less than 10% of *Cerkl* expression, and thus provided a valuable model of slow retinal degeneration (physiological alterations are observed at 18 month-old but not at 6-10 month-old mice), which mimics the relatively late onset (second decade of life) but progressive degenerative disease observed in most patients bearing *CERKL* mutations.

The lethality of complete *Cerkl* ablation could be explained by either *CERKL* function being directly required for organism viability, or by the presence of relevant regulatory elements for nearby genes embedded in the *Cerkl* locus. *Cerk* is rather ubiquitously expressed, including many vital organs [4], [16] so lethality due to full *Cerkl* abrogation cannot be discarded. On the other hand, several *cis*-regulatory elements (enhancer sequences) have been functionally described within the *CERKL* locus (description available at <https://www.genecards.org/> and <https://genome.ucsc.edu/>) in human cell lines, and appear to be physically associated to both *CERKL* and the upstream *NEUROD1* gene promoters. The evolutionary conservation of these super-enhancers in vertebrate genomes supports their functional relevance. *NeuroD1* is a neural and pancreatic transcription factor implicated in cell cycle regulation, retinal cell genesis and neuronal development [29], [30], and *NeuroD1* null mice die few days after birth due to severe diabetes [31]. Since we have observed that the deletion of *Cerkl* significantly decreases the expression of *NeuroD1*, a plausible explanation for the lethality caused by the homozygous *Cerkl* deletion may be caused by both the direct loss of *Cerkl* expression in vital organs, such as liver or lungs, and the very low expression of *NeuroD1* caused by the deletion of its enhancers. Further evidences should be gathered to understand the causes of the lethality associated to *Cerkl* locus deletion. It is worth noting that the most common *CERKL* mutation in humans (found in homozygosis and most often in double heterozygosis with other rarer mutations), c.847C>T (p.R283*) [4], is not a complete null allele since the mutation introduces a stop codon in exon 5, an exon that is included in some but not all isoforms due to alternative splicing [16].

The high transcriptional complexity of *Cerkl* in the retina suggested preferential isoform expression in different neuron cell types. This is why we generated different in-house antibodies, *CERKL2* and *CERKL5*, against peptides encoded in different exons which recognize a different subset of *CERKL* isoforms. Immunohistochemistry of mouse retinal cryosections and high-resolution microscopy showed that isoforms containing exon 2 are preferentially expressed in cones whereas those containing exon 5 are more expressed in rods, thus supporting that different *CERKL* isoforms are preferentially expressed in rods vs cones, and also lending credence to a differential function for the multiple isoforms. Further work on the effect of reported mutations on the function of *CERKL* different isoforms may explain why in some patients the phenotypic traits are clinically associated to retinitis pigmentosa (RP) or cone-rod dystrophy (CRD), which

differ on whether rods (peripheral retina) or cones (macula) are first affected, respectively (see Supplementary Table S2, for a complete list of CERKL mutations and reported retinal phenotypes in human patients). However, genotype-phenotype correlation in human patients may be particularly difficult for *CERKL*, since the same pathogenic mutation in homozygosis can cause either arRP with high macular affectation [25] or arCRD [7], [32] not only in different families but also in sibling patients within the same family [33], the main conclusion being that CERKL function is relevant for both types of photoreceptors. Besides, the severity of the retinopathy and visual loss in humans are also dissimilar even in homozygous patients of the same family. Overall, it is tempting to speculate that both the type of mutation and the CERKL isoform affected, as well as additional mutations of modifier genes in each patient, might eventually determine which type of photoreceptors is initially more vulnerable to *CERKL* dysfunction; yet once photoreceptor apoptosis is initiated, the disease progresses until all photoreceptors and eventually, all the retina –including inner cells– is affected. In this context, mice do not have a macula, but our mouse model is more similar to the CRD phenotype, as we will discuss below.

Concerning the retinal phenotype in this *Cerkl^{KD/KO}* mouse model, we observed an extreme elongation of rod OSs and cone sheaths, and opsin mislocalization in cone OSs at early age (2 month-old retinas) following a dorsal to ventral longitudinal gradient in the retina, thus indicating an as yet unknown *Cerkl* role in photoreceptor patterning. Furthermore, these very low levels of *Cerkl* expression lead to photoreceptor OS disorganization, severe disk stacking alteration, and vesicle accumulation. All these features could be explained by RPE phagocytosis dysfunction. In this context, a very recent report also associates suppression of *Cerkl* expression to defects in autophagy/macrophagy [34]. It is worth noting that aged *Cerkl^{KD/KO}* retinas (18 month-old) display disarrayed RPE microvilli unable to engulf OS tips. In fact, the *Cerkl^{KD/KO}* RPE shows high microvilli disorganization, phagosome accumulation in the basal membrane and an increased number of total lysosomes, in full accordance with the results reported in a zebrafish *Cerkl* knockout model [35], overall suggesting a novel retinal role for CERKL in the regulation of vesicle formation, autophagy and OS phagocytosis.

Another morphological defect observed in the *Cerkl^{KD/KO}* mouse retinas is the difference in retinal thickness, probably due to the contribution of several traits: differential decrease in the number of nuclei rows, different thickness of the inner plexiform layer and regional differences in the length of the photoreceptor OS in an inverted gradient to S-opsin cone distribution. This relates with a slow but progressive neurodegeneration in aged *Cerkl^{KD/KO}* retinas, as shown by progressive loss of cones and a clear decrease in the number of photoreceptor nuclei with time. Remarkably, similar traits are observed in human patients bearing *CERKL* mutations in advanced disease stages, with thinning of the fovea (extremely rich in cones) with loss of the outer nuclear layer (ONL) or abnormal lamination, as visualized by careful OCT (optic coherence tomography) imaging [7], [25], [30]. The drastic reduction of *Cerkl* expression impinges in retinal homeostasis, and consequently, GFAP expression by retinal astrocytes and Müller cells appears increased in *Cerkl^{KD/KO}*, similarly to what has been shown in mouse models for retinitis pigmentosa and other IRDs [28], [36].

To sum up, we generated a new *Cerkl* mouse model retaining less than 10% of *Cerkl* expression that mimics human CRD traits due to early cone loss and subsequent progressive degeneration of all photoreceptors. With age, our mouse model shows decreased number of cones, loss of

photoreceptor nuclei, elongated OSs with mislocalized opsins, alterations in the RPE microvilli and phagocytosis, and stress-associated alterations (such as increased GFAP expression). These morphological alterations cause retinal physiological dysfunction and trigger photoreceptor apoptosis. Remarkably, the initial ERGs to 6 month-old mice (young mice) did not show significant differences between and age-matched controls, but electrophysiological altered responses became very apparent in 18 month-old mice. In this respect, although not all the phenotypic traits are shared between human and mouse, the retinal phenotype of the *Cerkl^{KO/KO}* mouse model is by far more similar to the slow and progressive retinal neurodegeneration shown by human patients bearing the most prevalent *CERKL* mutation (p.R283*) than other reported mouse models. This valuable model will be instrumental to dissect the role of *CERKL* in the retina and test the efficacy of potential therapeutic approaches.

Funding

This research was supported by grants SAF2013-49069-C2-1-R, SAF2016-80937-R (Ministerio de Economía y Competitividad/FEDER), ACCI 2015 and ACCI 2016 (CIBERER /ISCIII) and 2017 SGR 738 (Generalitat de Catalunya) to GM; La Marató TV3 (Project Marató 201417-30-31-32) and FUNDALUCE funding for research projects to RGD; and the Instituto de Salud Carlos III, cofounded with the European Regional Development Fund (ERDF) within the “Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2017–2020” (RD16/0008/0020; FIS/PI18-00754) to PdIv. EBD is a fellow of the FI-2017 (Generalitat de Catalunya). SM has a post-doctoral contract by CIBERER /ISCIII.

Acknowledgements

The authors wish to thank the support and commitment of patients and associations to this work. The authors also acknowledge the technical support of Alba Pons-Pons and Paula Escudero-Ferruz.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] Ferrari S, Di Iorio E, Barbaro V, Ponzin D, Sorrentino FS, Parmeggiani F. Retinitis Pigmentosa: Genes and Disease Mechanisms. *Curr. Genomics*. 2011;12:238–249.
- [2] Haim M. Epidemiology of retinitis pigmentosa in Denmark. *Acta Ophthalmol. Scand*. 2002;80:1–34.
- [3] Verbakel SK, van Huet RAC, Boon CJF, et al. Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Prog. Retin. Eye Res*. 2018;66:157–186.
- [4] Tuson M, Marfany G, and González-Duarte R. Mutation of *CERKL*, a Novel Human Ceramide Kinase Gene, Causes Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa (RP26). *Am. J. Hum. Genet*. 2004;74:128–138.

- [5] Littink K.W, Koenekoop RK, van den Born LI, *et al.* Homozygosity mapping in patients with cone-rod dystrophy: Novel mutations and clinical characterizations. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010;51:5943–5951.
- [6] Auslender N, Sharon D, Abbasi AH, Garzoni HJ, Banin E, and Ben-Yosef T. A common founder mutation of *CERKL* underlies autosomal recessive retinal degeneration with early macular involvement among Yemenite Jews. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007;48:5431–5438.
- [7] Aleman TS, Soumitra N, Cideciyan AV, *et al.* *CERKL* mutations cause an autosomal recessive cone-rod dystrophy with inner retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009;50:5944–5954.
- [8] Ali M, Ramprasad VL, Soumitra N, *et al.* A missense mutation in the nuclear localization signal sequence of *CERKL* (p.R106S) causes autosomal recessive retinal degeneration. *Mol. Vis.* 2008;14:1960–1964.
- [9] Inagaki Y, Mitsutake S, Igarashi Y. Identification of a nuclear localization signal in the retinitis pigmentosa-mutated RP26 protein, ceramide kinase-like protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;343:982–987.
- [10] Gomez-Muñoz A, Gangoiti P, Arana L, *et al.* New insights on the role of ceramide 1-phosphate in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 2013;1831:1060–1066.
- [11] Gómez-Muñoz A, Gangoit P, Granado MH, Arana L, Ouro A. Ceramide-1-Phosphate in Cell Survival and Inflammatory Signaling, in *Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules*, C. Chalfant and M. Del Poeta, Eds. New York, NY: Springer New York. 2010; pp. 118–130.
- [12] Bomancin F, Metdcheriakova D, Stora S, *et al.* Characterization of a ceramide kinase-like protein. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 2005;1687:31–43.
- [13] Tuson M, Garanto A, González-Duarte R, Marfany G. Overexpression of *CERKL*, a gene responsible for retinitis pigmentosa in humans, protects cells from apoptosis induced by oxidative stress. *Mol. Vis.* 2009;15:168–180.
- [14] Li C, Wang L, Zhang J, *et al.* *CERKL* interacts with mitochondrial TRX2 and protects retinal cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2014;1842:1121–1129.
- [15] Fathinajafabadi A, Pérez-Jiménez E, Riera M, Knecht E González-Duarte R. *CERKL*, a retinal disease gene, encodes an mRNA-binding protein that localizes in compact and untranslated mRNPs associated with microtubules. *PLoS One.* 2014;9: e87898.
- [16] Garanto A, Riera M, Pomares E, *et al.* High transcriptional complexity of the retinitis pigmentosa *CERKL* gene in human and mouse. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011;52:5202–5214.
- [17] Graf C, Niwa S, Müller M, Kinzel B, Bomancin F. Wild-type levels of ceramide and ceramide-1-phosphate in the retina of ceramide kinase-like-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;373:159–163.
- [18] Garanto A, Vicente-Tejedor J, Riera M, *et al.* Targeted knockdown of *Cerkl*, a retinal dystrophy gene, causes mild affection of the retinal ganglion cell layer. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2012;1822:1258–1269.
- [19] Riera M, Burguera D, Garcia-Fernández J, González-Duarte R. *CERKL* Knockdown Causes Retinal Degeneration in Zebrafish. *PLoS One.* 2013;8: e64048.
- [20] Feng G, Mellor RH, Bernstein M, *et al.* Neurotechnique Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP. *Neuron.* 2000;28:41–51.
- [21] Toulis V, Garanto A, Marfany G. Combining Zebrafish and Mouse Models to Test the Function of Deubiquitinating Enzyme (DUBs) Genes in Development: Role of USP45 in the Retina, in *Proteostasis: Methods and Protocols*, R. Matthiesen, Ed. New York, NY: Springer New York. 2016; pp. 85–101.
- [22] Sun W, Li N, He S. Large-scale morphological survey of mouse retinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.* 2002;451:115–126.
- [23] Kong JH, Fish DR, Rockhill RL, Masland RH. Diversity of ganglion cells in the mouse retina: Unsupervised morphological classification and its limits. *J. Comp. Neurol.* 2005;489:293–310.
- [24] McCulloch DL, Marmor MF, Brigell MG, *et al.* ISCEV Standard for full-field clinical

- electroretinography (2015 update). *Doc. Ophthalmol.* 2015;130:1–12.
- [25] Avila-Fernandez A, Riveiro-Alvarez R, Vallespin E, et al. CERKL mutations and associated phenotypes in seven Spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008;49:2709–2713.
- [26] Zahid S, Branham K, Schlegel D, et al. CERKL, in *Retinal Dystrophy Gene Atlas*, Cham: Springer International Publishing. 2018;pp. 51–53.
- [27] Roberts MR, Sirinivas M, Forrest D, Morreale de Escobar G, Reh TA. Making the gradient: Thyroid hormone regulates cone opsin expression in the developing mouse retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103:6218–6223.
- [28] Chen J, Nathans J. Genetic ablation of cone photoreceptors eliminates retinal folds in the *retinal degeneration 7 (rd7)* mouse. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007;48:2799–2805.
- [29] Ochocinska MJ, Muñoz EM, Veleri S, et al. NeuroD1 is required for survival of photoreceptors but not pinealocytes: Results from targeted gene deletion studies. *J. Neurochem.* 2012;123:44–59.
- [30] Pan N, Jahan I, Lee JE, Fritzscht B. Defects in the cerebella of conditional *Neurod1* null mice correlate with effective Tg(Atoh1-cre) recombination and granule cell requirements for *Neurod1* for differentiation. *Cell Tissue Res.* 2009; 337:407–428.
- [31] Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, et al., “Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/NeuroD-deficient mice. *Genes Dev.* 1997;11:2323–2334.
- [32] Sensiglio JD, Cho GY, Paavo M, et al. Hyperautofluorescent dots are characteristic in Ceramide kinase like-associated retinal degeneration. *Sci. Rep.* 2019;9:876.
- [33] Rodríguez-Muñoz A, Aller E, Jaijo T, et al. Expanding the clinical and molecular Heterogeneity of nonsyndromic inherited retinal dystrophies. *J. Mol. Diagn.* 2020;doi:10.1016/j.jmoldx.2020.01.003.
- [34] Hu X, Lu Z, Yu S, et al. CERKL regulates autophagy via the NAD-dependent deacetylase SIRT1. *Autophagy.* 2019;15:453–465.
- [35] Yu S, Li C, Biswas L, et al. CERKL gene knockout disturbs photoreceptor outer segment phagocytosis and causes rod-cone dystrophy in zebrafish. *Hum. Mol. Genet.* 2017;26:2335–2345.
- [36] Roche SL, Ruiz-Lopez AM, Moloney JN, Byrne AM, Cotter TG. Microglial-induced Müller cell gliosis is attenuated by progesterone in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Glia.* 2018;66:295–310.

Supplementary Table 1. List of primers used for testing gene editing in potential off-target regions.

Name	Primers (5'→3')	Region
<i>Cerkl</i> 53 DR274F	taggCCTTATATGAGGGGGTGGTC	5'
<i>Cerkl</i> 53 pX330F	caccCCTTATATGAGGGGGTGGTC	5'
<i>Cerkl</i> 53 R	aaacGACCACCCCTCATATAAGG	5'
<i>Cerkl</i> 54 DR274F	taggCCTGACCACCCCTCATATA	5'
<i>Cerkl</i> 54 pX330F	caccCCTGACCACCCCTCATATA	5'
<i>Cerkl</i> 54 R	aaacTATATGAGGGGGTGGTCAGG	5'
<i>Cerkl</i> 33 DR274F	taggATCTTCTGCTGGGCTTAGG	3'
<i>Cerkl</i> 33 pX330F	caccATCTTCTGCTGGGCTTAGG	3'
<i>Cerkl</i> 33R	aaacCCTAAGCCCAAGCAGAAGAT	3'
<i>Cerkl</i> 34 DR274F	taggACAAACCTGAGCATTATGC	3'
<i>Cerkl</i> 34 pX330F	caccACAAACCTGAGCATTATGC	3'
<i>Cerkl</i> 34R	aaacGCATAAATGCTCAGGTTTGT	3'

Supplementary Table 2. List of reported *CERKL* mutations in human patients, classified by their molecular effect, indicating the nucleotide and amino acid change, if reported in homo- or hetero-zygosis, and the associated clinical retinal phenotype (references at the end).

<i>CERKL</i> non-synonymous mutations (non-sense and missense)				
Mutation	Localization	Aminoacid change	Zygosis	Retinal dystrophy
GAG-TAG	c.193G>T	p.E65*	HM ^[1] HT ^[2]	RCD, MD
CGT-TGT	c.316C>T	p.R106C	HT ^[1]	arRP
CGT-AGT	c.316C>A	p.R106S	HM ^[3]	arRP
GGT-GAT	c.356G>A	p.G119D	HT ^[4]	CRD
CTC-CGC	c.365T>G	p.L122R	HM ^[5]	RP
TGC-TGG	c.375C>G	p.C125W	HM ^[6]	CRD
CTA-CCA	c.398T>C	p.L133P	HT ^[7]	RP
TGG-GGG	c.451T>G	p.W151G	HT ^[8]	RD
CCG-CTG	c.497C>T	p.P166L	HT ^[9]	MD
AAA-TAA	c.598A>T	p.K200*	HT ^[10]	RP
CAG-TAG	c.664C>T	p.Q222*	HT ^[11]	arRP
GAT-GTT	c.674A>T	p.D225V	HT ^[12]	RP
GGA-AGA	c.772G>A	p.G258R	HT ^[13]	CRD
CTG-CCG	c.812T>C	p.L271P	HM ^[14]	RP
CGA-TGA	c.847C>T	p.R283*	HM ^[15] HT ^[2]	RP, CRD
ATA-ACA	c.890T>C	p.I297T	HM ^[16]	RP, RCD
TGC-TGA	c.999C>A	p.C333*	HM ^[17]	CRD
CGA-TGA	c.1090C>T	p.R364*	HM ^[18]	CD, CRD
TGT-TGA	c.1164T>A	p.C388*	HT ^[19]	RD
CAG-TAG	c.1270C>T	p.Q424*	HM ^[20]	RP
CGA-TGA	c.1381C>T	p.R461*	HT ^[21]	RP

AGC-TGC	c.1651A>T	p.S551C	HT [22]	MD, CD, CRD
CERKL splicing mutations				
Mutation	Localization	Zygosis		Retinal dystrophy
IVS1 ds G-A +1	c.238+1G>A	HM [23]		RD
IVS2 ds T-G +2	c.481+2T>G	HM [20]		CRD
IVS9 as T-A -3	c.1212-3T>A	HT [24]		RP
IVS11 as C-G -3	c.1347-3C>G	HT [25]		RD
IVS1 ds T-C +2	c.238+2T>C	HT [26]		RP, CRD
Small CERKL deletions				
Mutation	Localization	Aminoacid change	Zygosis	Retinal dystrophy
CACTT [^] 139 GATCTtATTAATTTAA	c.420delT	p.(Ile141 Leufs*3)	HT [10]	RP
ACTGT [^] 149 GACATatGGTTTAGACA	c.450_451 delAT	p.(Ile150 Metfs*3)	HM [27]	CRD
GTA [^] 204ACAA_EI_ GTAagTAATTTTCAG	c.613+4_613+5 delAG		HT [25]	RP
TA [^] 204ACAA_EI_ GTAAGtaaTTTTCGAAT	c.613+5_613+8 delGTAA		HM [28]	RP
TTTTCTAG_IE_ TGt [^] 254GTCTGTGTT	c.759delT	p.(Val254 Serfs*12)	HT [29]	RD
AATGCT [^] 278 GGGAtGGAAACAGAC	c.836delT	p.(Met279 Argfs*7)	HT [30]	RP
GAATC [^] 285 CTGACtCCTGTCAGAG	c.858delT	p.(Pro287 Leufs*10)	HT [10]	RP
ATTGCAC [^] 322 ATTatAATGG_EI_GTAAG	c.968_969delTA	p.(Ile323 Asnfs*46)	HM [31]	
GTTCTCA [^] 34 8GCCatGTTTGGCTTT	c.1045_1046 delAT	p.(Met349 Valfs*20)	HM [2]	RD
AAA [^] 383CTTAA_EI_ GTAagtCTTTTTCTTA	c.1151+3_1151+ 6 delAAGT		HM [25]	RP
GCAGAA [^] 387 GACTgtGAAATATCAT	c.1164_1165 delTG	p.(Cys388*)	HT [32]	
CTGTT [^] 493 GAGGAaGTA [^] AAGTTC	c.1482delA	p.(Val495*)	HM [33]	RD
Small CERKL insertions				
Mutation	Localization	Aminoacid change	Zygosis	Retinal dystrophy
GGGCATC [^] 52 TTCtGAGATCGGGA	c.156_157insT	p.(Glu53*)	HM [30]	RP
GCGAG [^] 66CGAGC gagcACTGCGGTGG	c.197_200dup GAGC	p.(Leu68 Serfs*15)	HT [24]	MD, CD, CRD
TGAGACT [^] 490 TACTtacACTGTTGAGG	c.1467_1470 dupTTAC	p.(Thr491 Leufs*4)	HM [34]	RP
ATCAGT [^] 547 CTTTcttATGAGGAAG	c.1639_1642 dupCTTT	p.(Tyr548 Serfs*19)	HT [7]	RP

Large <i>CERKL</i> deletions			
Mutation	Localization	Zygosis	Retinal dystrophy
gDNA	Exon 1-2	HT [35]	RD
gDNA	Exon 2	HT [24]	RP
gDNA	Exon 2	HT [25]	MD, CD, CRD
gDNA	Exon 1	HT [26]	RP, CRD
gDNA	Exon 2	HT [26]	RP, CRD

ar: Autosomic recessive. HM: Homozygosis. HT: Heterozygosis. RD: Retinal Dystrophy. RP: Retinitis Pigmentosa. CD: Cone Dystrophy. CRD: Cone-Rod Dystrophy. MD: Macular degeneration. (Mutations listed on *Human Gene Mutation Database* (HGMD) <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

REFERENCES

- [1] K. Avela, E. M. Sankila, S. Seitsonen, *et al.*, "A founder mutation in *CERKL* is a major cause of retinal dystrophy in Finland," *Acta Ophthalmol.*, 2018, vol. 96, no. 2, pp. 183–191.
- [2] J. M. Ellingford, S. Barton, S. Bashkar, *et al.*, "Molecular findings from 537 individuals with inherited retinal disease," *J. Med. Genet.*, 2016, vol. 53, no. 11, pp. 761–767.
- [3] M. Ali, V. L. Ramprasad, N. Soumitra, *et al.*, "A missense mutation in the nuclear localization signal sequence of *CERKL* (p. R106S) causes autosomal recessive retinal degeneration," *Mol. Vis.* 2008, vol. 14, pp. 1960–1964.
- [4] M. Ezquerro-Inchausti, A. Anasagasti, O. Barandika, *et al.*, "A new approach based on targeted pooled DNA sequencing identifies novel mutations in patients with Inherited Retinal Dystrophies," *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 1–12.
- [5] L. Roberts, R. Ratnapriya, V. Chaitankar, *et al.*, "Molecular Diagnosis of Inherited Retinal Diseases in Indigenous African Populations by Whole-Exome Sequencing," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2016, vol. 57, no. 14, pp. 6374–6381.
- [6] K. W. Littink, R. K. Koenekoop, L. I. van den Born, *et al.*, "Homozygosity mapping in patients with cone-rod dystrophy: Novel mutations and clinical characterizations," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2010, vol. 51, no. 11, pp. 5943–5951.
- [7] Y. Xu, L. Guan, T. Shen *et al.*, "Mutations of 60 known causative genes in 157 families with retinitis pigmentosa based on exome sequencing," *Hum. Genet.*, 2014, vol. 133, no. 10, pp. 1255–1271.
- [8] X. F. Huang, F. Huang, K. Wu, *et al.*, "Genotype-phenotype correlation and mutation spectrum in a large cohort of patients with inherited retinal dystrophy revealed by next-generation sequencing," *Genet. Med.*, 2015, vol. 17, no. 4, pp. 271–278.
- [9] P. Wang, S. Li, W. Sun, *et al.*, "An ophthalmic targeted exome sequencing panel as a powerful tool to identify causative mutations in patients suspected of hereditary eye diseases," *Transl. Vis. Sci. Technol.*, 2019, vol. 8, no. 2, pp. 21.
- [10] K. M. Nishiguchi, R. G. Tearle, Y. P. Liu, *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, vol. 110, no. 40, pp. 16139–16144.
- [11] R. Perez-Carro, M. Corton, I. Sánchez-Navarro, *et al.*, "Panel-based NGS Reveals Novel Pathogenic Mutations in Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa," *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, no. 19531.
- [12] S. Kantarci, J. L. Deignan, N. Dorrani, *et al.*, "Clinical Exome Sequencing for Genetic Identification of Rare Mendelian Disorders," *JAMA*, 2014, vol. 312, no. 18, pp. 1880–1887.
- [13] C. Jespersgaard, M. Fang, M. Bertelsen, *et al.*, "Molecular genetic analysis using targeted NGS analysis of 677 individuals with retinal dystrophy," *Sci. Rep.*, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 1–7.
- [14] J. Wang, V. W. Zhang, Y. Feng, *et al.*, "Dependable and efficient clinical utility of target capture-based deep sequencing in molecular diagnosis of retinitis pigmentosa," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2014, vol. 55, no. 10, pp. 6213–6223.
- [15] M. Tuson, G. Marfany, and R. González, "Mutation of CERKL, a Novel Human Ceramide Kinase Gene, Causes Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa (RP26)," *Am. J. Hum. Genet.*, 2004, vol. 74, no. 1, pp. 128–138.
- [16] N. Patel, N. A. Aldahmesh, H. Alkuraya, *et al.*, "Expanding the clinical, allelic, and locus heterogeneity of retinal dystrophies," *Genet. Med.*, 2016, vol. 18, no. 6, pp. 554–562.
- [17] A. O. Khan and L. Abu-Safieh, "Rod-Cone Dystrophy with Initially Preserved Visual Acuity Despite Early Macular Involvement Suggests Recessive CERKL Mutations," *Ophthalmic Genet.*, 2015, vol. 36, no. 4, pp. 369–372.
- [18] E. Boulanger-Scemama, S. El Shamieh, V. Démontant, *et al.*, "Next-generation sequencing applied to a large French cone and cone-rod dystrophy cohort: Mutation spectrum and new genotype-phenotype correlation," *Orphanet J. Rare Dis.*, 2015, vol. 10, no. 1.
- [19] R. Matsui, A. V. Cideciyan, S. B. Schwartz, *et al.*, "Molecular heterogeneity within the clinical diagnosis of pericentral retinal degeneration," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2015, vol. 56, no. 10, pp. 6007–6018.
- [20] N. Glöckle, S. Kohl, J. Mohr, *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.*, 2014, vol. 22, no. 1, pp. 99–104.
- [21] E. M. Stone, J. L. Andorf, S. S. Whitmore, *et al.*, "Clinically Focused Molecular Investigation of 1000 Consecutive Families with Inherited Retinal Disease," *Ophthalmology*, 2017, vol. 124, no. 9, pp. 1314–1331.
- [22] J. Birtel, T. Eisenberger, M. Gliem, *et al.*, "Clinical and genetic characteristics of 251 consecutive patients with macular and cone/cone-rod dystrophy," *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 1–11.
- [23] N. Auslender, D. Sharon, A. H. Abbasi, *et al.*, "A common founder mutation of CERKL underlies autosomal recessive retinal degeneration with early macular involvement among Yemenite Jews," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2007, vol. 48, no. 12, pp. 5431–5438.
- [24] J. Birtel, M. Gliem, E. Mangold *et al.*, "Next-generation sequencing identifies unexpected genotype-phenotype correlations in patients with retinitis pigmentosa," *PLoS One*, 2018, vol. 13, no. 12, pp. 1–18.
- [25] K. Carss, G. Arno, M. Erwood, *et al.*, "Comprehensive Rare Variant Analysis via Whole-Genome Sequencing to Determine the Molecular Pathology of Inherited Retinal Disease," *Am. J. Hum. Genet.*, 2017, vol. 100, no. 1, pp. 75–90.
- [26] J. M. Ellingford, B. Horn, C. Campbel, *et al.*, "Assessment of the incorporation of CNV surveillance into gene panel next-generation sequencing testing for inherited retinal diseases," *J. Med. Genet.*, 2018, vol. 55, no. 2, pp. 114–121.
- [27] B. Azab, R. Barham, D. Ali, *et al.*, "Novel CERKL variant in consanguineous Jordanian pedigrees with inherited retinal dystrophies," *Canadian J. Ophthalmol.*, 2019, vol. 54, no. 1, pp. 51–59.
- [28] M. De Castro-Miró, R. Tonda, P. Escudero-Ferruz, *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, vol. 11, no. 12, pp. 1–19.
- [29] X. Huang, F. Huang, K. Wu, *et al.*, "Open Genotype – phenotype correlation and mutation spectrum in a large cohort of patients with inherited retinal dystrophy revealed by next-generation sequencing," *Genetics in Medicine*, 2015, vol. 17, no. 4, pp. 271–278.
- [30] Z. Tang, Z. Wang, Z. Wang, *et al.*, "Novel Compound Heterozygous Mutations in CERKL Cause Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa in a Nonconsanguineous Chinese Family," *Arch Ophthalmol*, 2009, vol. 127, no. 8, pp. 1077.
- [31] P. Biswas, J. L. Duncan, B. Maranhao, *et al.*, "Genetic analysis of 10 pedigrees with inherited retinal degeneration by exome sequencing and phenotype- genotype association," *Physiol. Genomica.*, 2017, vol. 49, pp. 216–229.
- [32] T. S. Aleman, N. Soumitra, A. V. Cideciyan, *et al.*, "CERKL mutations cause an autosomal recessive cone-rod dystrophy with inner retinopathy," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2009, vol. 50, no. 12, pp. 5944–5954.
- [33] Q. Fu, F. Wang, H. Wang, *et al.*, "Next-Generation sequencing-based molecular diagnosis of a Chinese patient cohort with autosomal recessive retinitis pigmentosa," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2013, vol. 54, no. 6, pp. 4158–4166.
- [34] L. Wang, J. Zhang, N. Chen, *et al.*, "Application of whole exome and targeted panel sequencing in the clinical molecular diagnosis of 319 Chinese families with inherited retinal dystrophy and comparison study," *Genes.*, 2018, vol. 9, no. 7, pp. 1–11.
- [35] J. M. Ellingford, C. Campbel, S. Barton, *et al.*, "Validation of copy number variation analysis for next-generation sequencing diagnostics," *Eur. J. Hum. Genet.*, 2017, vol. 25, no. 6, pp. 719–724.

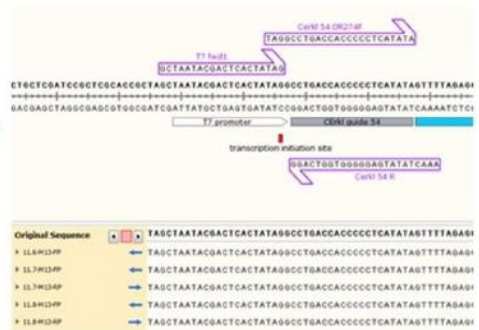
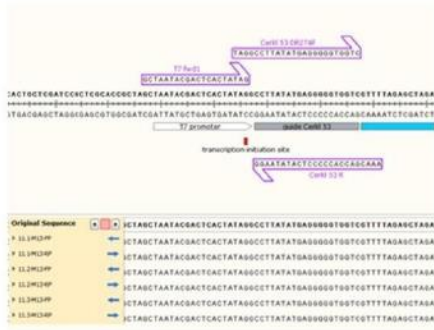
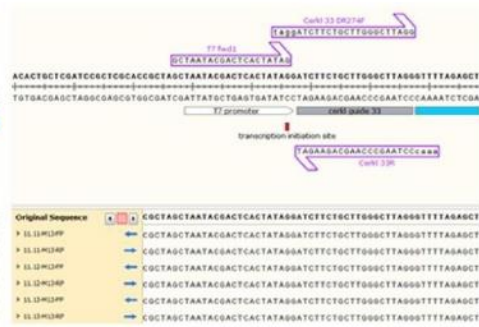
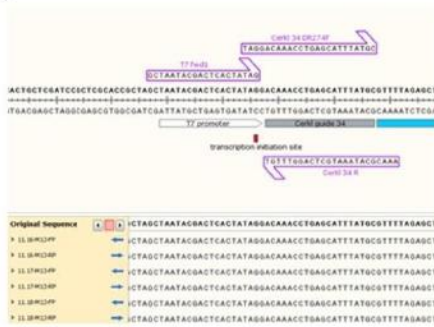
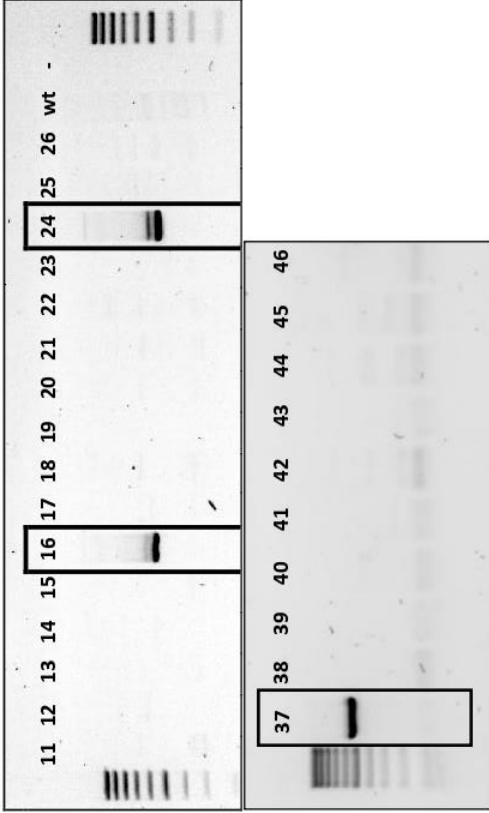
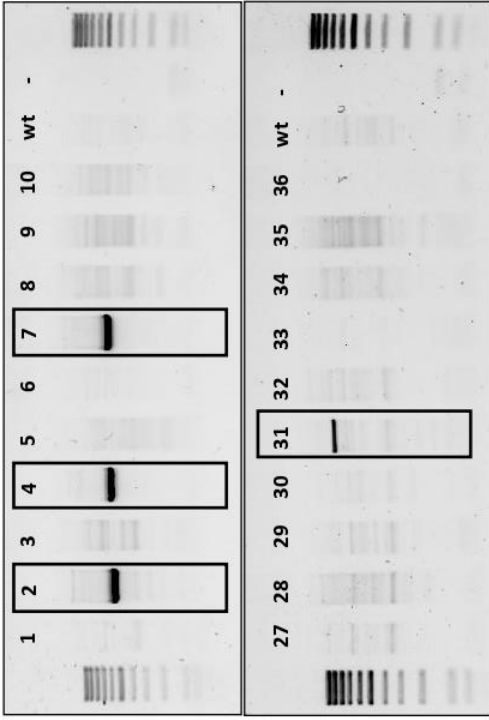
A**B**

Figure S1. CRISPR/Cas9 guide position. To perform *Cerkl* gene edition we used four guides, two guides at 5' (A), and two guides at 3' (B).

A) Whole region

PCR whole deletion (Primers: Cerkl UF – Cerkl DR)



(guides underlined) (small insertions) (small deletions)

wt 5' tagtacagaaaccccagttttaaatcaccccttcaatgctgaccaccccctcatataaggacttcacaaa
 wt 3' GCGTCTGCTCTAAGCCCAAGCAGAGATTAAAGCCGAAAGTAGCACATTGTATAAATACATAATGCACACCTCTCAATAAATACAAACCTGAGCATTTTAGCTGGCATTGCAACATTATTTGT

mouse 02 tagtacagaaaccccagttttaaatcaccccttcaatgctgaccaccccctcat TGCAAACATTATTTGT

mouse 04 tagtacagaaaccccagttttaaatcaccccttcaatgctgaccaccccctcat tcaat TGCCTGGCATTGCAACATTATTTGT

mouse 07 tagtacagaaaccccagttttaaatcaccccttcaatgctgaccaccccctcaaatgctcaggtttgtattata ATGCTGGCATTGCAACATTATTTGT

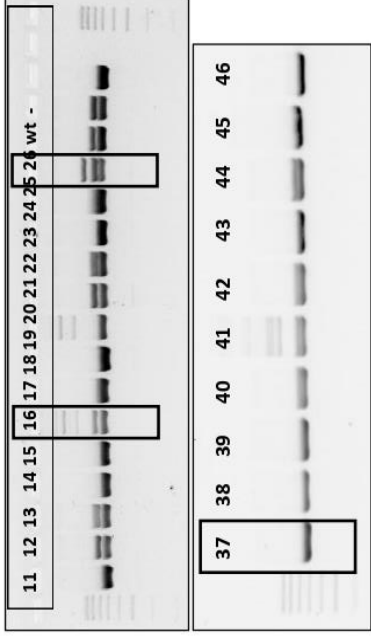
mouse 16 tagtacagaaaccccagttttaaatcaccccttcaatgctgaccaccccctcagggac TGCCTGGCATTGCAACATTATTTGT

mouse 24 tagtacagaaaccccagttttaaatcaccccttcaatgctgaccaccccctc AAACATTATTTGT

mouse 37 tagtacagaaaccccagttttaaatcaccccttcaatgctgaccaccccctc ATTATTTGT

B) 5' or upstream region

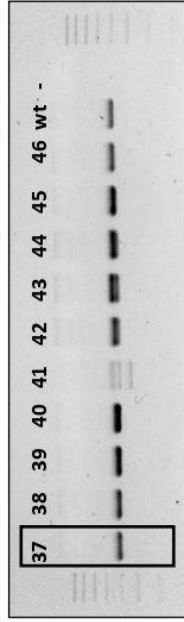
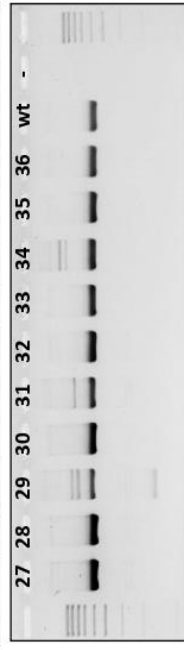
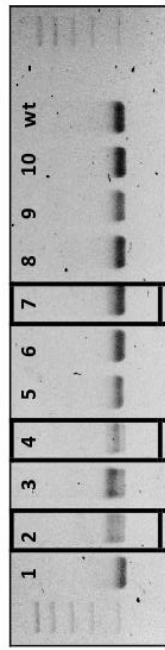
PCR 5' or upstream (Primers: CerklUF2 – CerklUR)



wt 5' tagtacagaaaccccagttttaataatcacccctcaatgctgaccacccctcatataaggacttcacaaa
 mouse 02 (11/11) tagtacagaaaccccagttttaataatcacccctcaatgctgaccacccctcaatataaggacttcacaaa
 mouse 04a (10/12) tagtacagaaaccccagttttaataatcacccctcaatgctgaccacccctcatataaggacttcacaaa
 mouse 04b (2/12) tagtacagaaaccccagttttaataatcacccctcaatgctgaccacccctcaatataaggacttcacaaa
 mouse 07 (6/12) tagtacagaaaccccagttttaataatcacccctcaatgctgaccacccctcaatataaggacttcacaaa
 mouse 16a (5/10) tagtacagaaaccccagttttaataatcacccctcaatgctgaccacccctcaatataaggacttcacaaa
 mouse 16b (4/10) tagtacagaaaccccagttttaataatcacccctcaatgctgaccacccctcaatataaggacttcacaaa
 mouse 16c (1/10) tagtacagaaaccccagttttaataatcacccctcaatgctgaccacccctcaatataaggacttcacaaa
 mouse 24a (3/14) tagtacagaaaccccagttttaataatcacccctcaatgctgaccacccctcaatataaggacttcacaaa
 mouse 24b (9/14) tagtacagaaaccccagttttaataatcacccctcaatgctgaccacccctcaatataaggacttcacaaa
 mouse 24c (2/14) tagtacagaaaccccagttttaataatcacccctcaatgctgaccacccctcaatataaggacttcacaaa
 mouse 37 (1/12) tagtacagaaaccccagttttaataatcacccctcaatgctgaccacccctcaatataaggacttcacaaa

C) 3' or downstream region (mice 7 & 37 wild type)

PCR 3' or downstream (Primers: Cerkl DF – Cerkl DR)



```
wt 3'          GGCCTTCGCTCCTAAGCCCAAGCAGACATTAAAGCCAGAAAGTTAGCACATTGTAATAAATACATAATGCACCACCTCTCAATAAATACAAACCTGAGCATTATGCTGGCATTGCRAACATTAATTTTGT  
mouse 02a (7/11) GGCCTTCGCTCCTAAGCCCAAGCAGACATTAAAGCCAGAAAGTTAGCACATTGTAATAAATACATAATGCACCACCTCTCAATAAATACAAACCTGAGCATTATGCTGGCATTGCRAACATTAATTTTGT  
mouse 02b (4/11) GGCCTTCGCTCCTAAGCCCAAGCAGACATTAAAGCCAGAAAGTTAGCACATTGTAATAAATACATAATGCACCACCTCTCAATAAATACAAACCTGAGCATTATGCTGGCATTGCRAACATTAATTTTGT  
mouse 04 (6/9)   GGCCTTCGCTCCTAAGCCCAAGCAGACATTAAAGCCAGAAAGTTAGCACATTGTAATAAATACATAATGCACCACCTCTCAATAAATACAAACCTGAGCATTATGCTGGCATTGCRAACATTAATTTTGT  
mouse 16a (2/9)  -----AAGCAGAGATTAAAGCCAGAAAGTTAGCACATTGTAATAAATACATAATGCACCACCTCTCAATAAATACAAACCTG -----GCATTGCRAACATTAATTTTGT  
mouse 24a (3/8)  -----AAGCAGAGATTAAAGCCAGAAAGTTAGCACATTGTAATAAATACATAATGCACCACCTCTCAATAAATACAAACCTG -----GCATTGCRAACATTAATTTTGT  
mouse 24b (3/8)  -----AAGCAGAGATTAAAGCCAGAAAGTTAGCACATTGTAATAAATACATAATGCACCACCTCTCAATAAATACAAACCTG -----GCATTGCRAACATTAATTTTGT  
mouse 24c (2/8)  -----GCCCAGAGATTAAAGCCAGAAAGTTAGCACATTGTAATAAATACATAATGCACCACCTCTCAATAAATACAAACCTG -----CTGGCATTGCRAACATTAATTTTGT  
wt (16b reference) GAAAACCTGGGSCATCTGGTAAAGTTTCAAGAGTTAAAGAGTGCAGAAAGTAGTAAAGTTAAATCTAAATAGGGCCACCAGAAACATC-  
--CITTTGTGAAG  
GCTGGCATTGCRAACATTAATTTTGTATAAATGATACAGACATGTTGACAATTTACATTTGTTTCCTTAAAGCTTAAAGGTTAAATGTAGTGGCCACTCTCTAGCCCTGCTCCCA  
CCTGAGCATTATGCTGGCATTGCRAACATTAATTTTGTATAAATGATACAGACATGTTGACAATTTACATTTGTTTCCTTAAAGCTTAAAGGTTAAATGTAGTGGCCACTCTCTAGCCCTGCTCC
```


Figure S2. Genotyping PCRs for CRISPR-edited alleles in mosaic pups, and sequences gene-edited alleles per mice. A) Specific PCRs for the whole *Cerkl* locus deletion allele with primers flanking the PAM sites for the Cas9 D10A nickase at 5' and 3' sequences, allowed to detect the pups (out of 46 born alive) carrying the full locus deletion. **B)** Specific primers for gene-editing in the upstream *Cerkl* region allowed to detect mosaic pups carrying alleles where Cas9 D10A nickase only cut at the 5' sites. **C)** Specific primers for gene-editing in the downstream *Cerkl* region allowed to detect mosaic pups carrying alleles where Cas9 D10A nickase only cut at the 3' sites. Per each specific primer pair, PCRs from animals carrying gene-edited alleles are highlighted. Bands were excised, cloned and sequenced. Very few alleles were present per animal (indicated by a and b sequences) and sequences are indicated below. Small indels at the edited sites were detected in some cases (blue nucleotides indicate small insertions and red nucleotides, small deletions). Mouse 16 b allele (gene-editing occurred only at the 3' *Cerkl* region carried a relatively larger deletion). Mouse 2 carrying the full locus deletion was chosen as a founder for our colony (highlighted in yellow).

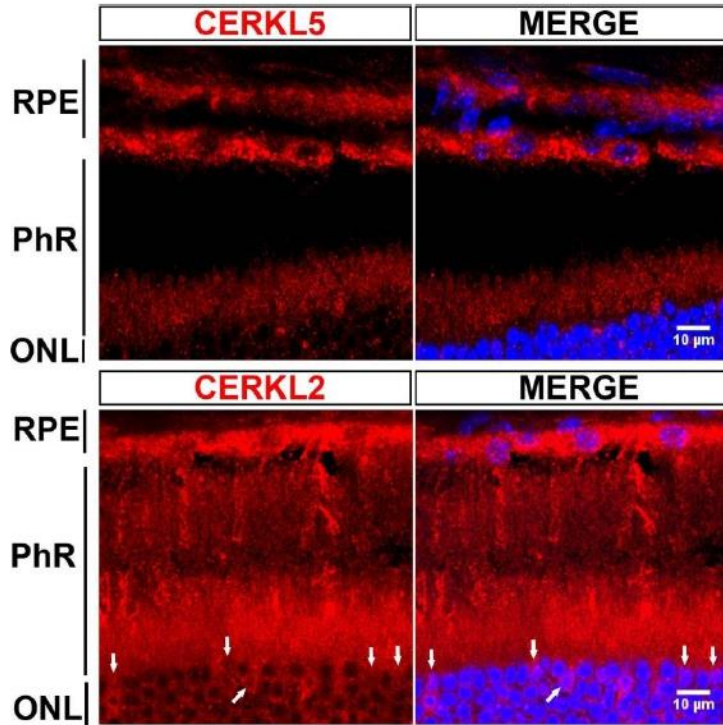


Figure S3. CERKL (in red) is highly expressed in the Retinal Pigment Epithelium (RPE) cells, as detected using two anti-CERKL antibodies recognizing different protein isoforms. Nuclei are counterstained with DAPI (blue). Note that some CERKL isoforms (detected with anti-CERKL2) are also localized in the nuclei of RPE cells and some cones (white arrows) (see main text). **PhR**- Photoreceptor layer (include the outer and inner segments of photoreceptors). **ONL**- Outer nuclear layer.

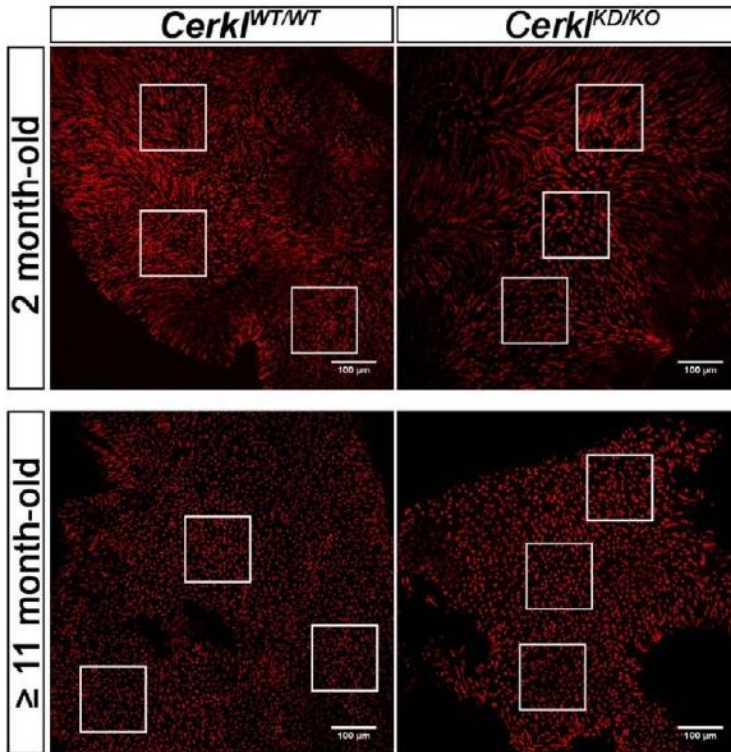


Figure S4. Representative positioning of the ROIs (regions of interest) in a retinal whole mount. The number of cones were counted on three ROIs per image and a minimum of 12 images per retina.

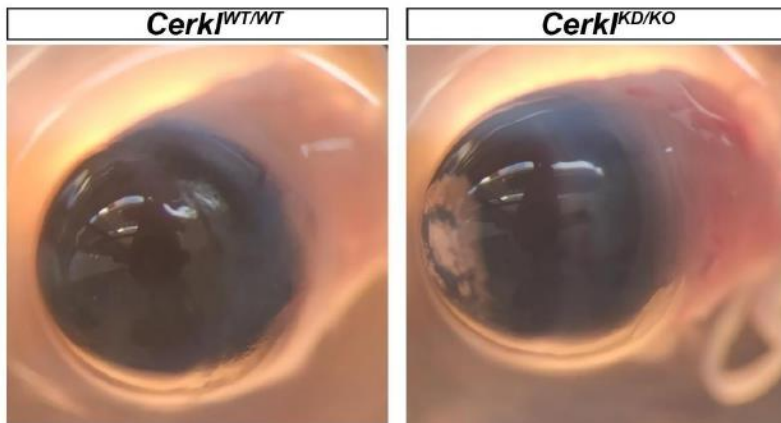


Figure S5. Corneal aggregates in aged *Cerkl*^{KD/KO} mice (18 months of age).

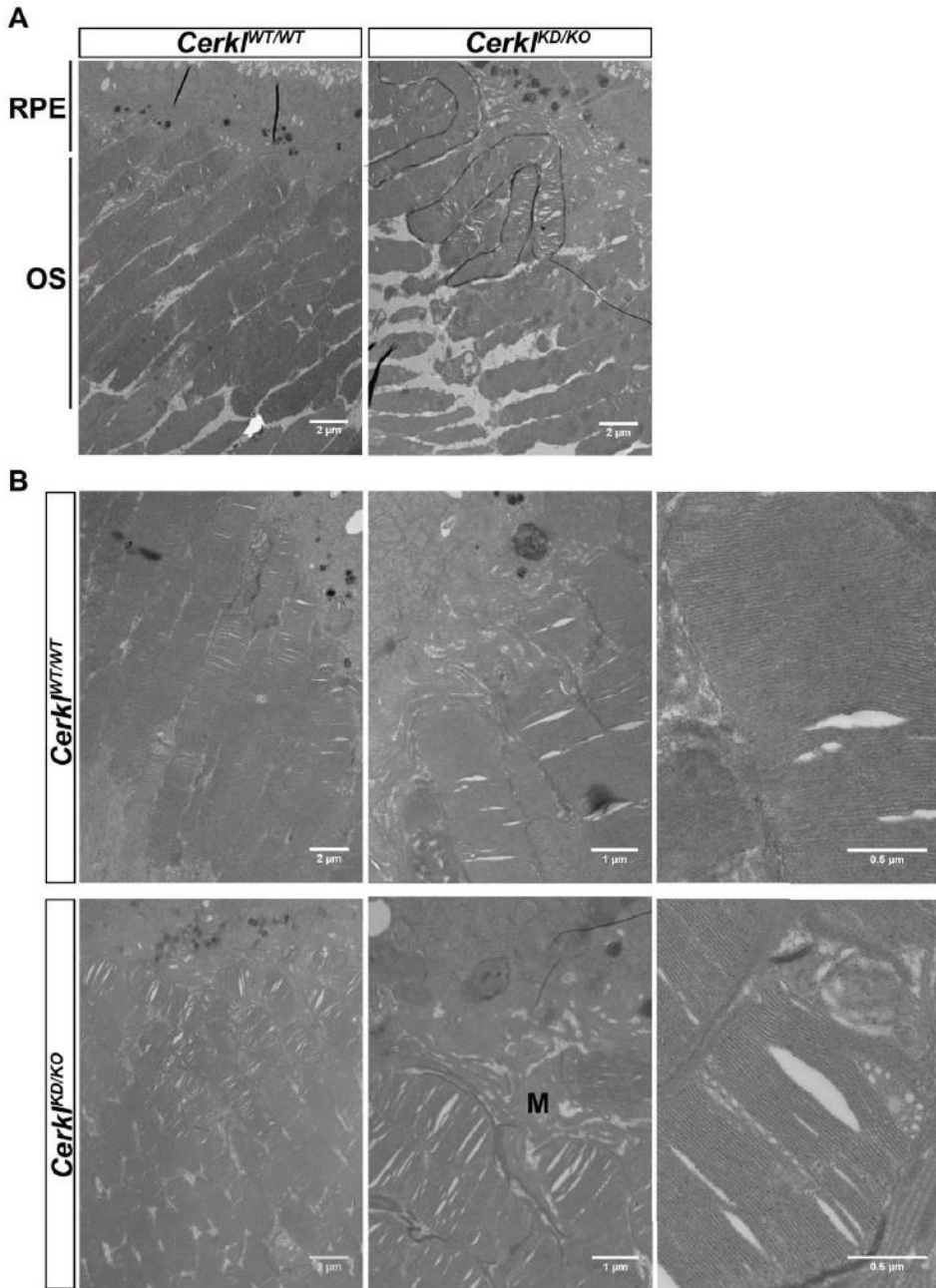


Figure S6. Transmission electron microscopy image showing the ultrastructure of retinal photoreceptors. A) *Cerkl^{KD/KO}* photoreceptors show loose stacking of the membrane disks and disarrayed bent outer segments (outlined in black) and disorganized microvilli (B). B) Additional images from *Cerkl^{KD/KO}* and *Cerkl^{WT/WT}* mice to show the consistency of the phenotype. Magnifications were taken at 5000x, 12000x and 40000x. Scale bars 2 μm , 1 μm and 0.5 μm respectively.

Annex Capítol 1

Cerca d'isoformes de *Cerkl*: expressió diferencial
en fotoreceptors i origen de traducció no
convencional

1.1. Cerca d'isoformes de *Cerkl* diferencialment expressades en cons i bastons

ANTECEDENTS

Des de ja fa uns anys es coneix que *Cerkl* presenta una elevada complexitat transcripcional, presentant en el cas del ratolí més de 20 isoformes diferents, amb presència de diversos dominis proteics diferencials, segons la isoforma [39]. És lògic pensar que la diversitat d'isoformes té un significat biològic, i segons els dominis proteics que presenten, les diferents isoformes puguin executar una o altre funció i/o tenir una localització subcel·lular diferent o, fins i tot, expressar-se en tipus cel·lulars diferents de manera preferent, com ja hem vist en el manuscrit de la primera publicació d'aquesta Tesi. En aquest apartat ens centrarem en posar a punt un sistema per separar cons i bastons per, posteriorment, poder distingir quines són les isoformes majoritàries de *Cerkl* en ambdós tipus cel·lulars.

RESULTATS

Prèviament a aquesta Tesi, una altre membre del grup (Dra. Rosa Andrés) va aconseguir aïllar bastons i cèl·lules ganglionars de la resta de la retina. Mitjançant una col·laboració amb el Dr. Alejandro Garanto, i usant RT-PCRs específiques es van amplificar transcrits expressats a partir de diferents regions promotores, i s'observà que hi havia una expressió diferencial d'isoformes de *Cerkl* segons si la població cel·lular estava enriquida amb bastons o amb cèl·lules ganglionars de retina (Figura 8).

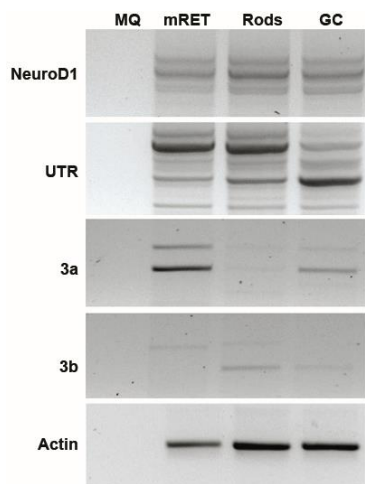


Figura 8. Gel d'electroforesi on s'observa un patró diferencial en l'expressió d'isoformes de *Cerkl* segons la població cel·lular. MQ: Control negatiu de la PCR, mRET: Retina total. Rods: Bastons. GC: Cèl·lules ganglionars. Obtenció de cèl·lules retinals- Rosa Andrés, PCRs diferencials i electroforesi- Àlex Garanto.

Aquest resultat, ens va portar a intentar aïllar cons i bastons de la retina mitjançant un marcatge diferencial i citometria de flux, per tal de poder diferenciar quines isoformes majoritàries de *Cerkl* s'expressen en cada tipus cel·lular. Els fotoreceptors tenen un cili molt prim que separa el soma de la neurona del segment extern, pel que al passar pel capil·lar del citòmetre per separar les cèl·lules hi havia una elevada mortalitat i només podíem recuperar entre 100 i 1.000 cèl·lules intactes a partir de dues retines senceres (Figura 9). Aquesta quantitat de cèl·lules és clarament molt limitada per a fer experiments específics de RT-PCR.

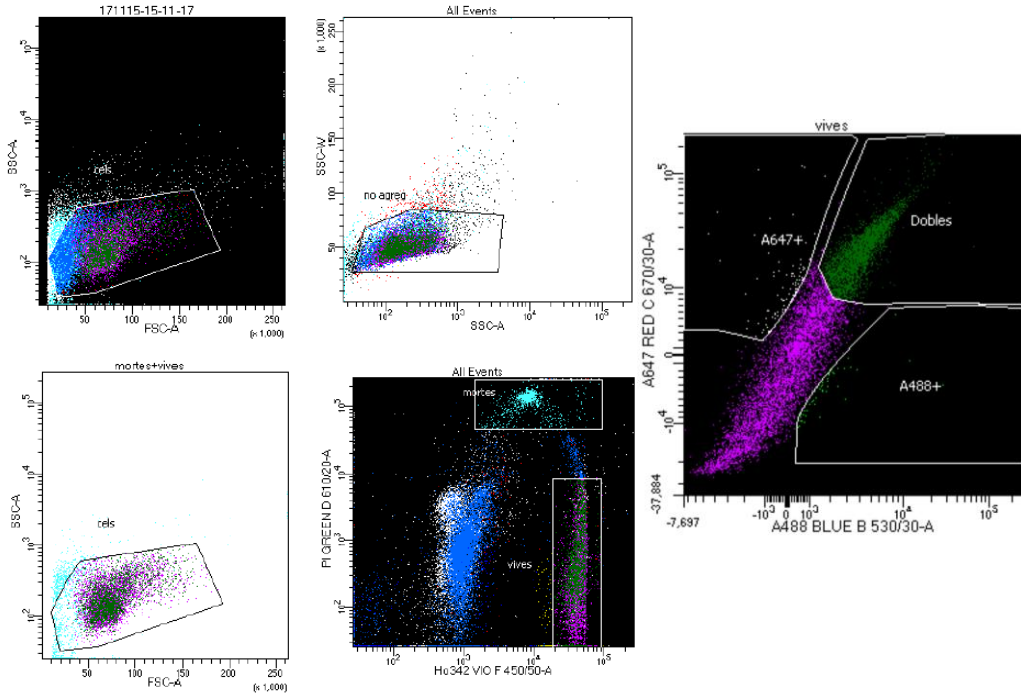
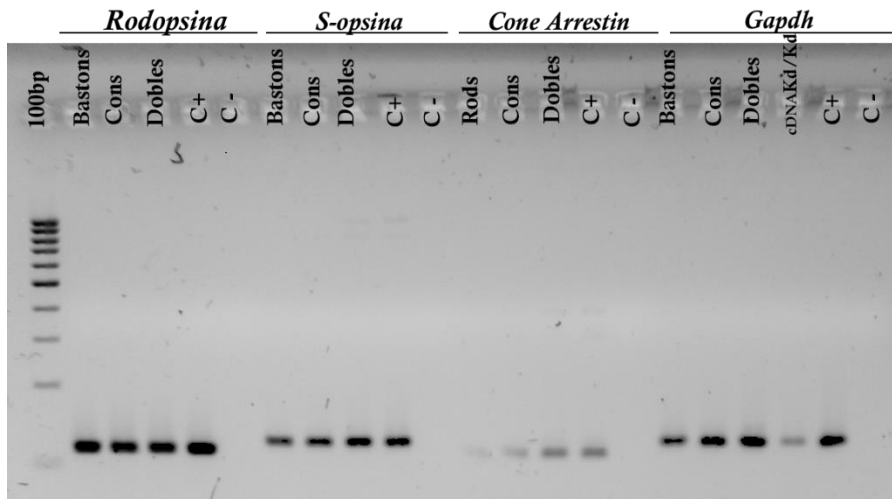


Figura 9. Imatge representativa de la separació de cons i bastons per citometria de flux. En la imatge es mostra el conjunt de cèl·lules escollit segons la mida (per a evitar agregats i *debris*). De la fracció de cèl·lules soles, se separen les vives (marcades amb Hoescht, però no amb iodur de propidi) de les mortes (marcades amb iodur de propidi) i, finalment, del grup de les cèl·lules vives se separen poblacions enriquides segons la fluorescència que hagin adquirit mitjançant la unió amb marcadors i anticossos específics de tipus cel·lular. Cons: A647+ i bastons: A488+.

Per determinar si durant la separació de cons i bastons realment les poblacions de cèl·lules estaven enriquides en la població cel·lular que corresponia, es va realitzar una PCR semiquantitativa per detectar Rodopsina (específica de bastons), S-opsina (específica de cons) i *Cone arrestin* (específica de cons) (Figura 10).



INTENSITAT				
	<i>Rho</i>	<i>S-opsina</i>	<i>Cone arrestin</i>	<i>Gapdh</i>
Bastons	1.499.638.835	796.861.017	220.174.012	806.702.439
Cons	1.360.597.413	927.048.885	570.038.835	1.123.707.464
Dobles	1.396.863.099	1.144.043.860	1.223.104.520	1.330.875.231
NORMALITZACIÓ				
	<i>Rho / Gapdh</i>	<i>S-opsina / Gapdh</i>	<i>Cone arrestin / Gapdh</i>	
Bastons	1,859	0,988	0,273	
Cons	1,211	0,825	0,507	
Dobles	1,050	0,860	0,919	
ENRIQUIMENT				
	<i>Rho / S-opsina</i>	<i>Rho / Cone arrestin</i>	<i>S-opsina / Rho</i>	<i>Cone arrestin / Rho</i>
Bastons	1,882	6,811	0,531	0,147
Cons	1,468	2,387	0,681	0,419
Dobles	1,221	1,142	0,819	0,876

Figura 10. Imatge representativa de l'electroforesi de la PCR semiquantitativa dels extractes cel·lulars obtinguts a partir de la separació de cons i bastons per citometria de flux. La quantificació mostra com la població de bastons es veu enriquida en bastons (ràtio de gens de bastons/cons, en color blau) mentre que la població de cons està barrejada i enriquida en bastons (ràtio de gens de cons/bastons, en color vermell). Dobles: Cèl·lules doblement marcades; *Rho*: Rodopsina.

A més del baix nombre de cèl·lules recuperat, els bastons són una població molt més abundant que els cons en les retines de ratolí, la qual cosa ens va dificultar molt la separació dels dos tipus de fotoreceptors, ja que mentre enriqueïem la població de bastons, la població de cons ens quedava sempre contaminada de bastons (Figura 10). Aquests resultats mostren d'una banda, la fragilitat que presenten els fotoreceptors i de l'altra, la dificultat d'aïllar poblacions pures.

Vam repetir aquest experiment diverses vegades canviant les condicions d'incubació, la quantitat d'anticòs, així com també vam provar diferents finestres de recollida de cèl·lules al citòmetre, unes més estrictes per intentar purificar poques cèl·lules però que fossin específicament cons –però llavors el nombre de cèl·lules recollides disminuïa per sota de 100 el que feia que impossible la seva detecció per una PCR semiquantitativa– i d'altres més permissives, on la contaminació per bastons va fer que fos impossible purificar els cons. Aquests resultats malauradament ens van portar a desistir i ens vam centrar en altres reptes importants per la Tesi. Actualment, hi ha altres metodologies i sistemes de sorteig cel·lular més refinats que podríem intentar per tal d'aconseguir obtenir les poblacions separades, com la realització de *Single-cell* RNA-seq, tot i que no seria fàcil distingir entre diferents isoformes perquè les lectures són massa curtes i no permeten fàcilment combinar la identificació de promotors alternatius alhora que *splicings* interns alternatius.

1.2. Identificació de possibles inicis de traducció alternatius de CERKL

ANTECEDENTS

Cerkl presenta moltes isoformes, però després de l'inici de traducció convencional situat just després de la regió 5' UTR, el següent inici de traducció en pauta a partir d'una metionina es troba a l'exó 5. En un treball anterior, ja s'havia realitzat una cerca *in silico* de possibles regions *Kozak* [39] en les seqüències de transcrits del gen *CERKL* humà. En aquest treball previ ja es va demostrar que la metionina que es troba dins de l'exó 5 era eficient per iniciar la traducció dels transcrits procedents dels promotors interns (3a i 3b). Tot i això, ens vàrem plantejar què succeïa amb totes aquelles isoformes que provenen del promotor de *NeuroD1*, ja que si l'inici de traducció usat era una metionina convencional, un 40% dels transcrits a retina s'haurien d'expressar des de l'inici de traducció de l'exó 5 i això implicaria perdre molts dels possibles dominis funcionals de la proteïna, apart de tenir 5 exons codificants com a 5' UTR. Ens vam proposar cercar possibles inicis de traducció alternatius que poguessin produir proteïna CERKL a partir dels transcrits procedents del promotor del gen *NeuroD1*, a ratolí. Per aquesta raó, vam decidir clonar la isoforma 13 de ratolí (HQ426692), ja que es genera a partir del promotor de *NeuroD1* i és una de les formes més completes, a un vector d'expressió de GFP per tal de poder detectar la proteïna de fusió. Així doncs, segons el pes molecular detectat de la proteïna de fusió mitjançant una immunodetecció per *western-blot* podríem determinar si probablement hi ha un inici de traducció a 5' del que es troba a l'exó 5, ja que presentaria un pes molecular major de l'esperat.

RESULTATS

Identificació de dues leucines que podrien actuar com a inici de traducció no convencional

El nostre objectiu era clonar la isoforma *Cerkl* m13 (procedent del promotor de *NeuroD1*, i que per *splicing* uneix el primer exó de *NeuroD1*, no codificant, amb l'exó 2 de *Cerkl*), per tal d'identificar si existia un lloc alternatiu d'inici de traducció, no convencional, és a dir, que no s'inicia per una metionina. Vam amplificar una isoforma similar, la isoforma *Cerkl* m13-like que presenta un petita inserció de 10 nucleòtids degut al corriment del lloc acceptor d'*splicing*.

Aquesta isoforma *Cerkl* m13-like va ser clonada a 5' de la pauta de lectura de GFP, per a ser expressada en cèl·lules HEK293 i observar la mida (pes molecular) de la proteïna de fusió amb una immunodetecció per *western-blot*. Si la proteïna de fusió CERKL-GFP comencés la traducció a partir de l'inici descrit a l'exó 5, esperaríem un pes molecular de 56,7 kDa, però quan vam realitzar la immunodetecció per *western-blot* dels lisats de les cèl·lules transfectades, vam observar una banda de major pes molecular no present en el control negatiu, d'aproximadament 75 kDa, compatible amb un inici de traducció no convencional (Figura 11A). Una altra evidència a favor que es generava proteïna de fusió va ser l'observació al microscopi de la fluorescència característica de GFP (Figura 11B).

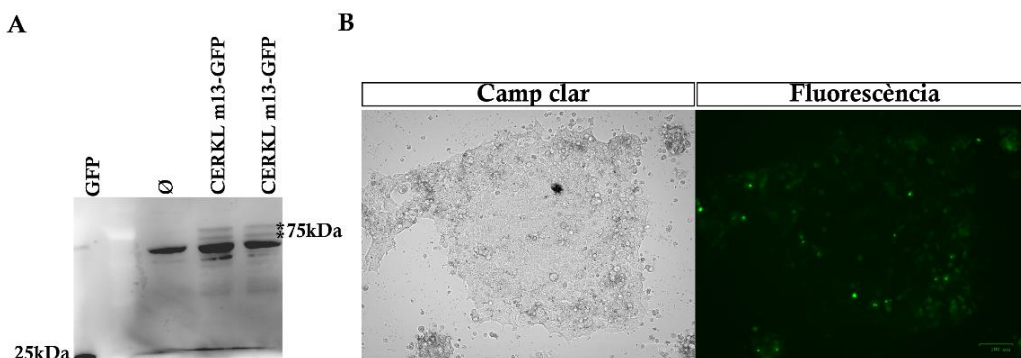


Figura 11. A) Immunodetecció per *western-blot* de la proteïna generada per la proteïna de fusió CERKL m13-GFP amb un pes molecular d'aproximadament 75 kDa (*), indicant un possible lloc de traducció alternatiu. B) Visualització per microscòpia la fluorescència emesa per la proteïna de fusió.

Com que el senyal era dèbil, vam enriquir la fracció proteica amb la proteïna de fusió CERKL-GFP mitjançant una immunoprecipitació amb l'anticòs α GFP. L'elutit va ser enviat a espectrometria de masses per tal d'identificar-ne els pèptids. Vam raonar que si podíem identificar pèptids de CERKL codificats als exons inicials, prèviament a la metionina de l'exó 5, seria una evidència més segura de la producció d'aquesta proteïna a partir d'un inici de traducció no convencional. L'espectrometria de masses va trobar un conjunt de pèptids de CERKL, GFP i fusió entre CERKL-GFP, però notablement, també va identificar de forma clara el pèptid EESLELEDIFSVK (Figura 12A i 12B), codificat per l'exó 2. Els inicis de traducció no convencionals solen usar variacions del triplet d'iniciació, com ara Leucina (CTG) o Valina (GTG) [266]. Justament, en posició més amino-terminal d'aquest pèptid hi ha dues leucines (CTG) que podrien actuar com a inici de traducció alternatiu com es pot veure en la seqüència que codifica per la proteïna de fusió (Figures 12A i 12C).

A

A2	Sequence
High	GEELFTGVVPILVELDGDVrGHK
High	NQFNFFPVETYYTIEEVK
High	GEELFTGVVPILVELDGDVNGHK
High	GIDFKEDGNILGHK
High	LEYNYNSHINVIYIMADK
Medium	ESVHVYYEK
High	LEYNYNSHINVIYImADK
High	FEGDTLVNRIELK
High	FSVSGEGEGDATY GK
High	ILDGFTSRPK
High	ISFLLAGcSQNK
Medium	ILLNPQSHRK
High	VAcDcISSRGPGIHRPVATmVSK
High	SAmPEGYVQERTIFFK
High	SAMPEGYVQERTIFFK
High	EESLELEDIFSVK
High	RDHMVLLFPVTAAGITLGmDELYK
High	VAcDcISSRGPGIHRPVATmVSK
High	LPVPV/PTLVTTTLTYGVqcFSRYPDHMK
High	RDHMVLLFPVTAAGITLGmDELYK
High	IRHNIEDGSVQLADHYqQNTPIGDGPVLLPDN

B

acg agg aat tcg ccc acg cag aag gca agg tgt ccc gag gct cca ggg tta tga gat cgt
 T R N S P T Q K A R C P E A P G L - D R

cac tat tca gaa cct ttt aac aac agc tca tgc agg gac aaa ggc aaa agg caa aag gca
 H Y S E P F N N S S C R D K G K R Q K A

aaa cca tga aag tcc aag tgt taa cgg ttc cgt ggt tgt cag cta ttc ttc atc cac tca
 K P - K S K C - R F R G C Q L F F I H S

aaa tgg aga gac agt ggt ctt gac cgg gag ttt aat ttc ttc tta ggt agc acc agg cat
 K W R D S G L D R E F N F F L G S T R H

gat ctg ctg agc aaa gaa gag tcc cta gaa ctt gaa gac atc ttc tca gtg aag ctg aag
 D L L S K E E S L E L E D I F S V K L K

cgg cgt tgc tgg gcc aag cat cca ggc aga gac aca ctg ctg ggc ata acg ctt ttc atc
 R R C W A K H P G R D T L L G I T L F I

tgc ttg aag gag caa cgg aac aaa cta aag gac tcc acg ctg gat ctt att aac ttc agt
 C L K E Q R N K L K D S T L D L I N F S

gaa gac cac tgt gac ata tgg ttt aga cag tcc aag aaa atc ttg gat ggt ttc aca agc
 E D H C D I W F R Q S K K I L D G F T S

agg ccc aag gct ctc aag atc ctc ctc aac ccc cag agt cac aga aag gag tct gtc cac
 R P K A L K I L L N P Q S H R K E S V H

gtc tat tac gag aag gtg gag cct ctg ctg aag ctt gcg ggc ata gag act gat gtg aca
 V Y Y E K V E P L L K L A G I E T D V T

ata aca gaa tat gaa ggg cat gcc ctg tct ctg ctt gac gaa tgt gaa ctc cga gga ttt
 I T E Y E G H A L S L L D E C E L R G F

gat ggt gtt gtc tgt gtt ggt gga gat gga tct gcg agt gag gcc gcc cgc gct ttg ctc
 D G V V C V G G D G S A S E A A R A L L

ctc aga gct cag aag aac gcg gga gtg gag atg gac tgc atc ccg act ctc gtt gga gca
 L R A Q K N A G V E M D C I P T L V G A

gag ctt cct ctt ggc ttc att cca gca gga tct act aac gca ctg gca cat tct ctc ttt
 E L P L G F I P A G S T N A L A H S L F

gga act cct cac gtg gtg act gca acc atg cat att ata cta ggt cac ata cgg tca gtg
 G T P H V V T A T M H I I L G H I R S V

gat gtc tgc acc ttt agc tct gct ggc aag ctt ctt cgc ttt ggg ttc tca gcc atg ttt
 D V C T F S S A G K L L R F G F S A M F

ggc ttt ggt gga agg acc ttg gct ctg gca gag aaa tac cga tgg atg tcc ccc agt cag
 G F G G R T L A L A E K Y R W M S P S Q

cga aga gac ttt gct ata atc aaa gca ctg gcc aaa ctt aag cca gag gac tgc aaa ata
 R R D F A I I K A L A K L K P E D C K I

tca ttt tta cta gca ggt tgt tct cag aat aaa caa gaa aga aaa tca cag aga tct gca
 S F L L A G C S Q N K Q E R K S Q R S A

gaa tct gac tgt ggt ggt cac tgg caa acc atc cag ggg cag ttc ttg aat atc agc atc
 E S D C G G H W Q T I Q G Q F L N I S I

atg gca atg ccc tgt cca tgt tca atg gca ccc aga ggc ttt aca cct gac acc aga tta

C

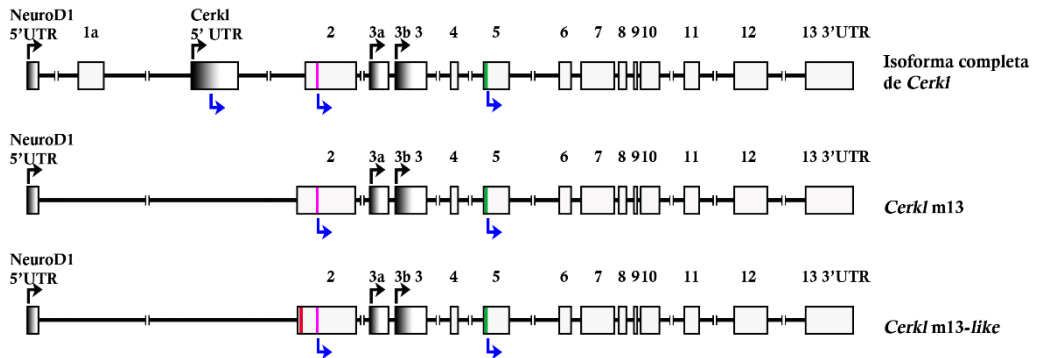


Figura 12. A i B) Seqüència del cDNA i de la proteïna codificada per la isoforma *Cerkl* m13-like i conjunt de pèptids CERKL-GFP identificats per espectrometria de masses. Enquadrat en verd s'indica el pèptid codificat per l'exó 2, situat en una posició més amino-terminal que la primera metionina en l'exó 5. Enquadrat en blau trobem un altre dels pèptids trobats en una posició més amino-terminal de la metionina de l'exó 5. Marcat en color rosa trobem la seqüència esperada que es donaria a partir de la metionina de l'exó 5 (seqüència no completa). En lila es troben marcades les dues leucines (CTG CTG) consecutives que podrien estar actuant com a inici de traducció alternatiu. En groc es troba marcada la inserció de 10 nucleòtids. C) Il·lustració de la isoforma completa de *Cerkl*, la isoforma *Cerkl* m13 que prové del promotor de *NeuroD1* i la isoforma *Cerkl* m13-like, que resulta molt semblant a la isoforma *Cerkl* m13, excepte per una inserció de 10 nucleòtids a l'inici de l'exó 2 (indicada en vermell). Les leucines que podrien estar actuant com a inici de traducció alternatiu s'han representat en magenta i la metionina localitzada a l'exó 5 i que actua com a inici de traducció ja descrit es marca en verd. Les fletxes blaves indiquen els inicis de traducció, alternatius i convencionals.

Finalment, per determinar si les dues leucines candidates podien realment actuar com a inici de traducció alternatiu vam realitzar mutagènesi dirigida per a mutar-les, per separat, o delectant totes dues a la vegada. Els resultats obtinguts amb la delectió de les dues leucines, mostra una davallada en els nivells d'expressió de la proteïna de fusió (Figura 13), el que podria ser un clar indicatiu que aquestes leucines (una d'elles, almenys) estan actuant com a inici de traducció alternatiu fins ara desconegut.

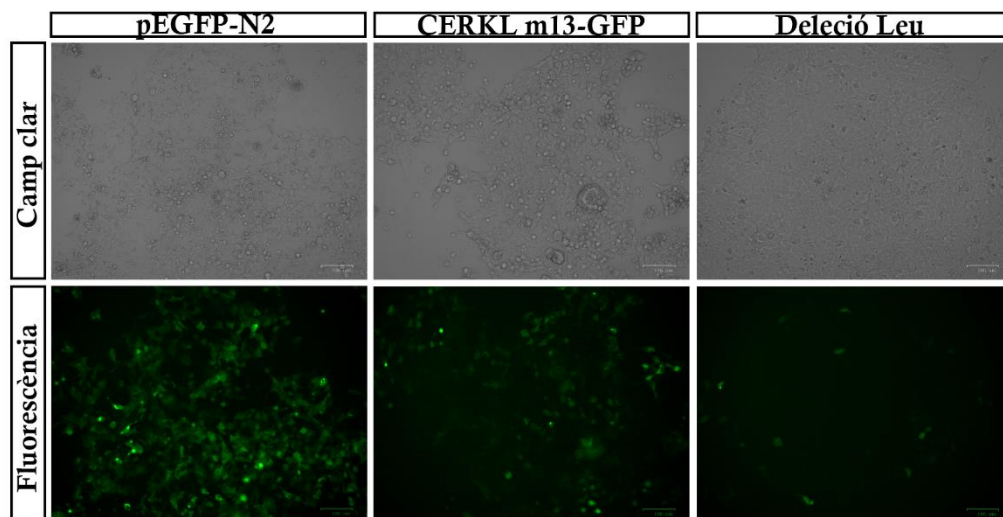


Figura 13. Visualització dels nivells d'expressió de GFP en cèl·lules transfectades, amb control buit, la isoforma CERKL m13-GFP, o aquesta construcció amb les dues leucines esmentades delecionades. S'observa una important davallada en els nivells de fluorescència de GFP quan les dues leucines estan delecionades.

Es requereixen més experiments, com ara una immunodetecció per *western-blot*, per confirmar que realment desapareix la banda CERKL-GFP d'aproximadament 75 kDa. Aquest és un treball que s'està duent a terme actualment, per una altra membre del grup.

ANNEX CAPÍTOL 1 - MATERIALS I MÈTODES

Separació de cons i bastons de la retina de ratolí per citometria de flux

Rentem les retines amb PBS 1x suaument i deixem que precipitin al fons del tub. Retirem el PBS 1x i dissociem les retines amb el kit *Neural Tissue Dissociation Kit* (Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach, Germany), seguint les instruccions del fabricant amb petites modificacions. Incubem al bany humit a 37°C durant 20 minuts, i cada 5 minuts, donem cops al fons del tub per disgregar les cèl·lules. Transcorregut aquest temps afegim *Hoescht 33342* (1:1.000) per marcar les cèl·lules

vives, iodur de propidi (1:1000) com a marcador de cèl·lules mortes, PNA-647 (1:100 o 1:50) per identificar als cons, i CD73-488 (1:100, 561545, BD Biosciences) per marcar als bastons, i incubem 1h a temperatura ambient amb un lleuger sacseig. Finalment, les mostres se seleccionen amb el *sorter* de cèl·lules *FACS Aria III*, segons el tipus de població cel·lular, quan passen pel capil·lar de l'aparell, cèl·lula a cèl·lula: en mortes, vives, i dins d'aquest últim grup, aquelles que estan marcades amb el fluoròfor 647 (població de cons), 488 (població de bastons), i les que estan doblement marcades amb els fluoròfors 488 i 647. En el nostre cas, recollim separadament les cèl·lules vives marcades amb el fluoròfor 647, 488 i les doblement marcades (no recollim les cèl·lules mortes). Finalment, centrifuguem a 1.000 rpm i congelem a -20°C el *pellet* de cèl·lules per realitzar pròxims experiments.

Aïllament de RNA i RT-PCR

L'RNA es va aïllar a partir de retines de ratolí mitjançant l'ús del kit *RNA isolation kit* (Roche, Basilea, Suïssa), tal i com està detallat a l'article presentat en el Capítol 1 d'aquesta Tesi. La retrotranscripció cap a cDNA també es va realitzar com està indicat en aquest manuscrit. Per tal de fer l'amplificació del cDNA, segons els experiments, es van usar diferents encebadors (Taula 5).

Taula 5. Llistat d'encebadors utilitzats en aquest Annex.

	Encebador <i>Forward</i> 5'→3'	Encebador <i>Reverse</i> 5'→3'
<i>Rodopsina</i>	<i>CACATCACTCCATGGCTACTTCGTC</i>	<i>TCAATGGCCAGGACCACCAG</i>
<i>S-opsina</i>	<i>TCCAAGAGCTCCTGTGTCTACAACC</i>	<i>GAGAGCCAGACACGTCAGATTCG</i>
<i>Cone Arrestin</i>	<i>CTACAACCTGCAGGCCTGGATGG</i>	<i>TCTTGATTCTTCTGATGACCTTGTGG</i>
<i>Gapdh</i>	<i>TGGAGAAACCTGCCAAGATGATG</i>	<i>TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG</i>
<i>Cerkl m13</i>	<i>CCGCTCGAGACGAGGAATTCGCCACG</i>	<i>GAGGAAGCTCTGCTCCAACGAG</i>
Leucina 1 (Leu→Ala)	<i>GTAGCACCAGGCATGATGCCTG</i> <i>AGCAAAGAAGAGTCCCTAG</i>	<i>CTAGGGACTCTTCTTTGCTCAGTG</i> <i>CATCATGCCTGGTGCTAC</i>

Leucina 2 (Leu→Ala)	<i>GTAGCACCAGGCATGATCTGGCA AGCAAAGAAGAGTCCCTAG</i>	<i>CTAGGGACTCTTCTTTGCTTGCC AGATCATGCCTGGTGCTAC</i>
ΔLeucines	<i>GTAGCACCAGGCATGATAGCAA GAAGAGTCCCTAGAA</i>	<i>TTCTAGGGACTCTTCTTTGCTAT CATGCCTGGTCGTAC</i>

Rodopsina, S-opsina, Cone arrestin i Gapdh: encebadors utilitzats per a la separació de cons i bastons. **Cerkl m13:** encebadors utilitzats per realitzar el clonatge. L'encebador *Forward* presenta la diana de restricció XhoI subratllada. **Leucina 1, Leucina 2 i ΔLeucines:** encebadors emprats per a la realització de la mutagènesi dirigida.

Clonatge en *cassette* de la isoforma *Cerkl m13*

Per dur a terme el clonatge en *cassette* de la isoforma m13 de *Cerkl* (HQ426692) es va amplificar mitjançant una PCR la part inicial de *Cerkl* del transcrit que prové del promotor de *NeuroD1*, amplificant un fragment de 823 bp amb els encebadors corresponents (Taula 5). Dins d'aquest fragment amplificat es troba una diana de restricció SacI. Un cop amplificat el fragment, es va purificar amb el kit (NZYtech MB01104) i es van digerir el vector CERKL-pGFP N2 i el fragment amplificat amb els enzims de restricció XhoI i SacI per tal de poder-lo clonar dins del vector en *cassette*. Després d'una lligació i transformació de cèl·lules *E. coli* DH5α (mètodes convencionals), les colònies positives que contenien el fragment de la mida adient es van seqüenciar per comprovar que la integritat de la construcció.

Transfecció en cèl·lules HEK 293

La transfecció de la isoforma m13 clonada en cèl·lules HEK 293 es va realitzar seguint el mateix protocol descrit en l'article presentat en aquest Capítol.

Immunodetecció per *western-blot*

Es va seguir el mateix protocol realitzat en l'article presentat en aquest Capítol, l'anticòs utilitzat va ser αGFP (Abcam 290) 1:1.000 (incubació tota la nit, a 4°C)

Immunoprecipitació

Es renten les cèl·lules 48h post-transfecció amb PBS 1x i es tripsinitzen. Un cop desenganxades de la placa es centrifuguen 5 minuts a 2.000 rpm. El *pellet* es resuspen en tampó RIPA i s'homogeneïtza amb un èmbol (*pellet pestle*). Seguidament s'afegeixen 6 µg d'anticòs αGFP (Abcam Ab290) i s'incuba tota la nit a 4°C. Al dia següent es renten 100 µL de boles de sefarosa (Sigma Aldrich GE17-0618-01) amb RIPA i s'afegeixen a la mostra per a incubar-ho durant 4h a temperatura ambient. Finalment, es realitzen rentats amb RIPA i s'elueix amb tampó Laemmli 1x.

Espectrometria de masses

Per realitzar aquesta tècnica les mostres es van portar a la Unitat de Proteòmica del Parc Científic de Barcelona on es van processar. Les mostres (bandes retallades d'un gel de poliacrilamida tenyit amb blau de *comassie* R-250) van ser netejades amb bicarbonat d'amoni (50mM NH₄HCO₃) i acetonitril (ACN). Les mostres van ser reduïdes (DTT 20mM; 60 minuts, 60°C) i alquilades (iodoacetamida 55 mM; 25°C, 30 minuts, a la foscor). Seguidament les mostres es van digerir durant tota la nit a 37°C amb Lys-C (Lysyl Endopeptidase®, Mass Spectrometry Grade, Wako). La barreja de pèptids resultats van ser extrets del gel amb un 5% d'àcid fòrmic (FA) en un 50% ACN, i un 100 % ACN, i es van eixugar amb un *SpeedVac* que a més ajuda a reduir el volum de les mostres. La barreja de pèptids secs es van analitzar en el cromatògraf *nanoAcquity liquid* (Waters) acoblat a l'espectròmetre de masses *LTQ-Orbitrap Velos* (Thermo Scientific). Les digestions triptiques van ser resuspeses en una solució amb un 1% de FA i una alíquota de cada mostra va ser injectada per la separació cromatogràfica. Els pèptids van ser atrapats amb la columna *Symmetry C18TM* (5µm 180µm x 20mm; Waters), i van ser separats amb una columna de capil·laritat inversa C18 (ACQUITY UPLC BEH; 130Å, 1.7µm, 75 µm x250 mm, Waters). El gradient utilitzat per l'elució de pèptids va ser de 1 al 40 % B en 30 minuts, seguit d'un gradient del 40% al 60% en 5 minuts (A: 0.1% FA; B: 100%

ACN, 0.1%FA; ritme de flux: 250 nL/minuts). Els pèptids eluïts van estar sotmesos a un electrospray d'ionització en una agulla emissora (PicoTip™, New Objective) amb un voltatge aplicat de 2.000V. Les masses dels pèptids (m/z 200-1800) es van analitzar amb un mode de dades dependents on el *Scan* sencer de l'espectrometria de masses (MS) va ser adquirit a *Orbitrap* amb una resolució de 60.000 FWHM a 400 m/z . Fins els 15 pèptids més abundants (mínim intensitat de 500 comptatges) van ser seleccionats de cada *scan* de MS i llavors fragmentats al *linear ion trap* usant CID (38% col·lisió d'energia normalitzada) amb heli com a gas de col·lisió. Els paràmetres del *scan* van ser: Full MS: 250 ms (1 microscan) i MSn: 120 ms. Les dades generades es van ser recollides amb *Thermo Xcalibur* (v.2.2).

Mutagènesi dirigida

Per realitzar aquesta tècnica es van dissenyar un parell d'encebadors per mutar la primera leucina per una alanina, el mateix per la segona leucina i finalment una parella d'encebadors per eliminar les dues leucines (Taula 5) Seguidament es realitza una PCR amb una polimerasa d'alta fidelitat i es digereix amb DpnI (Roche) durant 1h a 37°C. Finalment, es procedeix a transformar cèl·lules d'*E. coli* DH5 α .

Capítol 2

El paper de CERKL front a l'estrès
cel·lular

Publicació 2

*The Relevance of Oxidative Stress in the Pathogenesis
and Therapy of Retinal Dystrophies*

PUBLICACIÓ 2**TÍTOL**

“The Relevance of Oxidative Stress in the Pathogenesis and Therapy of Retinal Dystrophies”

AUTORS (ANY)

Elena B. Domènech i Gemma Marfany (2020).

REFERÈNCIA

Antioxidants, 9 (4): 347, DOI: 10.3390/antiox9040347 (Índex d'impacte 4,520). D1 - Chemistry, Medicinal

RESUM

La supervivència de les cèl·lules de la retina requereix un equilibri entre l'oxigen, les espècies reactives de l'oxigen i les molècules antioxidants que contraresten el dany causat per l'estrès oxidatiu. L'estrès oxidatiu altera l'homeòstasi cel·lular i desencadena una resposta cel·lular de protecció, que és d'elevada importància als fotoreceptors i a les cèl·lules ganglionars, ja que són neurones amb una elevada taxa metabòlica que contínuament estan subjectes a estímuls d'estrès oxidatiu/lumínic. En aquesta revisió, hem analitzat com alteracions en les vies endògenes de protecció contra l'estrès oxidatiu provoquen una disfunció retinal en malalties visuals prevalents (AMD, glaucoma), així com també en malalties genètiques rares de la retina (RP, LHON). En aquest treball també s'indiquen alguns dels factors moleculars claus de l'estrès oxidatiu a retina i es discuteixen possibles teràpies mitjançant l'ús d'agents antioxidants i moduladors de l'expressió gènica, per tal de tractar els efectes nocius de l'estrès oxidatiu en distròfies retinals multifactorials i rares.

APORTACIÓ PERSONAL AL TREBALL

La meva aportació a aquest treball ha estat la cerca i recopilació de la informació, la síntesi i integració de les dades, l'elaboració de figures i taules originals, així com l'escriptura de l'esborrany.



Review

The Relevance of Oxidative Stress in the Pathogenesis and Therapy of Retinal Dystrophies

Elena B. Domènech ^{1,2} and Gemma Marfany ^{1,2,3,*}

¹ Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Avda. Diagonal 643, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; elenabdomenech@ub.edu

² CIBERER, ISCIII, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

³ Institute of Biomedicine (IBUB, IBUB-IRSJD), Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

* Correspondence: gmarfany@ub.edu

Received: 29 March 2020; Accepted: 21 April 2020; Published: 23 April 2020



Abstract: Retinal cell survival requires an equilibrium between oxygen, reactive oxygen species, and antioxidant molecules that counteract oxidative stress damage. Oxidative stress alters cell homeostasis and elicits a protective cell response, which is most relevant in photoreceptors and retinal ganglion cells, neurons with a high metabolic rate that are continuously subject to light/oxidative stress insults. We analyze how the alteration of cellular endogenous pathways for protection against oxidative stress leads to retinal dysfunction in prevalent (age-related macular degeneration, glaucoma) as well as in rare genetic visual disorders (Retinitis pigmentosa, Leber hereditary optic neuropathy). We also highlight some of the key molecular actors and discuss potential therapies using antioxidants agents, modulators of gene expression and inducers of cytoprotective signaling pathways to treat damaging oxidative stress effects and ameliorate severe phenotypic symptoms in multifactorial and rare retinal dystrophies.

Keywords: oxidative stress damage; oxidative stress response; photoreceptors; retina; age-related macular degeneration (AMD); glaucoma; retinitis pigmentosa; leber hereditary optic neuropathy (LHON)

1. Introduction

Oxidative stress (OS) alters cellular homeostasis and elicits a cell response that depends on the severity and the type of insult. Essentially, there is a limiting stress threshold: below the threshold, cells elicit protective mechanisms designed to ensure survival. Conversely, if stress surpasses the threshold or the activation of protective mechanisms fail, cells trigger alternative signaling pathways that eventually lead to apoptosis, necrosis, pyroptosis, or autophagic cell death [1–4].

Cell survival requires an equilibrium between oxygen and antioxidant molecules. Reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), oxygen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH^{\bullet}), peroxy radical, and the second messenger nitric oxide (NO^{\bullet}) (which interacts with superoxide anion to form peroxynitrate ($ONOO^-$)), are the major sort of ROS present at the cellular level. Usually, there is an equilibrium between oxidative species and antioxidant defense mechanisms, which are mediated by enzymes responsible for metabolizing or neutralizing ROS, e.g., catalase, glutathione peroxidase, or superoxide dismutase (SODs) [5–8].

ROS are generated in many enzymatic processes and in redox reactions. Mitochondrial respiratory chain is one of the main ROS sources in cells. In the inner mitochondrial membrane, electrons are transported and oxygen is converted into water. Under hypoxia conditions this process is not completed, resulting in an increase of superoxide anions. The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) is the main source of ROS derived from superoxide anions. NOX is an

oxidase family of seven members, and among them is NOX4, which generates superoxide anions and hydrogen peroxide [7].

These free radicals are small molecules/ions that are reactive with small activation energies and short lifetimes [9]. There are many environmental agents that can promote ROS generation (e.g., pollution, cigarette smoke, sunlight). Nonetheless, they can also result from reactions occurring in the body like incomplete catabolism, hepatic detoxification or energy production. An intracellular increase of these oxidant agents causes damage to different cellular components and as a consequence, specific pathways linked to cell senescence are activated [10]. OS can damage lipids, proteins enzymes, carbohydrates, and DNA, thus inducing cell death (Figure 1). In humans, OS is at the basis of several neurodegenerative and cardiovascular diseases, cancer, diabetes, and autoimmune disorders [4,10], but the focus of this review is the oxidative stress damage in the retina and the diseases associated to an impaired cell response.

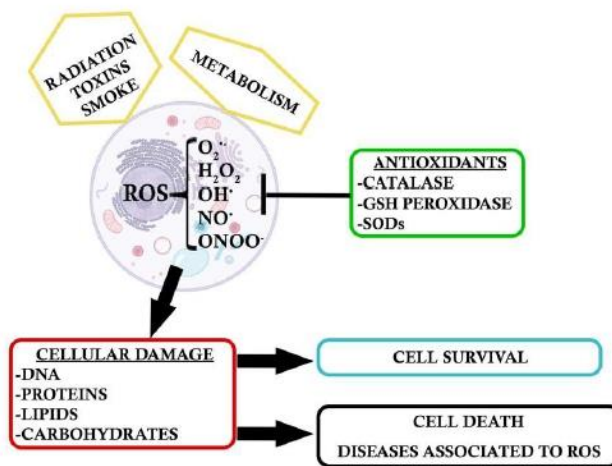


Figure 1. Oxidative stress agents generate Reactive Oxygen Species (ROS), which are counteracted by antioxidant enzymes. An excess of oxidative stress leads to cellular damage, which can trigger pathways for either cell survival or cell death.

2. Environmental Oxidative Stress

2.1. Air Pollution and Cigarette Smoke

Air pollution and cigarette smoke are environmental toxic factors that induce the production of ROS. Exposure of the eye to air pollutants increase the risk of suffering glaucoma due to the increase of ROS and the consequent inflammatory response [11]. Cigarette smoke contains nicotine, which promotes nitric oxide production, a molecule that increases the levels of proangiogenic factors [12], whereas the cadmium present in tobacco accumulates into retinal pigment epithelium (RPE) cells and the choroid, thereby increasing ROS production [13]. Additionally, hydroquinone (HQ), a natural oxidant present in food, plastics, and polluted air, is also induced by cigarette smoke. Finally, several studies show that cigarette smoke extract (CSE) induces alterations in mitochondrial integrity and an increase of lipid peroxidation, thus leading to cell death in the retinal pigment epithelium (RPE) [14].

2.2. Light-Induced Oxidative Stress

Humans are essentially diurnal animals and are constantly exposed to sunlight, which induces lipid and protein oxidation. In fact, mammalian retinas are especially sensitive to light (which also include high energy UV wavelengths) stress. Photoreceptors and RPE cells generate high levels of ROS due to different factors: (i) the retina is a neuronal tissue characterized by extremely high oxygen

consumption related to a highly demanding metabolism; (ii) photoreceptors are constantly exposed to light and contain several photosensitizer molecules; (iii) photoreceptor membranous disks are enriched in polyunsaturated fatty acids, which are particularly sensitive to oxidation damage; and (iv) the daily recycling of photoreceptor disks damaged by oxidative stress is performed via phagocytosis by RPE cells, and consequently, oxidative damage to photoreceptors induces accumulation of ROS in the RPE. Photooxidation causes lipofuscin accumulation, which is the oxidation byproduct of lipids and lipoproteins containing photo-oxidable fluorophores [15,16]. High levels of light-induced oxidative stress eventually triggers photoreceptor and inner retina apoptosis [17,18] and severely affects the phagocytic function of the RPE [19].

3. Intrinsic Response to Oxidative Stress

3.1. Inflammation and Gliosis

An inflammatory response is a natural defense mechanism against injuries. Innate immunity is considered the immediate immune response to an insult or pathogen. The retina is equipped with a highly sensitive innate immune system that responds with three key pathways: migration of microglia cells, activation of the complement system to opsonize cellular debris, and inflammasome assembly in the RPE (reviewed in [20]). To achieve this coordinated response, retinal cells express a panoply of immune protein receptors and mediators such as, microbial sensors (Toll-like receptors-TLRs), NOD-like receptors-NLRs, RIG-1 like helicases), cytokines, chemokines, as well as a group of complement components; all directed to assist the cells with eliminating the current insult [21]. In oxidative stress conditions, rapid activation of this immune response is intended to induce restoration of tissue homeostasis, but upon persistent damage, chronic overactivation of the inflammatory response can cause devastating tissue remodeling and destruction, thus leading to irreversible retinal pathologies, such as age-related macular degeneration (AMD) or diabetic retinopathy (DR).

Several chronic diseases are associated with protein oxidation due to high ROS production. Protein oxidation activates the release of inflammation regulatory proteins such as peroxiredoxin 2 (PRDX2). The role of OS as a key trigger of pathogenic inflammation in chronic inflammatory diseases has been well established. Indeed, pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , interleukin-1 β , or interferon- γ induce ROS production in RPE cells. In fact, these pro-inflammatory cytokines are upregulated in the eyes of patients suffering glaucoma, age-related macular degeneration (AMD), diabetic retinopathy, or retinal vein occlusion. Particularly, endothelial cells affected by inflammation show phenotypic changes due to the increase of the expression of inflammatory mediators and cytokines as well as iNOS activation [21].

As mentioned, one of the first response of the retina to external damaging stimulus, such as oxidative stress, is reactive gliosis, in which astrocytes, microglial, and macroglial cells are activated. Microglia cells are resident retinal macrophages that confer neuroprotection against ROS damage and other injuries. In healthy retinas, microglial cells phagocytose accumulated waste products and cellular debris but under oxidative stress, hypoxia, or inherited mutations, NF κ B-mediated inflammatory responses are activated, and microglial cells acquire amoeboid morphology, proliferate, and migrate to the sites of injury, as detected by Iba-1 positive cells in the photoreceptor layer [21,22]. Oxidative stress promotes the degradation of sialic acid residues of membrane proteins, leaving photoreceptors and other cells with a damaged glycocalyx, and leading to enhanced phagocytosis by microglial cells, and increasing neuronal cell death, which worsens the pathology.

On the other hand, macroglia Müller cells, which constitute the columns of the retinal tissue and with multiple connections with retinal neurons, microglia, astrocytes, and endothelial cells, modulate different responses according to the severity of the stimulus. The activation of these macroglial cells involves hypertrophy, which entails overexpression of vimentin (an intermediate filament) and the glial-acidic fibrillary protein (GFAP), considered a hallmark of retinal stress. As an immediate response

to acute non-permanent stimuli, Müller cells promote the secretion of trophic and antioxidant protective factors, but upon chronification, their secretory role may be clearly deleterious for neuronal cells [23].

3.2. Endoplasmic Reticulum Stress

Endoplasmic reticulum (ER) is the main cellular compartment responsible for protein biosynthesis and folding. This organelle is one of the main cell sensors to stress insults. Alterations of the ER redox status can negatively affect protein folding and result in ER stress [24]. ER stress leads to the activation of three transmembrane proteins: inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α), PKR-like ER kinase (PERK), and the activation transcription factor 6 (ATF6), which in turn or jointly initiate the unfolded protein response (UPR) [25,26]. Several reports show the role of UPR in controlling OS response and cell survival in RPE cells [27,28].

The retina and RPE of mice exposed to cigarette smoke showed an increase of CHOP, a sensor that triggers cell apoptosis. In cultured human RPE cells, inhibition of ER stress attenuated apoptosis and cell death induced by oxidants including hydroquinone and CSE [28,29]. Usually, transient ER stress can be overcome by UPR but if the damaging stimulus persists, inflammatory response genes are activated [25,26]. Indeed, the accumulation of misfolded proteins plays a key role in the development and progression of ocular diseases such as retinitis pigmentosa (RP), AMD, and glaucoma [25].

On the other hand, intrinsic genetic factors, such as several causative dominant mutations in RP, cause protein misfolding of highly expressed transmembrane proteins, which causes ER stress and activation of the unfolded protein response (UPR) in photoreceptor cells. Chronically activated UPR in degenerating retinas activate pro-apoptotic programs associated with oxidative stress, pro-inflammatory signaling, dysfunctional autophagy, free cytosolic Ca²⁺ overload, and altered protein synthesis rate in the retina (as extensively reviewed in [30]).

3.3. High Metabolic Rate of the Retina

Photoreceptor outer segments are densely packed with membranes and opsin proteins [31]. In fact, lipids constitute 15% of the mass of a photoreceptor. Photoreceptors need large amounts of ATP to maintain the membrane potential [32], as the outer segments of photoreceptors are in constant renewal. Mutations in genes that compromise cell metabolism, such as the *isocitrate dehydrogenase-3 β* gene (which encodes a mitochondrial enzyme), are associated with photoreceptor degeneration and result in RP [33].

The isomerization of 11-*cis*-retinal in the visual cycle can lead to the formation of compounds that are reactive with short wavelength light, generating free radicals [34]. The high metabolic rate of photoreceptor cells is an intrinsic factor that causes ROS as a consequence of the high mitochondrial metabolism. Moreover, photoreceptor cells are localized near arteries due to their high demand of oxygen, but upon photoreceptor death, consumption in the retina decreases. Blood circulation in the choroidal vessels does not adapt to this decrease and thus, the consequent hyperoxia could cause oxidative damage [35].

On the other hand, mTOR levels or activity might be altered in some inherited visual disorders. The activity of mTOR, a key regulator of cellular metabolism (e.g., translation, macroautophagy, and metabolic pathways), is regulated by phosphorylation. Several studies showed that the phosphorylation of mTOR was reduced in the dorsal cones of retinitis pigmentosa mouse models. In addition, L/M opsin protein levels were also decreased, probably reflecting a reduction in translation, which is under the control of mTOR. Thus, mTOR phosphorylation status in RP might be low due to the cells suffering from some type of nutrient deprivation and/or metabolic dysregulation [32], further linking metabolism alterations and oxidative stress to retinal pathogenesis (see below, Section 10).

4. Endogenous Antioxidants: Dual Role of NF- κ B and the Antioxidant NRF2

Although ROS are toxic agents for cell viability, particularly in chronic conditions, they can also play a beneficial role when present at low levels because these molecules activate cell protective mechanisms upon injury.

The balance between oxidants/antioxidants is finely regulated to avoid ROS to overcome a damaging threshold. Cells enable different mechanisms to counter the OS with antioxidants, which can be produced endogenously in an endocrine or paracrine pathway, or exogenously, acquired from food or supplements. In either case, antioxidants work as scavengers to neutralize free radicals, preventing and repairing the damage caused by ROS, thus antioxidants enhance immune defense and reduce the risk of suffering some diseases.

Antioxidant enzymes play a key role in the first response to reduce ROS levels, hence redox regulation by transcription factors is essential in determining gene expression profiles and coordinating cell response under oxidative stress conditions [36]. Cells are equipped with several kinds of antioxidants: (i) low-molecular-weight antioxidants, such as ferritin, ascorbic acid, reduced glutathione (GSH), and α -tocopherol, etc., and (ii) high-molecular-weight antioxidants, such as catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reductase, etc. [37]. In this review, we will focus on two essential antioxidant pathways essential to battle oxidative stress, controlled by specific transcription factors, NF- κ B and NRF2.

The nuclear transcription factor κ B (NF- κ B) belongs to a transcription factor family involved in inflammatory and immunity pathways. NF- κ B also plays an important role in developmental processes, cell growth and survival, proliferation and several pathological conditions. NF- κ B plays a dual role upon oxidative stress: despite in most cases works as an antioxidant agent promoting cell survival, it may also function as an oxidant agent and causes cell death. NF- κ B influence ROS levels increasing antioxidant proteins expression (among others, SODs, ferritin, thioredoxin, peroxidase glutathione, dihydrol dehydrogenase), whose function is to protect cells against oxidative stress by reducing or neutralizing ROS. On the other hand, NF- κ B plays an important role in activating inflammatory pathways because it also targets genes encoding enzymes that trigger ROS production (NOX2, iNOS, nNOS, cyclooxygenase 2, etc.), and their increase in activity can eventually lead to cell death [38,39].

The nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (NRF2, also named NFE2L2) is a transcription factor (TF) that regulates antioxidant defenses. In normal conditions, NRF2 is lowly expressed and localizes at the cytoplasm, where it interacts with KEAP1, which favors its ubiquitination and degradation via proteasome. In contrast, under oxidative stress conditions, NRF2 expression levels increase and it is translocated to the nucleus, where dimerizes with MAF proteins and binds to gene promoters that encode antioxidant enzymes such as SODs, catalase, S-transferase glutathione, which in combination, scavenge ROS [4,7,8].

NRF2- and NF- κ B-pathways regulate the fine redox cellular balance, oxidative stress, and the inflammatory response. Imbalance between NRF2 and NF- κ B pathways is associated with a significant number of diseases ranging from neurodegeneration and autoimmune disorders to cancer. The interaction between these two pathways is carried through complex molecular interactions that usually depend on the cell type and the tissue context. These interactions act through transcriptional and post-transcriptional mechanisms, and allow finely tuned dynamic responses to a changing environment [39,40]. Therefore, it comes as no surprise that they are also relevant in retinal pathologies associated to oxidative stress, for instance in AMD (see below, Section 9).

5. Stress Granules (SG) Formation

In response to environmental stress (heat, hyperosmolarity, oxidative stress, etc.) eukaryotic cells shut down protein synthesis in a stereotypic manner to preserve anabolic energy to repair stress induced damage. The translational arrest is selective: while the translation of constitutively expressed genes (housekeeping genes) is hampered, the translation of stress-inducible transcripts encoding heat

shock proteins among others is enhanced or favored [41]. To protect those mRNAs that are not going to be translated yet, the cell initiates a signaling cascade to form stress granules (SG), which are a complex of a variable number of proteins that bind and protect mRNAs upon stress stimuli in order to avoid their degradation.

On top of the signaling cascades responsible for cell translation reprogramming upon stress are the family of serine/threonine kinases. Some members of this family of environmental stress sensors are: (i) PKR, a double strand RNA-dependent kinase, activated with viral infections, heat, and UV radiation; (ii) PERK/PEK, an ER protein that is active in response to the accumulation of misfolded proteins in the ER; (iii) GCN2, a sensor of intracellular amino acid levels that responds to amino acid deprivation; (iv) HRI, a hemo-regulated kinase that ensures the synthesis of globin chains and hemo during erythrocytes maturation. All of these sensors phosphorylate eIF2 α .

eIF2B is a GTP/GDP exchange factor and a key regulator of the ternary complex (composed by the unit eIF2 $\alpha\beta\gamma$, a tRNA^{iMet}, and GTP), which loads the initiator tRNA^{iMet} on the small ribosomal subunit to start protein synthesis. Translation is usually started when eIF5 hydrolyzes GTP in the pre-initiator complex and its initiation factors are moved out allowing the big ribosomal subunit to couple. The additional ribosomes coupling turns the RNA into a polysome (Figure 2). Upon oxidative stress, the activation of one or more eIF2 α kinases results in the phosphorylation and consequent inhibition of eIF2 α , thus reducing the availability of the eIF2-GTP-tRNA^{iMet} complex, and the binding to EIF5 [41] (Figure 2). Pre-initiator complexes deficient in eIF2/eIF5 stall the complex, which is then named 48S* [42]. The 48S* complexes and their cognate mRNAs are redirected in a process that requires the RNA binding proteins, TIA-1 and TIAR. These two proteins, usually localized into the nucleus, are highly dynamic and shuttle from the nucleus to the cytoplasm. In response to cellular stress, TIA-1 and TIAR accumulate into the cytoplasm, bind the 48S* complexes and rapidly promote the formation of SGs [41] (Figure 2). SGs are membrane-less organelles that behave as lipid droplets [43]. The absence of the big ribosomal subunit within these aggregates precludes SGs being translational foci during the duration of the stress stimulus. RNA binding proteins, like PABP, could either promote or inhibit mRNA stability and are also recruited to SGs, in consequence the mRNA fate is determined by the activity of these proteins. However, the presence of the small ribosomal subunit within these aggregates indicates that SGs could be related with polysomes since the latter show a very similar composition to SGs. SGs are highly dynamic complexes and the fact that the mRNAs shift in and out of the SGs leading to a dynamic equilibrium between polysomes and SGs (Figure 2) [41,42,44].

Recently, the insoluble transcriptome of RNA binding proteins (RNPs) has been characterized in response to different stress stimulus, for instance, in response to ER stress, oxidative stress induced by a toxic agent like sodium arsenite, or heat shock. These analyses show that there is a dynamic and differential distribution of RNAs in the soluble fraction of the cytoplasm and cytosolic RNPs depending on the stress stimulus [45]. Therefore, the differential recruitment of distinct RNAs into SGs could be one of the main cell regulatory mechanisms of gene expression and the functional transcriptome as a response to stress. Different RNAs will be protected depending on the stress stimuli, tissue and cell requirements. Defective regulation of the subcellular localization of RNAs or mutations in the proteins involved in the formation of the RNPs and SGs are associated to several human diseases including cancer and neurodegeneration [45,46]. In these diseases, in which cells are usually under continuous stress, the dynamic relationship of RNA and proteins in response to shifting extreme stress conditions could be a key factor to understand their etiopathogenesis.

Again, neuronal tissues, such as the retina, need a careful balance between the response to oxidative stress and the formation of SGs; between stalling translation and producing the protein levels physiologically required for cell survival.

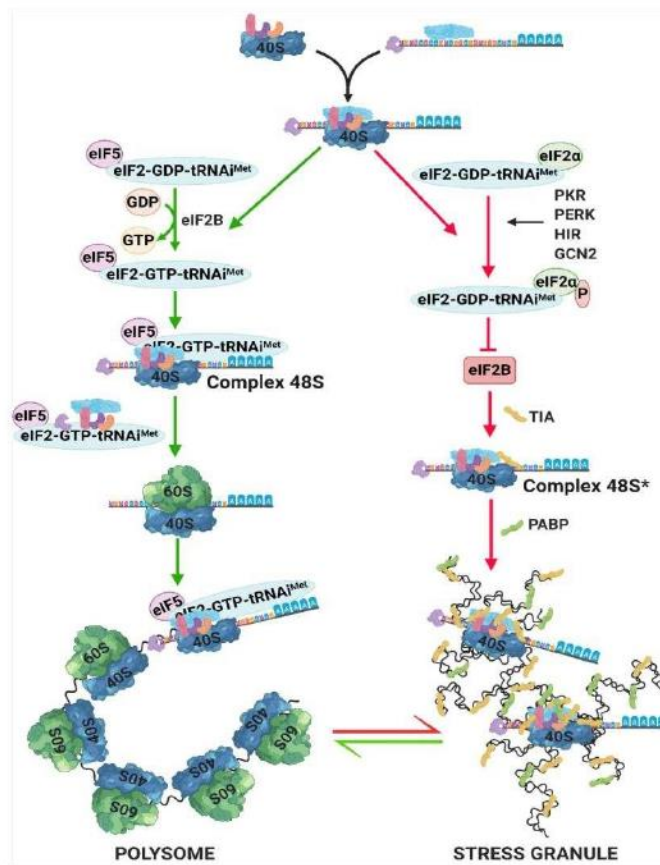


Figure 2. Translational start in presence or absence of cellular stress. In normal conditions and in absence of stress (green arrow pathway), eIF2B catalyzes the exchange of GDP to GTP and allows the coupling of the ternary complex to the 48S complex. The ribosomal subunit 60S can join the complex and the addition of more ribosomes to this complex make a polysome, which is able to translate the mRNA. Upon cellular stress (red arrow pathway), eIF2 α is phosphorylated by stress sensor kinases and inhibits eIF2B, precluding the binding to EIF5. The ternary complex generates a 48S* complex instead, which is deficient in eIF2/eIF5 and unable to start the translation. This complex recruits TIA-1 and TIAR proteins to form the SGs. Additionally, SGs recruit more RNA binding proteins, such as PABP. mRNAs move in and out of SGs depending on the cellular translational requirements. Thus, SGs are highly dynamic complexes, in equilibrium with polysomes.

6. Oxidative Stress Impact on Autophagy and Mitophagy

6.1. Autophagy and Oxidative Stress

Autophagy is a conserved cell survival pathway that catabolizes damaged proteins and organelles to maintain homeostasis. Nonetheless, in response to different stimuli and cellular contexts, autophagy can also modulate cell viability, either enhancing cell survival or cell death. Autophagy is involved in a number of different processes in the retina participating in development and tissue remodeling and it is also implicated in photoreceptor cell death in response to calcium cytotoxicity, structural damage, and oxidative stress [35,47]. On the other hand, the aged retina is characterized by increased levels of reactive oxygen species (ROS), impaired autophagy, excessive energy consumption, and DNA damage, all of which contribute to the degeneration of RPE cells and link to AMD pathogenesis [48,49]. Besides,

autophagy is not only linked to AMD but also to glaucoma, since dysregulation of autophagy can harm the outflow path of the trabecular meshwork, whereas promotion of autophagy via rapamycin treatment may have a cytoprotective effect upon oxidative stress [50].

Overall, an impairment of autophagy due to oxidative stress is related with several age-related eye diseases such as dry eye diseases, corneal dystrophy type 2, cataracts and retinal dystrophies like AMD, glaucoma, DR, and retinal artery occlusion [51,52].

6.2. Mitophagy and Oxidative Stress

Mitochondria are essential organelles that supply energy to the cell through oxidative phosphorylation (OXPHOS) and are also essential in calcium buffering, cell cycle control and regulation of apoptosis. Mitochondrial activity generates 1–5% ROS in physiological conditions [53]. Several studies demonstrated that autophagy may also display unique functions in axons, even independently from the function in soma and dendrites. In mammalian neurons, axons are rich in mitochondria, where ROS are predominantly produced. The acute burst of ROS in mitochondria may be a crucial activator of mitophagy, which is a process of mitochondria-selective autophagy in response to specific signals, including oxidative stress, starvation, and modification of mitochondrial proteins [54]. Mitochondrial dysfunction is an important pathological element mediating the onset of neurodegenerative disorders (e.g., *PARK2* mutations are associated with increased ROS and mitochondrial dysfunction in patients with Parkinson disease), and previous work in mouse models suggests that *Park2*-deficient photoreceptors exhibit ectopic mitochondria localization upon light exposure, thus suggesting that aberrant trafficking of damaged mitochondria might be one of the mechanistic aspects of retinal degeneration [55].

Under stress, a delicate balance between both mitochondrial fission and fusion is required to maintain functional mitochondria [53]. An excess of mitochondrial fission leads to mitochondrial fragmentation, whereas increased fusion results in mitochondrial elongation. Failure in any of the components of the machinery controlling mitochondrial dynamics may lead to RPE degeneration. Impairment of autophagy/mitophagy leads to increased protein aggregation in RPE and mitochondrial dysfunction evokes chronic RPE-derived inflammation [56].

Mitophagy is also relevant for the homeostasis of neuronal long axons subject to ROS and other stress insults. Retinal ganglion cells, whose long axons confluence to form the optic nerve, are particularly dependent on appropriate mitochondrial trafficking and dynamics in excess of ROS production by damaged mitochondria [57,58].

6.3. Cross-Talk between Autophagy and the Endoplasmic Reticulum (ER)-Mitochondria Axis in Oxidative Stress

ER-mitochondria interactions play a key role in the executing and regulating mitochondrial mitochondrial fission and fusion. For instance, in mitochondrial fission, the physical interaction between the membranes of the two organelles is directly demonstrated by the role of the ER tubules in encircling mitochondria and marking the sites of mitochondrial division. Thus, the ER regulates mitochondrial dynamics, and alterations in mitochondrial morphology uniquely reflect cell health. In non-oxidative conditions, the NLRP3 protein, a sensor of OS that triggers the formation of inflammasomes, is located on the ER. However, upon oxidative stress and in response to inflammation, NLRP3 relocates to ER-mitochondria contact sites (MAMs) thus enabling efficient sensing and monitoring of damaged mitochondria, which generate high levels of ROS. The ER and mitochondria reciprocally transmit danger signals through physical contacts, thus reinforcing their communications and triggering multiple and synergistic responses to oxidative stress, among them, promotion of autophagosome formation to degrade damaged mitochondria [59].

To sum up, autophagy plays a protective role against oxidative stress and other cell injuries but the accumulation of autophagosomes due to prolonged insult is also harmful to cells [60]. Therefore, the increase of autophagy in early stages of a disease or a punctual damaging input protects retinal

cells, but sustained or dysfunctional autophagy may result harmful, particularly to photoreceptor and retinal ganglion cells. Indeed, dysfunctional autophagy, and particularly mitophagy, have been associated to diabetic retinopathy and glaucoma [61].

7. Oxidative Stress Effect on Retinal Lipid Peroxidation

The retina presents a high content of lipid composition. For this reason, alterations in lipids composition or balance may affect visual capacity. For instance, mutations in *ELOVL4* cause dominant Stargardt disease. *ELOVL4* is an elongase that generates very long chain polyunsaturated fatty acids VLC-PUFA in the retina. Mutations in this gene have pleiotropic effects by directly altering VLC-PUFA signaling, enlarging the membrane rim curvature of photoreceptor disks and impacting on the size of ribbon synapses [62].

Lipid peroxidation is a consequence of ROS damage, and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are particularly susceptible to ROS. The high content of lipids in the retina and the constant exposure to light make this organ in special risk for lipid peroxidation. Once initiated by any of several pathways, lipid peroxidation, oxidative damage of membrane lipids, spreads aggressively in a self-propagating chain reaction, amplifying oxidative damage [63]. Lipid peroxides is reported to be related with the progression of diabetic retinopathy and age-related macular degeneration [64].

On the other hand, several studies have shown that accumulation of specific lipids, called lipofuscin, in RPE cells generates reactive oxygen species through phototoxicity. The accumulation of lipofuscin and subsequent generation of ROS upon light damage is a well-known triggering factor of macular degeneration in AMD and Stargardt disease [65]. Recent transcriptomic studies on RPE cells treated with oxidizing agents produced in the visual cycle showed differential expression of genes involved in oxidative stress response, angiogenesis, apoptosis, autophagy, and extracellular matrix remodeling, but particularly alteration of miRNAs and target genes as well as of extensive alternative splicing events that could also relate to the regulation of specific survival pathways [66,67].

8. Oxidative Stress Induces DNA Damage and Mutations

As aforementioned, oxidative stress induces a variety of structural and functional changes to lipids, proteins, and both nuclear and mitochondrial DNA. For instance, oxidative stress provokes accelerated telomere shortening. Telomeres are specialized structures at the end of chromosomes that contain characteristic repetitive G-rich DNA sequences (TTAGGG) that when damaged or shortened can induce an altered cellular phenotype that promote senescent traits. Some studies show that oxidative stress induces single-stranded breaks in telomeric DNA in RPE cells in vitro and cells with longer replicative life spans, which are more susceptible to oxidative stress and accumulate DNA damage [68].

Moreover, mtDNA is particularly sensitive to oxidative injury because: (i) mtDNA is localized close to the source of ROS production, (ii) it is not covered by histones, (iii) it is a circular intron-less circular DNA with high transcription rate, and (iv) the DNA repair system within the mitochondria appears to be less effective than that in the nucleus. mtDNA damage is particularly detrimental to non-dividing cells such as those in brain, heart skeletal muscles, photoreceptor and other retinal cells, such as and RPE cells [69]. Polymerase γ , which function is DNA repair, upon oxidative stress conditions it is oxidized causing a decreased activity. Consequently, photoreceptors are damaged and may favor the progression of retinal dystrophies such as AMD [70]. In response to oxidative damage, several cytoprotective pathways can be activated in RPE cells, e.g., via NFR2 and PGC1a, to promote mitochondrial biogenesis and mtDNA replication as well as to maintain telomere length [71]. In fact, an exquisite balance between mitochondria biogenesis and damaged mitochondrial clearance by either the ubiquitin-proteasome system and lysosomal mitophagy, and between mtDNA replication and repair pathways is crucial for proper RPE function. Any alteration of mitochondrial homeostasis leads to macular damage, a hallmark of AMD degeneration (as recently and comprehensively reviewed [56].

On the other hand, rare genetic mutations can cause specific sensitivity to oxidative and light stress in the retina. At least in mice, haploinsufficiency of *Mef2d* renders photoreceptors more susceptible to light-induced damage because they are unable to up-regulate *Nrf2* upon oxidative stress [72]. Besides, and at least in vitro, *SEMA4A* mutations make RPE cells more susceptible to light irradiation, ROS and ER stress [73].

Further work is required to identify polymorphic variants in relevant oxidative stress response genes that increase genetic susceptibility to oxidative stress in the retina, and may act as triggering factors in prevalent retinal degeneration pathologies (such as AMD and glaucoma) or as modifier genes in rare mendelian retinal disorders (such as RP, macular dystrophies, or Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON)).

9. Oxidative Stress, Genetic Factors, and Prevalent Retinopathies

9.1. Oxidative Stress and Glaucoma

Oxidative stress (OS) damages the DNA of the trabecular meshwork (TM), which is responsible for aqueous humor draining of the anterior eye chamber [74]. In glaucoma patients the levels of NOS and nitrosine in the TM are increased, thus reflecting high OS in the TM, which in turn lead to chronic changes in the aqueous and vitreous humor. Glaucoma phenotypic signature is the optic nerve retinopathy, due to the loss of retinal ganglion cells (RGCs). The apoptosis of RGCs is a direct consequence of axonal damage caused by high intraocular pressure, but also it is the indirect result of the increase in ROS caused by the death of RGCs affected by the ocular pressure. Therefore, intraocular pressure is the main factor causing ganglion cell death, although progression of glaucoma is also dependent on reduced optic disk perfusion, which result in the subsequent activation of hypoxia response genes [74].

Optineurin (*OPTN*) is a glaucoma-causative gene. Perfusion studies show that *OPTN* expression increases after 2 to 7 days of elevated IOPs (intraocular pressure) [75]. *OPTN* has been also proposed to exert a protective role in glaucoma development [76]; however, in a transgenic mouse model that overexpressed *Optineurin*, high levels of this protein in the lens and the retina failed to protect against transforming growth factor- β 1-induced apoptosis [77]. Other investigators showed that *Optineurin* overexpression protects cells from hydrogen peroxide-induced cell death, and the *OPTN* E50K mutation decreased the neuroprotective effect by compromising mitochondrial membrane integrity, which resulted in cells less fit to survive under stress conditions [78]. Indeed, the role of *Optineurin* in glaucoma pathogenesis requires further study, particularly, whether its overexpression can be a protective measure in retina upon oxidative stress.

9.2. Oxidative Stress and Age-Related Macular Degeneration (AMD)

AMD is one of the main causes of blindness in western countries, characterized by the loss of RPE cells and photoreceptors in the macula area. AMD retinas display extracellular deposits, known as drusen, between Bruch's membrane and the RPE [79]. RPE cells are prone to produce ROS due to the high metabolic rate. Moreover, these cells are exposed to ROS as a consequence to iron ions accumulation, sunlight exposure, or cigarette smoke. The macular pigment, composed by two dihydroxycarotenoids (lutein and zeaxanthin), is a natural barrier that protects the macula from OS. Advanced glycation end-products (AGEs) and carboxyethylpyrrole adducts produced by fatty acids oxidation in the photoreceptor tips have been detected in drusen isolated from AMD samples [79].

Usually, RPE damage is observed in early stages of AMD although there is not a direct link between the extent of damage in the RPE caused by OS and AMD progression [80]. RPE-damaged cells release cytokines and chemokines that recruit and activate choroid dendritic cells, which amplify the inflammatory process due to cell-cell contact, overall triggering a chronic inflammation that has been reported to play a key role in the AMD pathogenicity [81]. Indeed, genetic risk variants may exacerbate the inflammatory response due to OS in the retina, and several polymorphic variants in genes encoding

or regulating key complement proteins have been associated to AMD [82]. The major genetic risk factor to develop AMD is the Y402H polymorphism of complement factor H (CFH), which reduces CFH's ability to neutralize the effect of oxidized photoreceptor phospholipids from photoreceptors, which are incorporated into the RPE membrane and trigger RPE cell apoptosis [83,84]. However, other genetic and external stimuli must contribute to the initiation of the complement cascade and inflammatory response. For instance, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in complement factor genes (including *CFH*) account for ~46–71% of the genetic risk for developing AMD. Concerning external triggers, smoking—and consequently, oxidative stress—is the largest modifiable external risk factor for AMD. Genotype and smoking have been independently related to AMD with synergic effects [85]. Recently, TLR2 has been also reported as a mediator between oxidative stress damage in the RPE and the development of complement-mediated retinal pathology in AMD and other retinal neurodegeneration pathologies, so that TLR2 blockade protects photoreceptors and RPE from oxidative stress-induced cell death [86].

On the other hand, autophagy is a protective homeostatic mechanism designed to remove cellular components including those damaged by oxidative damage. Compromised autophagy contributes in AMD as a result of the RPE dysfunction [87]. Additionally, RPE has antioxidant systems that protect cells against oxidative damage. Several studies identified the NRF2 axis as an essential signaling system in the RPE. In addition to its antioxidant protection, the NRF2-signaling pathway is involved in maintaining mitochondria metabolism by controlling the expression of several Krebs cycle enzymes, which increases glucose flux to generate NADH, an essential substrate for electron transport chain complex I to promote ATP production [88,89]. Chronic cigarette smoking impairs NRF2 signaling in the RPE, which is associated with RPE degeneration, but not AMD progression [90–92]. In addition to behavioral factors such as cigarette smoking and high fat diet ingestion, photo-oxidative stress and increased phagocytosis of photoreceptor outer segments most probably induce further dysfunction of the RPE and increase photoreceptor cell death during advanced stages of dry non-neovascular AMD [93].

9.3. Oxidative Stress and Diabetic Retinopathy (DR)

DR is one of the most common Diabetes *mellitus* complications. Molecular mechanisms of high glucose levels causing blindness are yet to be completely determined, although chronic hyperglycemia lead to several biochemical changes, among them, the activation of protein kinase C, polyols accumulation through aldose reductase pathway, AGEs production increment and free radical overproduction. These free radicals are generated from glucose auto-oxidation reactions and glycated adducts of proteins. These metabolic changes increase the levels of pro-inflammatory cytokines, chemokines and other mediators of the inflammatory response stimulating an influx of leucocytes and altering vascular permeability, which altogether favors the degeneration of the retina [21,26,61,94].

10. Oxidative Stress, Genetics, and Inherited Rare Diseases of the Retina

10.1. Oxidative Stress and Retinitis Pigmentosa (RP)

RP, caused by mutations in many different genes, is the most prevalent among rare inherited retinal disorders (IRDs) (prevalence of 1:4000). The main phenotypic feature of RP is the progressive loss of rods followed by the death of cones. During the last years, OS has been shown to play a relevant role in RP pathogenesis and disease progression. Depending on the RP causative gene, antioxidant treatments might preserve cone function and prolong rod survival. Several studies show that both endogenous OS produced during retinal metabolism, such as lipid peroxidation or DNA damage, and exogenous OS, such as those produced by sunlight exposition, contribute to photoreceptor cell death. Moreover, rod photoreceptor death cause that higher levels of oxygen permeate into the tissue, thus increasing ROS production and inducing cell oxidative damage into the surviving cells (mostly cones), which will eventually result in cone death [17,95,96]. Since the retina is a highly-metabolic demanding tissue,

retinal cells have developed protective mechanisms against damaging agents, among them, autophagy activation. In retinal ganglion cells (RGCs), autophagy exerts a clear cytoprotective role by minimizing ROS levels and sustaining mitochondrial function [57,97].

Indeed, some RP-causative mutations cause misfolding of highly expressed transmembrane proteins that are involved in photoreception or phototransduction (such as rhodopsin, phosphodiesterase 6 subunits, or arrestin). The accumulation of unfolded or misfolded proteins cause UPR and an increase in oxidative stress in the ER, and elicits a compensative transcriptional program, for instance through PERK and IRE1 pathways, to activate genes encoding antioxidant enzymes. Chronic IRE1 activation causes an increase or mitochondrial ROS in degenerating retinas [98].

Some studies suggest that autophagy could have beneficial effects in RP while others indicate it could negatively affect photoreceptor death. This apparent contradiction may be reconciled if we consider that: (i) RP is a highly heterogeneous genetic disease, with many different genes and mutations associated to this disorder, therefore the importance of autophagy in retinal cells might be different depending on the mutation; (ii) autophagy may play different roles in the death of rods and cones; and finally (iii) moderate levels of autophagy in the photoreceptors may be beneficial whereas excessive autophagy may be deleterious [35]. Again, a delicate balance between autophagy promotion or reduction depending on the cell requirements, the intensity and time duration of the stress stimulus may be the clue to understand the relevance of this pathway in retinal homeostasis, particularly when retinal cells are already under distress by genetic mutations.

To keep oxidation within controllable levels, cells have to activate and deploy endogenous antioxidant defenses. Inactivating mutations or expression deficiency of genes encoding antioxidant enzymes may lead to a faster progression of the disease. Glyoxalase 1 (GLO 1) is a ubiquitous cellular enzyme involved in detoxification of methylglyoxal (MGO), a cytotoxic byproduct of glycolysis. MGO excess can cause oxidative stress through the inactivation of antioxidant detoxification enzymes such as glutathione peroxidase and SOD. Hypomorphic genetic variants associated to diminished *GLO1* expression have been identified in a Sicilian population. As a result, retinal cells are more sensitive to oxidative stress-damage and eventually die by apoptosis, thus leading to retinal degeneration [99].

In fact, mutations in many different genes involved in a large variety of functions cause mendelian inherited retinal dystrophies (IRDs). Among all the IRD causative genes, only *CERKL* has been implicated as a resilience gene against oxidative stress [100]. The precise function of *CERKL* is yet to be determined but several studies show that it is involved in the cellular response to oxidative stress and may play a role in protecting cells against stress injury [101,102]. Besides, *CERKL* shows a highly dynamic subcellular localization, as it can shuttle from nucleus to cytoplasm, it is also associated to the Golgi and Trans-Golgi vesicles, endoplasmic reticulum, and mitochondria membranes [100–102]. *CERKL* is not only expressed in the retina but also in several adult and fetal tissues in human and mouse. In humans, the highest expression of *CERKL* is detected in the retina, some brain regions, lung, and kidney [103], while in adult mice, the highest levels of expression can be detected in the retina, liver, and testis [104]. Mutations in *CERKL* have been reported to cause RP and cone-rod dystrophy (CRD), thus providing further support to the concept that failure in the endogenous resilience mechanisms to overcome oxidative stress (for instance, by gene mutations) leads to an accelerated progression of retinal neurodegeneration.

The high genetic heterogeneity of RP not only lies on gene mutation but most probably on gene regulation and ability of photoreceptors and RPE to respond to external toxic stimuli and metabolic challenges as well. In this respect, miRNAs and lncRNAs may regulate relevant IRD-causative genes in response to oxidative stress injuries, as reported for miRNAs (hsa-miR-1307, hsa-miR-3064, hsa-miR-4709, hsa-miR-3615 and hsa-miR-637), in RPE cells challenged with oxidizing compounds. At least, five RP causative genes (*KLHL7*, *RDH11*, *CERKL*, *AIPL1*, and *USH1G*) emerged as validated targets, thus suggesting a tight connection between induced oxidative stress and RP onset and progression [66].

10.2. Oxidative Stress and Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON)

LHON is a clear example of retinopathy associated to oxidative stress. This rare disease is characterized by the degeneration of RGCs due to mutations in the mitochondrial genes encoding for the NADH dehydrogenase, an enzyme from the oxidative phosphorylation chain of the mitochondria. Mutations in the genes *MT-ND1*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, and *MT-ND6* cause a decrease in ATP synthesis and a high increase of intracellular ROS levels. The mitochondrial electron transport disruption leads to an increment of ROS, thus interfering with glutamate transport and triggering apoptosis of the RGCs [74,105].

11. Potential Therapies for Retinal Diseases in front of Oxidative Stress

ROS underlie the pathophysiology of diverse neurodegenerative diseases. In the retina, the source and impact of ROS are different depending on the pathology. Finding new therapies to avoid damaging ROS formation will be a step forward on preventing or slowing down the progression of these highly incapacitating blinding diseases, whether prevalent or rare. The strategies could be either to enhance the production of antioxidant enzymes, to reduce ROS, or to promote cytoprotective signaling pathways.

As a complementary therapy, nutritional changes and diet supplementation with antioxidant properties could have protective effects on ROS produced in the progression of some retinal diseases, depending on the altered signaling pathway [94]. A list of reported treatments can be found in Table 1.

Table 1. Dietary supplementation with antioxidant compounds in retinal dystrophies.

Agent	Function	Retinal Dystrophy
Xanthophylls	Useful in protecting the retina from OS and ameliorating oxidative stress states	DR, AMD and RP [106–109]
Zinc and Manganese	Zinc supplements exhibit antioxidant and anti-inflammatory activities, delaying oxidative processes in the long term, and manganese is a cofactor of many antioxidant agents as SODs.	DR and AMD (https://clinicaltrials.gov/) [110–112]
Alpha-lipoic acid	Essential for mitochondrial function and also induces NRF2 binding to antioxidant response elements. which is important to slow down	DR, glaucoma, AMD, RP [113–115]
Curcumin	Increases the transcription of antioxidant enzymes and induces the activation of NRF2 helping to decrease oxidative stress in the retina.	Glaucoma, DR and AMD [116,117]
Ubiquinone or coenzyme Q10	Inhibits the formation of free radicals reducing the effects of oxidative stress. Moreover, it activates eNOS and mitochondrial OXPPOS decreasing blood pressure.	AMD, RP, DR and glaucoma [118]
Omega 3	Deficient consumption of omega-3 contributes to the degeneration of the retina. Additionally, PREDIMED (Prevention with Mediterranean Diet) is a clinical trial that followed for 6 years individuals with diabetes mellitus type 2. Patients whose diet included omega-3 polyunsaturated fatty acids, showed a 48% decreased incidence in DR.	Glaucoma, RP and DR [119–122]
Spermidine	Acts as a ROS scavenger by sequestering singlet oxygen and reactive species and reduced RGC death.	Glaucoma [123]
Lycopene	Decreases NF-κB activation and ROS production in RPE cells, while increasing Nrf2 and GSH levels.	AMD [124]
Resveratrol	Shows antiproliferative, antiangiogenic, antioxidant, endothelial, anti-inflammatory, antiplatelet, and neurogenic activity.	Glaucoma, cataract, AMD and DR [125]

Another therapeutic approach is targeting ROS, directly or indirectly, with small molecules or drugs [18], as summarized in Table 2.

Table 2. Drugs and compounds that reduce reactive oxygen species (ROS) production in retinal cells.

Agent	Function	Retinal Dystrophy
Selective siRNAs (SYL040012)	Target specific β -receptors and have been demonstrated to decrease by 50% intraocular pressure 4 days after ocular administration, thus concomitantly reducing oxidative stress in RGCs.	Glaucoma [126]
17 β -estradiol	Inhibits ROS production, preserves ATP production and mitochondrial membrane potential, and decreases cellular and mitochondrial calcium loading. Moreover, estrogen's neuroprotective effects have been tested in RGCs in an in vivo model of glaucoma	Glaucoma [127,128]
Celastrol	Intravitreal injection reduces IOP protecting RGC from death by activating the cellular antioxidant defense system, attenuating of microglial activation, inhibiting of tumor necrosis factor (TNF)-alpha, and nitric oxide synthase production.	Glaucoma [129]
SERPINA3K	Intravitreal injection of this serine protease inhibitor demonstrated to block the expression of VEGF and TNF- α . Moreover, it suppresses ROS production and upregulate manganese superoxide dismutase and glutathione levels.	DR [130]
PHA666859	Blocks the p38 MAPK pathway, which plays a role in inflammatory processes.	DR [131]
E3330	Exhibits RPE-protective effects downregulating intracellular ROS by attenuating the levels of NF- κ B as well as the secretion of monocyte chemoattractant protein-1.	AMD [132]
BSIH	Iron favors ROS formation in the retina, for this reason, BSIH which is a protochelator is a potential therapeutic molecule. BSIH involves iron sequestration that occurs only when the cells are stressed by hydrogen peroxide.	AMD [133]
NAC (N-acetyl-L-cysteine)	Inhibits focal adhesion kinase, a kinase whose phosphorylation, induced by ROS, cause apoptosis.	DR [134,135]
Ranibizumab and aflibercept	Present a therapeutic effect against acrolein-induced oxidative cytotoxicity in human ARPE-19 cells via an increase in mitochondrial bioenergetics.	AMD [136]
AAV-SOD2	gene therapy by overexpression of SOD2 introduced by adeno-associated viruses (AAV-SOD2) is able to attenuate oxidative stress and improve mitochondrial dysfunction of RGC and optic nerve secondary to glaucoma.	Glaucoma [137]
Retinoids	Systemically administration reduces retinal OS and correct rod dysfunction.	DR [138]

Finally, other treatments for retinal dystrophies are based on promoting cytoprotective pathways. As aforementioned, RP is a mendelian rare disease caused by mutation in many genes but increasing evidence in patients and animal models suggests that oxidative stress and inflammation contribute to its pathogenesis irrespective of the causative gene. In fact, sustained chronic inflammation including elevated TNF α and other interleukines have been reported in the aqueous humor of patients and in mouse animal models of RP, as well as in AMD, glaucoma, and DR [139,140]. Inhibition of inflammatory pathways by TNF α -blockade using anti-TNF antibodies (Infliximab) was explored as a potential avenue of treatment on porcine retinal explants. A clear neuroprotective effect of TNF α blockers, with a reduction of oxidative stress markers and a decrease of both reactive gliosis and apoptosis, was observed in retinal organotypic cultures.

Other authors have resorted to TLR2 blockade. TLR2 induces complement factors in both retinal pigment epithelial (RPE) cells and mononuclear phagocytes. Neutralization of TLR2 reduces complement deposition, microglial activation, and protects photoreceptor neurons from oxidative stress-induced degeneration. TLR2 deficiency also promotes RPE resilience [86].

On the other hand, modulation of other cell cytoprotective mechanisms, such as autophagy, including specific organelle-phagy [57] and mitochondrial dynamics [53], or the regulation of SG generation in the retina [141], may provide potential cytoprotective strategies for IRD treatment.

The most interesting conclusions of this type of work is that therapeutic strategies to reduce oxidative stress and inflammation (by targeting TNF α , TLR2, or other signaling cell pathways) are promising approaches, which should be concurrently explored as amelioration treatments of symptoms for a wide cohort of patients in addition to gene therapy, which is currently based on the correction of genetic defects caused by mutations and is thus restricted to a handful of patients.

12. Conclusions

Oxidative stress by exogenous or endogenous agents damage the retina and the RPE, triggering apoptosis of photoreceptors and retinal ganglion cells. In prevalent diseases, such as AMD, glaucoma, and diabetic retinopathy, oxidative stress is a trigger of the pathologies, worsening the physiology of retinal cells and accelerating the progression of the disease. In rare genetic disorders, mutations in several causative genes cause metabolic distress and decrease cell resilience to oxidative stress, adding to the progressive attrition of photoreceptors and RGCs, eventually leading to blindness. We hypothesize that other IRD causative genes related to oxidative stress sensing and oxidative stress management, such as genes implicated in the control of autophagy, stress granule formation, or mitochondrial dynamics, will be identified in the near future, widening the landscape of genes and mutations that cause visual disorders. In addition to the more conventional gene therapy tailored to treat specific genetic defects, treatments addressed to increase cytoprotective signaling pathways in front of oxidative stress and to promote retinal cell resilience will provide new avenues to halt the progression of these blinding diseases and restore retinal homeostasis.

Author Contributions: E.B.D. investigation and writing. G.M. writing, editing and funding. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by grants SAF2016-80937-R (Ministerio de Economía y Competitividad/FEDER) and 2017 SGR 738 (Generalitat de Catalunya) to G.M. E.B.D. is a fellow of the FI-2017 (Generalitat de Catalunya).

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

References

1. Fulda, S.; Gorman, A.M.; Hori, O.; Samali, A. Cellular stress responses: Cell survival and cell death. *Int. J. Cell Biol.* **2010**, *2010*, 214074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Ivano, A.; Andrews, D.W.; et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 486–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Tang, D.; Kang, R.; Berghe, T.V.; Vandenabeele, P.; Kroemer, G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.* **2019**, *29*, 347–364. [[CrossRef](#)]
4. Sies, H.; Jones, D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2020**, in press. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Genestra, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell. Signal.* **2007**, *19*, 1807–1819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Brüne, B. The intimate relation between nitric oxide and superoxide in apoptosis and cell survival. *Antioxid. Redox Signal.* **2005**, *7*, 497–507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Trachootham, D.; Lu, W.; Ogasawara, M.A.; Rivera-Del Valle, N.; Huang, P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, *10*, 1343–1374. [[CrossRef](#)]
8. Benhar, M. Oxidants, antioxidants and thiol redox switches in the control of regulated cell death pathways. *Antioxidants* **2020**, *9*, 309. [[CrossRef](#)]
9. Jensen, S.J.K. Oxidative stress and free radicals. *J. Mol. Struct.* **2003**, *666–667*, 387–392. [[CrossRef](#)]

10. Finkel, T.; Holbrook, N.J. Oxidants, oxidative stress and biology of ageing. *Nature* **2000**, *408*, 239–247. [[CrossRef](#)]
11. Chua, S.Y.L.; Khawaja, A.P.; Morgan, J.; Strouthidis, N.; Reisman, C.; Dick, A.D.; Khaw, P.T.; Patel, P.J.; Foster, P.J.; for the UK Biobank Eye and Vision Consortium. The relationship between ambient atmospheric fine particulate matter (PM_{2.5}) and glaucoma in a large community cohort. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2019**, *60*, 4915–4923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Pons, M.; Marín-Castaño, M.E. Nicotine increases the VEGF/PEDF ratio in retinal pigment epithelium: A possible mechanism for CNV in passive smokers with AMD. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 3842–3853. [[CrossRef](#)]
13. Wills, N.K.; Sadagopa Ramanujam, V.M.; Chang, J.; Kalariya, N.; Lewis, J.R.; Weng, T.-X.; van Kuijk, F.J.G.M. Cadmium accumulation in the human retina: Effects of age, gender, and cellular toxicity. *Exp. Eye Res.* **2008**, *86*, 41–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bertram, K.M.; Baglole, C.J.; Phipps, R.P.; Libby, R.T. Molecular regulation of cigarette smoke induced-oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells: Implications for age-related macular degeneration. *Am. J. Physiol.* **2009**, *297*, 1200–1210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Baksheeva, V.E.; Tiulina, V.V.; Tikhomirova, N.K.; Gancharova, O.S.; Komarov, S.V.; Philippov, P.P.; Zamyatnin, A.A., Jr.; Senin, I.I.; Zernii, E.Y. Suppression of light-induced oxidative stress in the retina by mitochondria-targeted antioxidant. *Antioxidants* **2018**, *8*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. George, A.K.; Singh, M.; Petit Homme, R.; Majumder, A.; Sandhu, H.S.; Tyagi, S.C. A hypothesis for treating inflammation and oxidative stress with hydrogen sulfide during age-related macular degeneration. *Int. J. Ophthalmol.* **2018**, *11*, 881–887. [[CrossRef](#)]
17. Samardzija, M.; Todorova, V.; Gougoulakis, L.; Barben, M.; Nötzli, S.; Klee, K.; Storti, F.; Gubler, A.; Imsand, C.; Grimm, C. Light stress affects cones and horizontal cells via rhodopsin-mediated mechanisms. *Exp. Eye Res.* **2019**, *186*, 107719. [[CrossRef](#)]
18. Rohowetz, L.J.; Kraus, J.G.; Koulen, P. Reactive oxygen species-mediated damage of retinal neurons: Drug development targets for therapies of chronic neurodegeneration of the retina. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3362. [[CrossRef](#)]
19. Olchawa, M.M.; Hermreiter, A.M.; Skumatz, C.M.B.; Zareba, M.; Sarna, T.S.; Burke, J.M. Photosensitized oxidative stress to ARPE-19 cells decreases protein receptors that mediate photoreceptor outer segment phagocytosis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**, *54*, 2276–2287. [[CrossRef](#)]
20. Akhtar-Schäfer, I.; Wang, L.; Krohne, T.U.; Xu, H.; Langmann, T. Modulation of three key innate immune pathways for the most common retinal degenerative diseases. *EMBO Mol. Med.* **2018**, *10*, e8259. [[CrossRef](#)]
21. Detrick, B.; Hooks, J.J. The RPE cell and the immune system. In *Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease*; Klettner, A., Dithmar, S., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2020; pp. 101–114. [[CrossRef](#)]
22. Rashid, K.; Akhtar-Schäfer, I.; Langmann, T. Microglia in Retinal Degeneration. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Subirada, P.V.; Paz, M.C.; Ridano, M.E.; Lorenc, V.E.; Vaglienti, M.V.; Barcelona, P.F.; Luna, J.D.; Sánchez, M.C. A Journey Into the Retina: Müller Glia Commanding Survival and Death. *Eur. J. Neurosci.* **2018**, *47*, 1429–1443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zhang, S.X.; Sanders, E.; Fliesler, S.J.; Wang, J.J. Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Responses in Retinal Degeneration. *Exp. Eye Res.* **2014**, *125*, 30–40. [[CrossRef](#)]
25. Sano, R.; Reed, J.C. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2013**, *1833*, 3460–3470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Li, J.; Wang, J.J.; Yu, Q.; Wang, M.; Zhang, S.X. Endoplasmic reticulum stress is implicated in retinal inflammation and diabetic retinopathy. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 1521–1527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Zhong, Y.; Li, J.; Chen, Y.; Wang, J.J.; Ratan, R.; Zhang, S.X. Activation of Endoplasmic Reticulum Stress by Hyperglycemia Is Essential for Müller Cell-Derived Inflammatory Cytokine Production in Diabetes. *Diabetes* **2012**, *61*, 492–504. [[CrossRef](#)]
28. Chen, C.; Cano, M.; Wang, J.J.; Li, J.; Huang, C.; Yu, Q.; Herbert, T.P.; Handa, J.T.; Zhang, S.X. Role of Unfolded Protein Response Dysregulation in Oxidative Injury of Retinal Pigment Epithelial Cells. *Antioxid. Redox. Signal.* **2014**, *20*, 2091–2106. [[CrossRef](#)]
29. Huang, C.; Wang, J.; Zhang, S. Cigarette smoke and RPE injury: Role of oxidative stress and ER stress. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**, *54*, 3198.

30. Gorbatyuk, M.S.; Starra, C.R.; Gorbatyuk, O.S. Endoplasmic reticulum stress: New insights into the pathogenesis and treatment of retinal degenerative diseases. *Prog. Retin. Eye Res.* **2020**, in press. [[CrossRef](#)]
31. Augustine, G.J.; Chikaraishi, D.M.; Ehlers, M.D.; Einstein, G.; Fitzpatrick, D.; Hall, W.C.; Jarvis, E.; Katz, L.C.; Kauer, J.; LaMantia, A.S.; et al. *Sensation and Sensory Processing in Neuroscience*, 3rd ed.; Sinauer Associates: Sunderland, MA, USA, 2004.
32. Punzo, C.; Xiong, W.; Ceplo, C.L. Loss of daylight vision in retinal degeneration: Are oxidative stress and metabolic dysregulation to blame? *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 1642–1648. [[CrossRef](#)]
33. Wright, A.F.; Chakarova, C.F.; Abd El-Aziz, M.M.; Bhattacharya, S.S. Photoreceptor degeneration: Genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 273–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Strauss, O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* **2005**, *85*, 845–881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Moreno, M.L.; Mérida, S.; Bosch-Morell, F.; Miranda, M.; Villar, V.M. Autophagy dysfunction and oxidative stress, two related mechanisms implicated in retinitis pigmentosa. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 1–9. [[CrossRef](#)]
36. Pisoschi, A.M.; Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 55–74. [[CrossRef](#)]
37. Saccà, S.S.; Roszkowska, A.M.; Izzotti, A. Environmental light and endogenous antioxidants as the main determinants of non-cancer ocular diseases. *Mutat. Res.* **2013**, *752*, 153–171. [[CrossRef](#)]
38. Morgan, M.J.; Liu, Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res.* **2010**, *21*, 103–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Lingappan, K. NF- κ B in Oxidative stress. *Curr. Opin. Toxicol.* **2018**, *7*, 81–86. [[CrossRef](#)]
40. Wardyn, J.D.; Ponsford, A.H.; Sanderson, C.M. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43*, 621–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Anderson, P.; Kedersha, N. Stress granules. *Curr. Biol.* **2009**, *19*, R397–R398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Kedersha, N.; Chen, S.; Gilks, N.; Li, W.; Miller, I.J.; Stahl, J.; Anderson, P. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA^{Met})-deficient preinitiation complexes are core constituents. *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 195–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Courchaine, E.M.; Lu, A.; Neugebauer, K.M. Droplet organelles? *EMBO J.* **2016**, *35*, 1603–1612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Van Leeuwen, W.; Rabouille, C. Cellular stress leads to the formation of membraneless stress assemblies in eukaryotic cells. *Traffic* **2019**, *20*, 623–638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Namkoong, S.; Ho, A.; Woo, Y.M.; Kwak, H.; Lee, J.H. Systematic characterization of stress-induced RNA granulation. *Mol. Cell* **2018**, *70*, 175–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Conlon, E.G.; Manley, J.L. RNA-binding proteins in neurodegeneration: Mechanisms in aggregate. *Genes Dev.* **2017**, *31*, 1509–1528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kunchithapatham, K.; Rohrer, B. Apoptosis and autophagy in photoreceptors exposed to oxidative stress. *Autophagy* **2007**, *3*, 433–441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Chan, C.M.; Huang, D.Y.; Sekar, P.; Hsu, S.H.; Lin, W.W. Reactive oxygen species dependent mitochondrial dynamics and autophagy confer protective effects in retinal pigment epithelial cells against sodium iodate-induced cell death. *J. Biomed. Sci.* **2019**, *26*, 40. [[CrossRef](#)]
49. Kaarniranta, K.; Tokarz, P.; Koskela, A.; Paterno, J.; Blasiak, J. Autophagy regulates death of retinal pigment epithelium cells in age-related macular degeneration. *Cell Biol. Toxicol.* **2017**, *33*, 113–128. [[CrossRef](#)]
50. He, J.N.; Zhang, S.D.; Qu, Y.; Wang, H.L.; Tham, C.C.; Pang, C.P.; Chu, W.K. Rapamycin removes damaged mitochondria and protects human trabecular meshwork (TM-1) cells from chronic oxidative stress. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 6586–6593. [[CrossRef](#)]
51. Yang, X.; Pan, X.; Zhao, X.; Luo, J.; Xu, M.; Bai, D.; Hu, Y.; Liu, X.; Yu, Q.; Gao, D. Autophagy and age-related eye diseases. *Biomed. Res. Int.* **2019**, *2019*, 5763658. [[CrossRef](#)]
52. Adornetto, A.; Parisi, V.; Morrone, L.A.; Corasaniti, M.T.; Bagetta, G.; Tonin, P.; Russo, R. The role of autophagy in glaucomatous optic neuropathy. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *4*, 121. [[CrossRef](#)]
53. Mirra, S.; Marfany, G. Mitochondrial gymnastics in retinal cells: A resilience mechanism against oxidative stress and neurodegeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**, *1185*, 513–517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Lin, W.J.; Kuang, H.Y. Oxidative stress induces autophagy in response to multiple noxious stimuli in retinal ganglion cells. *Autophagy* **2014**, *10*, 1692–1701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

55. Chen, Y.; Sawada, O.; Kohno, H.; Le, Y.Z.; Subauste, C.; Maeda, T.; Maeda, A. Autophagy protects the retina from light-induced degeneration. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Kaarniranta, K.; Uusitalo, H.; Blasiak, J.; Felszeghy, S.; Kannan, R.; Kauppinen, A.; Salminen, A.; Sinha, D.; Ferrington, D. Mechanisms of mitochondrial dysfunction and their impact on age-related macular degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* **2020**, in press. [[CrossRef](#)]
57. Boya, P. Why autophagy is good for retinal ganglion cells? *Eye* **2017**, *31*, 185–190. [[CrossRef](#)]
58. Hass, D.T.; Barnstable, C.J. Mitochondrial uncoupling protein 2 knock-out promotes mitophagy to decrease retinal ganglion cell death in a mouse model of glaucoma. *J. Neurosci.* **2019**, *39*, 3582–3596. [[CrossRef](#)]
59. Marchi, S.; Patergnani, S.; Pinton, P. The endoplasmic reticulum–mitochondria connection: One touch, multiple functions. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2014**, *1837*, 461–469. [[CrossRef](#)]
60. Mitter, S.K.; Song, C.; Qi, X.; Mao, H.; Rao, H.; Akin, D.; Lewin, A.; Grant, M.; Dunn, W.; Ding, J.; et al. Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD. *Autophagy* **2014**, *10*, 1989–2005. [[CrossRef](#)]
61. Lopilly Park, H.Y.; Kim, J.H.; Park, C.K. Different contributions of autophagy to retinal ganglion cell death in the diabetic and glaucomatous retinas. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13321. [[CrossRef](#)]
62. Donato, L.; Scimone, C.; Rinaldi, C.; Aragona, P.; Briuglia, S.; D'Ascola, A.; D'Angelo, R.; Sidoti, A. Stargardt Phenotype associated with two ELOVL4 promoter variants and ELOVL4 downregulation: New possible perspective to etiopathogenesis? *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2018**, *59*, 843–857. [[CrossRef](#)]
63. Njie-Mbye, Y.F.; Kulkarni-Chitnis, M.; Opere, C.A.; Barrett, A.; Ohia, S.E. Lipid peroxidation: Pathophysiological and pharmacological implications in the eye. *Front. Physiol.* **2013**, *4*, 366. [[CrossRef](#)]
64. Shibuki, H.; Katai, N.; Yodoi, J.; Uchida, K.; Yoshimura, N. Lipid Peroxidation and peroxynitrite in retinal ischemia–reperfusion injury. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2000**, *41*, 3607–3614. [[PubMed](#)]
65. Moiseyev, G.; Nikolaeva, O.; Chen, Y.; Farjo, K.; Takahashi, Y.; Ma, J.X. Inhibition of the visual cycle by A2E through direct interaction with RPE65 and implications in Stargardt disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 17551–17556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Donato, L.; Bramanti, P.; Scimone, C.; Rinaldi, C.; Giorgianni, F.; Beranova-Giorgianni, S.; Koirala, D.; D'Angelo, R.; Sidoti, A. miRNAexpression profile of retinal pigment epithelial cells under oxidative stress conditions. *FEBS Open Bio.* **2018**, *8*, 219–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Donato, L.; D'Angelo, R.; Alibrandi, S.; Rinaldi, C.; Sidoti, A.; Scimone, C. Effects of A2E-induced oxidative stress on retinal epithelial cells: New insights on differential gene response and retinal dystrophies. *Antioxidants* **2020**, *9*, 307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Honda, S.; Hjelmeland, L.M.; Handa, J.T. Oxidative stress–induced single-strand breaks in chromosomal telomeres of human retinal pigment epithelial cells in vitro. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2001**, *42*, 2139–2144. [[PubMed](#)]
69. Cai, J.; Nelson, K.C.; Wu, M.; Sternberg, P.; Jones, D.P. Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog. Retin. Eye Res.* **2000**, *19*, 205–221. [[CrossRef](#)]
70. Cortina, S.; Gordon, W.C.; Luki, W.J.; Bazan, N.G. Oxidative stress-induced retinal damage up-regulates DNA polymerase gamma and 8-oxoguanine-DNA-glycosylase in photoreceptor synaptic mitochondria. *Exp. Eye Res.* **2005**, *81*, 742–750. [[CrossRef](#)]
71. Kaarniranta, K.; Kajdaneck, J.; Morawiec, J.; Pawlowska, E.; Blasiak, J. PGC-1 α protects RPE cells of the aging retina against oxidative stress-induced degeneration through the regulation of senescence and mitochondrial quality control. the significance for AMD pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2317. [[CrossRef](#)]
72. Nagar, S.; Noveral, S.M.; Trudler, D.; Lopez, K.M.; McKercher, S.R.; Han, X.; Yates, J.R.; Pina-Crespo, J.C.; Nakanishi, N.; Satoh, T.; et al. MEF2D haploinsufficiency downregulates the NRF2 pathway and renders photoreceptors susceptible to light-induced oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E4048–E4056. [[CrossRef](#)]
73. Tsuruma, K.; Nishimura, Y.; Kishi, S.; Shimazawa, M.; Tanaka, T.; Hara, H. SEMA4A mutations lead to susceptibility to light irradiation, oxidative stress, and ER stress in retinal pigment epithelial cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2012**, *53*, 6729–6737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Schmidl, D.; Garhofer, G.; Schmetterer, L. The complex interaction between ocular perfusion pressure and ocular blood flow—Relevance for glaucoma. *Exp. Eye Res.* **2011**, *93*, 141–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Vittitow, J.L.; Borrás, T. Expression of optineurin, a glaucoma-linked gene, is influenced by elevated intraocular pressure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *298*, 67–74. [[CrossRef](#)]

76. Weinreb, R.N.; Aung, T.; Medeiros, F.A. The pathophysiology and treatment of glaucoma. *JAMA* **2014**, *311*, 1901–1911. [[CrossRef](#)]
77. Kroeber, M.; Ohlmann, A.; Russell, P.; Tamm, E.R. Transgenic studies on the role of optineurin in the mouse eye. *Exp. Eye Res.* **2006**, *82*, 1075–1085. [[CrossRef](#)]
78. De Marco, N.; Buono, M.; Troise, F.; Diez-Roux, G. Optineurin increases cell survival and translocates to the nucleus in a Rab8-dependent manner upon an apoptotic stimulus. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 16147–16156. [[CrossRef](#)]
79. Bellezza, I. Oxidative stress in age-related macular degeneration: NRF2 as therapeutic target. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1–7. [[CrossRef](#)]
80. Kaarniranta, K.; Pawlowska, E.; Szczepanska, J.; Jablkowska, A.; Blasiak, J. Role of mitochondrial DNA damage in ROS-mediated pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2374. [[CrossRef](#)]
81. Kauppinen, A.; Paterno, J.J.; Blasiak, J.; Salminen, A.; Kaarniranta, K. Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cell. Mol. Life. Sci.* **2016**, *73*, 1765–1786. [[CrossRef](#)]
82. Sitnilska, V.; Kersten, E.; Altay, L.; Schick, T.; Enders, P.; de Jong, E.K.; Langmann, Y.; Hoyng, C.B.; den Hollander, A.I.; Fauser, S. Major predictive factors for progression of early to late age-related macular degeneration. *Ophthalmologica* **2020**, in press. [[CrossRef](#)]
83. Weismann, D.; Hartvigsen, K.; Lauer, N.; Bennett, K.L.; Scholl, H.P.N.; Issa, P.C.; Cano, M.; Brandstätter, H.; Tsimikas, S.; Skerka, C.; et al. Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. *Nature* **2011**, *478*, 76–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Borrás, C.; Canonica, J.; Jorieux, S.; Abache, T.; El Sanharawi, M.; Klein, C.; Delaunay, K.; Jonet, L.; Salvodelli, M.; Naud, M.C.; et al. CFH exerts anti-oxidant effects on retinal pigment epithelial cells independently from protecting against membrane attack complex. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13873. [[CrossRef](#)]
85. Sobrin, L.; Seddon, J.M. Nature and nurture- genes and environment- predict onset and progression of macular degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* **2014**, *40*, 1–15. [[CrossRef](#)]
86. Mulfaul, K.; Ozaki, E.; Fernando, N.; Brennan, K.; Chirco, K.R.; Connolly, E.; Greene, C.; Maminishkis, A.; Salomon, R.G.; Linetsky, M.; et al. Toll-like receptor 2 facilitates oxidative damage-induced retinal degeneration. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 2209–2224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Yao, J.; Jia, L.; Khan, N.; Lin, C.; Mitter, S.K.; Boulton, M.E.; Dunaief, J.L.; Klionsky, D.J.; Guan, J.L.; Thompson, D.A.; et al. Deletion of autophagy inducer RB1CC1 results in degeneration of the retinal pigment epithelium. *Autophagy* **2015**, *11*, 939–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Dinkova-Kostova, A.T.; Baird, L.; Holmström, K.M.; Meyer, C.J.; Abramov, A.Y. The spatiotemporal regulation of the Keap1-Nrf2 pathway and its importance in cellular bioenergetics. *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43*, 602–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Singh, A.; Happel, C.; Manna, S.K.; Acquah-Mensah, G.; Carrerero, J.; Kumar, S.; Nasipuri, O.; Krausz, K.W.; Wakabayashi, N.; Dewi, R.; et al. Transcription factor NRF2 regulates miR-1 and miR-206 to drive tumorigenesis. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 2921–2934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Cano, M.; Thimmalappula, R.; Fujihara, M.; Nagai, N.; Sporn, M.; Wang, A.L.; Neufeld, A.H.; Biswal, S.; Handa, J.T. Cigarette smoking, oxidative stress, the anti-oxidant response through Nrf2 signaling, and age-related macular degeneration. *Vis. Res.* **2010**, *50*, 652–664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Zhao, Z.; Chen, Y.; Wang, J.; Sternberg, P.; Freeman, M.L.; Grossniklaus, H.E.; Cai, J. Age-related retinopathy in NRF2-deficient mice. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e19456. [[CrossRef](#)]
92. Fujihara, M.; Nagai, N.; Sussan, T.E.; Biswal, S.; Handa, J.T. Chronic cigarette smoke causes oxidative damage and apoptosis to retinal pigmented epithelial cells in mice. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3119. [[CrossRef](#)]
93. Datta, S.; Cano, M.; Ebrahimi, K.; Wang, L.; Handa, J.T. The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Prog. Retin. Eye Res.* **2017**, *60*, 201–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Olvera-Montaño, C.; Castellanos-González, J.A.; Navarro-Partida, J.; Cardona-Muñoz, E.G.; López-Contreras, A.K.; Roman-Pintos, L.M.; Robles-Rivera, R.R.; Rodríguez-Carrizalez, A.D. Oxidative stress as the main target in diabetic retinopathy pathophysiology. *J. Diabetes Res.* **2019**. [[CrossRef](#)]
95. Campochiaro, P.A.; Strauss, R.W.; Lu, L.; Hafiz, G.; Wolfson, Y.; Shah, S.M.; Sophie, R.; Mir, T.A.; Scholl, H.P. Is there excess oxidative stress and damage in eyes of patients with Retinitis Pigmentosa? *Antioxid. Redox Signal.* **2015**, *23*, 643–648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

96. Trachsel-Moncho, L.; Benlloch-Navarro, S.; Fernández-Carbonell, A.; Ramírez-Lamelas, D.T.; Olivar, T.; Silvestre, D.; Poch, E.; Miranda, M. Oxidative stress and autophagy-related changes during retinal degeneration and development. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 812. [[CrossRef](#)]
97. Boya, P.; Esteban-Martínez, L.; Serrano-Puebla, A.; Gómez-Sintes, R.; Villarejo-Zori, B. Autophagy in the eye: Development, degeneration, and aging. *Prog. Retin. Eye Res.* **2016**, *55*, 206–245. [[CrossRef](#)]
98. Kroeger, H.; Chiang, W.C.; Felden, J.; Nguyen, A.; Lin, J.H. ER stress and unfolded protein response in ocular health and disease. *FEBS J.* **2019**, *286*, 399–412. [[CrossRef](#)]
99. Donato, L.; Scimone, C.; Nicocia, G.; Denaro, L.; Robledo, R.; Sidoti, A.; D’Angelo, R. GLO1 gene polymorphisms and their association with retinitis pigmentosa: A case–control study in a Sicilian population. *Mol. Biol. Rep.* **2018**, *45*, 1349–1355. [[CrossRef](#)]
100. Tuson, M.; Garanto, A.; González-Duarte, R.; Marfany, G. Overexpression of *CERKL*, a gene responsible for retinitis pigmentosa in humans, protects cells from apoptosis induced by oxidative stress. *Mol. Vis.* **2009**, *15*, 168–180.
101. Fathinajafabadi, A.; Pérez-Jiménez, E.; Riera, M.; Knecht, E.; González-Duarte, R. *CERKL*, a retinal disease gene, encodes an mRNA-binding protein that localizes in compact and untranslated mRNPs associated with microtubules. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87898. [[CrossRef](#)]
102. Li, C.; Wang, L.; Zhang, J.; Huang, M.; Wong, F.; Liu, X.; Liu, F.; Cui, X.; Yang, G.; Chen, J.; et al. *CERKL* interacts with mitochondrial TRX2 and protects retinal cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2014**, *1842*, 1121–1129. [[CrossRef](#)]
103. Tuson, M.; Marfany, G.; González-Duarte, R. Mutation of *CERKL*, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive Retinitis Pigmentosa (RP26). *Am. J. Hum. Genet.* **2004**, *74*, 128–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Garanto, A.; Riera, M.; Pomares, P.; Permanyer, J.; de Castro-Miró, M.; Sava, F.; Abril, J.F.; Marfany, G.; González-Duarte, R. High transcriptional complexity of the retinitis pigmentosa *CERKL* gene in human and mouse. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 5202–5214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Zhuo, Y.; Luo, H.; Zhang, K. Leber hereditary optic neuropathy and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 19882–19883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Neelam, K.; Goenadi, C.J.; Lun, K.; Yip, C.C.; Eong, K.-G.A. Putative protective role of lutein and zeaxanthin in diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.* **2017**, *101*, 551–558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Milani, A.; Basirnejad, M.; Shahbazi, S.; Bolhassani, A. Carotenoids: Biochemistry, pharmacology and treatment. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 1290–1324. [[CrossRef](#)]
108. Wu, J.; Cho, E.; Willett, W.C.; Sastry, S.M.; Schaumberg, D.A. Intakes of lutein, zeaxanthin, and other carotenoids and age-related macular degeneration during 2 decades of prospective follow-up. *JAMA Ophthalmol.* **2015**, *133*, 1415–1424. [[CrossRef](#)]
109. Zhao, Y.; Feng, K.; Liu, R.; Pan, J.; Zhang, L.; Lu, X. Vitamins and mineral supplements for retinitis pigmentosa. *J. Ophthalmol.* **2019**, *2019*. [[CrossRef](#)]
110. Jarosz, M.; Olbert, M.; Wyszogrodzka, G.; Młyniec, K.; Librowski, T. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- κ B signaling. *Inflammopharmacology* **2017**, *25*, 11–24. [[CrossRef](#)]
111. Aguirre, J.D.; Culotta, V.C. Battles with iron: Manganese in oxidative stress protection. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 13541–13548. [[CrossRef](#)]
112. Vishwanathan, R.; Chung, M.; Johnson, E.J. A systematic review on zinc for the prevention and treatment of age-related macular degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**, *54*, 3985–3998. [[CrossRef](#)]
113. Suh, J.H.; Shenvi, S.V.; Dixon, B.M.; Liu, H.; Jaiswal, A.K.; Liu, R.M.; Hagen, T.M. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipolic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 3381–3386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Hernández-Rabaza, V.; López-Pedrajas, R.; Almansa, I. Progesterone, lipoic acid, and sulforaphane as promising antioxidants for retinal diseases: A review. *Antioxidants* **2019**, *8*, 53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Inman, D.M.; Lambert, W.S.; Calkins, D.J.; Horner, P.J. α -Lipoic acid antioxidant treatment limits glaucoma-related retinal ganglion cell death and dysfunction. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e65389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Mandal, N.A.; Patlolla, J.M.R.; Zheng, L.; Agbaga, M.-P.; Tran, J.T.A.; Wicker, L.; Kasus-Jacobi, A.; Elliott, M.H.; Rao, C.V.; Anderson, R.E. Curcumin protects retinal cells from light-and oxidant stress-induced cell death. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46*, 672–679. [[CrossRef](#)]

137. Jiang, W.; Tang, L.; Zeng, J.; Chen, B. Adeno-associated virus mediated SOD gene therapy protects the retinal ganglion cells from chronic intraocular pressure elevation induced injury via attenuating oxidative stress and improving mitochondrial dysfunction in a rat model. *Am. J. Transl. Res.* **2016**, *8*, 799–810.
138. Berkowitz, B.A.; Kern, T.S.; Bissig, D.; Patel, P.; Bhatia, A.; Kefalov, V.J.; Roberts, R. Systemic retinaldehyde treatment corrects retinal oxidative stress, rod dysfunction, and impaired visual performance in diabetic mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2015**, *56*, 6294–6303. [[CrossRef](#)]
139. Martínez-Fernández de la Cámara, C.; Salom, D.; Sequedo, M.D.; Hervás, D.; Marín-Lambies, C.; Aller, E.; Jaijo, T.; Diaz-Llopis, M.; Millán, J.M.; Rodrigo, R. Altered antioxidant-oxidant status in the aqueous humor and peripheral blood of patients with retinitis pigmentosa. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74223. [[CrossRef](#)]
140. Martínez-Fernández de la Cámara, C.; Olivares-González, L.; Hervás, D.; Salom, D.; Millán, J.M.; Rodrigo, R. Infiximab reduces Zaprinas-induced retinal degeneration in cultures of porcine retina. *J. Neuroinflammation* **2014**, *11*, 172. [[CrossRef](#)]
141. Dash, S.; Siddam, A.D.; Barnum, C.E.; Janga, S.C.; Lachke, S.A. RNA-binding proteins in eye development and disease: Implication of conserved RNA granule components. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2016**, *7*, 527–557. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Annex Capítol 2

Implicació de CERKL en la resposta a l'estrès
oxidatiu

2.1 Dinàmica cel·lular de CERKL front a l'estrès oxidatiu *in vitro*

ANTECEDENTS

Com ja hem esmentat a la introducció d'aquest treball, estudis funcionals previs han demostrat que CERKL presenta una localització subcel·lular dinàmica. La proteïna presenta dos dominis de localització nuclear (NLS) i dos d'exportació (NES), pels quals pot translocar de nucli a citoplasma i viceversa. A més, es pot trobar també associat a vesícules de l'aparell de Golgi i Trans-Golgi, així com, a les membranes del reticle endoplasmàtic i mitocondris [40], [42]. Per aquest motiu, vam realitzar estudis *in vitro*, en cèl·lules en cultiu, per estudiar la dinàmica d'importació i exportació nuclear de CERKL front a un estímul d'estrès oxidatiu i determinar si aquest estímul tenia un efecte en la mobilitat subcel·lular de la proteïna.

RESULTATS

Dinàmica cel·lular de CERKL en resposta a l'estrès oxidatiu

Es va determinar la dinàmica de CERKL-GFP sota diferents condicions. En un primer assaig es va afegir arsenit sòdic, un agent que genera espècies reactives de l'oxigen i, per tant, provoca estrès oxidatiu. A més, en un segon assaig es va afegir Leptomicina B, que serveix per estudiar la translocació nucli/citoplasma de les proteïnes, ja que inhibeix l'exportació nuclear mediat per CRM1 i, llavors, les proteïnes que usen aquesta via s'acumulen al nucli. La Leptomicina B es va afegir 4h abans de fixar les cèl·lules i l'arsenit sòdic 45 minuts abans, un cop transcorregut aquest temps es va procedir a realitzar l'ICC. En tots els assajos es van deixar cèl·lules sense tractar com a control negatiu de l'experiment.

En condicions control, el 51% de CERKL es transloca al nucli (Figura 14A). En presència de Leptomicina B, l'import nuclear es veu incrementat fins un 59%

(Figura 14B). Quan s'afegeix arsenit sòdic per a provocar estrès oxidatiu, la localització nuclear de CERKL incrementa fins al 63% (Figura 14C) i, finalment, quan hi ha un estímul d'estrès oxidatiu (arsenit sòdic) i, a més, l'exportació nuclear es troba inhibida per l'efecte de la Leptomicina B, l'increment de localització nuclear de CERKL encara és més notable, arribant a ser del 69%. Totes les comparatives mostren significació estadística respecte a la situació control (Figura 14D).

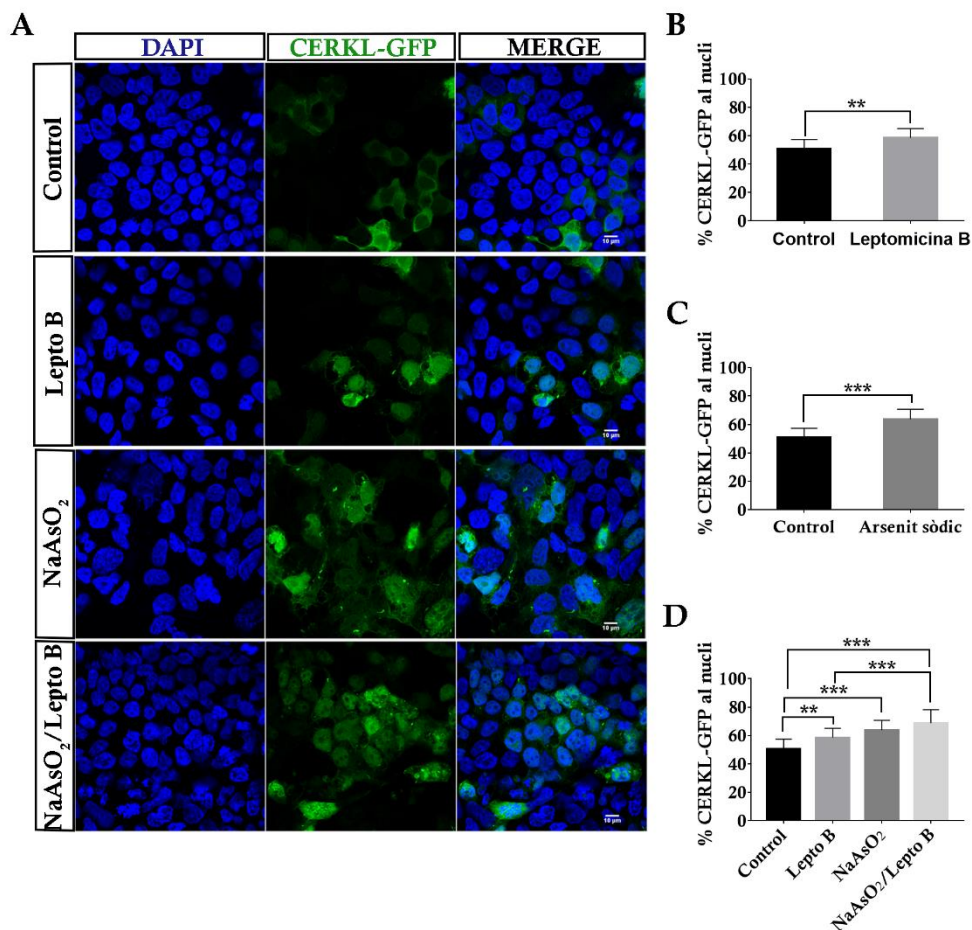


Figura 14. Increment de la localització de CERKL al nucli en resposta a condicions d'estrès oxidatiu i retenció nuclear. A) L'ICC mostra un increment de la importació nuclear de CERKL sota condicions d'estrès oxidatiu. B) Hi ha una retenció de CERKL-GFP al nucli després del tractament amb Leptomicina B (Lepto B). C) S'observa un increment notable de CERKL-GFP al nucli després de realitzar el tractament amb arsenit sòdic (NaAsO₂). D) Comparacions múltiples segons el tractament realitzat: control (cap tractament), Leptomicina B, arsenit sòdic i ambdós tractaments. El test estadístic utilitzat és una *two-way* ANOVA en tres experiments independents, amb més de 7 imatges per experiment i unes 50 cèl·lules per imatge. Els valors obtinguts segueixen una distribució normal. (**) p-valor < 0,01 i (***) p-valor < 0,001.

Anàlisi de potencials modificacions post-traduccionals de CERKL en resposta a l'estrès oxidatiu

Per analitzar si l'expressió i l'estabilitat general de la proteïna es veien afectades sota condicions d'estrès oxidatiu, es van transfectar cèl·lules HEK293 amb la construcció CERKL-GFP i es van tractar amb arsenit sòdic. Seguidament, van ser lisades i es va realitzar la immunodetecció per *western-blot*. El pes molecular de la proteïna de fusió esperat CERKL-GFP és de 81 kDa.

En el *western-blot* no s'observen diferències en el nivell d'expressió quan es comparen les cèl·lules tractades amb les control, ja que l'expressió en ambdós casos és bastant similar. A més, tampoc no s'observen modificacions post-traduccionals que provoquin un canvi de mobilitat de la proteïna (fosforilació, ubiquitinació sumoïlació...) en cap de les condicions (Figura 15). La conclusió seria que no s'observen diferències significatives ni en el nivell d'expressió de la proteïna CERKL, ni en possibles modificacions post-traduccionals com a resposta a estrès oxidatiu.

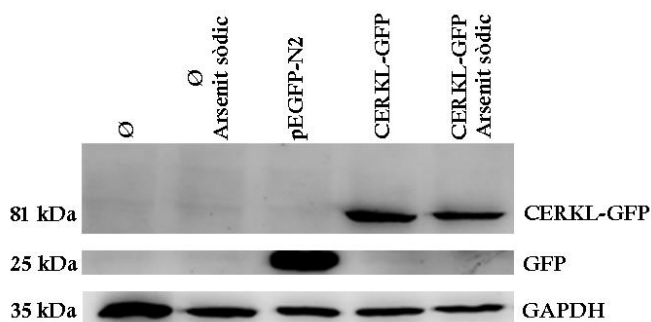


Figura 15. Anàlisi d'estabilitat i modificacions post-traduccionals de la proteïna CERKL en condicions d'estrès oxidatiu. La immunodetecció mostra uns nivells molt similars de la proteïna en condicions control i amb estrès oxidatiu. A més, tampoc no es detecten diferències en possibles modificacions post-traduccionals que indiquin diferències entre ambdues condicions.

2.2 Resposta de CERKL front a l'estrès oxidatiu *in vivo* a ratolí

ANTECEDENTS

En estudis anteriors *in vitro*, s'ha demostrat que CERKL interacciona amb proteïnes d'unió a l'mRNA, com ara PABP i eIF4E, clarament colocalitzant amb els grànuls d'estrès (SGs) quan les cèl·lules estan sotmeses a un estímul d'estrès [41]. A més, publicacions anteriors a aquest treball indicaren que CERKL contribueix a la resposta de protecció cel·lular, ja que la seva sobreexpressió protegeix a les cèl·lules de l'apoptosi induïda per l'estrès [40]. CERKL juga un paper anti-apoptòtic important donat que modula la via antioxidant de la peroxiredoxina mitocondrial [42]. Finalment, un estudi amb rates va mostrar que hi havia una alteració en la localització i expressió de CERKL als fotoreceptors com a conseqüència de l'estrès oxidatiu [267]. Totes aquestes evidències prèvies, juntament amb els nostres resultats de tràfic nucli-citoplasma amb estrès oxidatiu, ens varen suggerir d'analitzar la resposta de CERKL a la retina enfront l'estrès oxidatiu, emprant el model de ratolí *Cerkl^{KD/KO}* que hem generat i caracteritzat durant aquesta Tesi.

RESULTATS

Anàlisi de la resposta de CERKL a estrès oxidatiu en cultius primaris de cèl·lules ganglionars de la retina d'embrions E16

Inicialment vam realitzar un primer abordament amb animals silvestres per posar a punt la tècnica de cultiu de cèl·lules ganglionars. En aquest experiment vam seleccionar les cèl·lules ganglionars segons la morfologia diferenciada d'un axó extremadament llarg i un soma arrodonit ple de dendrites, a més vam realitzar un marcatge amb α THY-1 per confirmar que la morfologia corresponia a les cèl·lules ganglionars. Mentre posàvem a punt aquesta tècnica vam determinar l'edat òptima per a realitzar aquest tipus de cultiu, atès que la plasticitat neural es perd a mida que la retina passa a estadis més madurs. Vam realitzar cultius d'estadis a E16 (quan hi

ha el pic de maduració de les cèl·lules ganglionars), P0, P4 i P7 i els vam deixar diferenciar durant 7 dies *in vitro*. En els quatre casos vam aconseguir obtenir cèl·lules ganglionars vives en cultiu però vam determinar que els estadis E16 i P0 eren els més òptims per a realitzar aquesta tècnica, ja que la supervivència cel·lular era molt major. Finalment, vam determinar si existien diferències en el comportament de CERKL dins les cèl·lules ganglionars quan rebien un estímul d'estrès oxidatiu. A més, vam determinar que érem capaços de generar estrès a les cèl·lules ganglionars després d'incubar les cèl·lules amb 0,5 mM d'arsenit sòdic, ja que davant l'estímul es produïa un increment en la formació de grànuls d'estrès detectats amb PABP i, a més, trobàvem que CERKL també formava grànuls (Figura 16A). Si ens fixem amb detall, podem observar com davant l'estímul d'estrès hi ha un increment molt notable en la formació d'SGs (Figura 16B), així com també podem observar com CERKL passa d'estar localitzat de manera ubíqua per la cèl·lula a localitzar-se de forma molt concentrada amb els grànuls d'estrès.

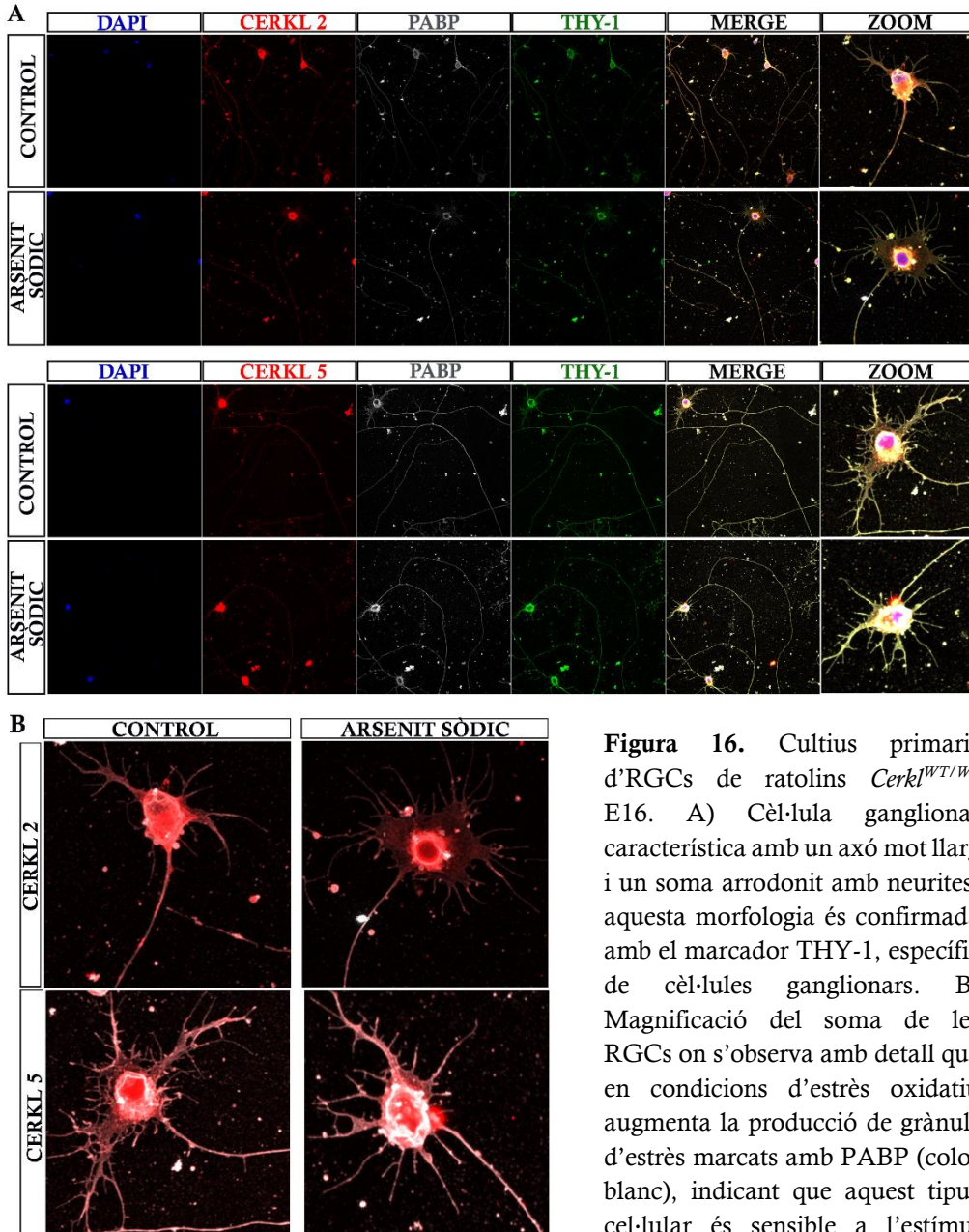


Figura 16. Cultius primaris d'RGCs de ratolins *Cerkl^{WT/WT}* E16. A) Cèl·lula ganglionar característica amb un axó molt llarg i un soma arrodonit amb neurites, aquesta morfologia és confirmada amb el marcador THY-1, específic de cèl·lules ganglionars. B) Magnificació del soma de les RGCs on s'observa amb detall que en condicions d'estress oxidatiu augmenta la producció de grànuls d'estress marcats amb PABP (color blanc), indicant que aquest tipus cel·lular és sensible a l'estímul aplicat. També observem que CERKL (en vermell) s'expressa en aquestes cèl·lules i a més respon a l'estímul d'estress localitzant-se de forma molt notable als SGs.

Per determinar amb més robustesa l'efecte de l'estrès oxidatiu sobre CERKL a la retina, vam realitzar cultius primaris de cèl·lules ganglionars (RGCs) de 3 embrions E16 *Cerkl*^{WT/WT} i *Cerkl*^{KD/KO}, ja que a aquesta edat hi ha el pic de desenvolupament d'aquest tipus cel·lular i, addicionalment, les neurones tenen la plasticitat suficient per ser cultivades *ex vivo*, pràctica que en teixit neuronal adult resulta extremadament difícil. Al cap de 7 dies de diferenciació *in vitro*, se'ls hi va afegir 0,5 mM d'arsenit sòdic per provocar estrès oxidatiu durant 45 minuts i, seguidament, es va fixar el cultiu per realitzar una ICC (Figura 17A). Les cèl·lules ganglionars de la retina de ratolí són un dels tipus cel·lulars que es veu més afectat per l'estrès (tant mecànic com oxidatiu) per darrera dels fotoreceptors, el que les fa bones candidates pel seu estudi. D'altra banda, sabem que l'afectació retinal més visible en el model *knockdown* de *Cerkl*^{KD/KD} són les alteracions electrofisiològiques en els potencials oscil·latoris (produïts per les cèl·lules ganglionars), per la qual cosa ja ens esperàvem que la seva resposta a l'estrès oxidatiu quan l'expressió de *Cerkl* està molt disminuïda segurament es veuria agreujada. Tot i que la resposta de les cèl·lules és global, hem centrat les quantificacions en els somes de les neurones, per facilitar-ne l'anàlisi.

Els grànuls d'estrès es van immunodetectar amb PABP, mentre que CERKL es va detectar utilitzant dos anticossos generats al laboratori (veure materials i mètodes de l'article presentat al Capítol 1). El propòsit d'utilitzar dos anticossos per detectar CERKL era per discernir si les diferents isoformes de CERKL responien diferentment a l'estrès oxidatiu. Els resultats obtinguts en els cultius primaris coincideixen totalment amb els observats tant en cèl·lules transfectades *in vitro*, com *in vivo* en retines (veure següent secció). S'observa un increment en la formació de grànuls d'estrès en la situació en la que les RGCs han estat sotmeses a estrès oxidatiu, essent aquest increment més notable en les RGCs dels mutants *Cerkl*^{KD/KO}. Caldria destacar que la formació d'SGs en la situació d'estrès de les retines *Cerkl*^{WT/WT} és molt semblant a la situació control sense estrès de les RGCs de

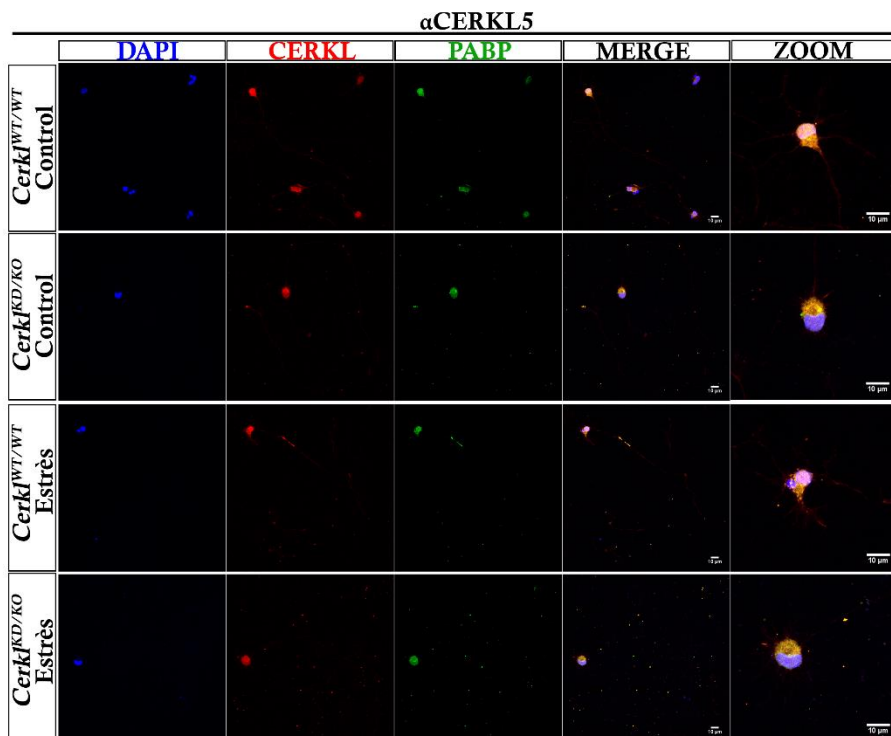
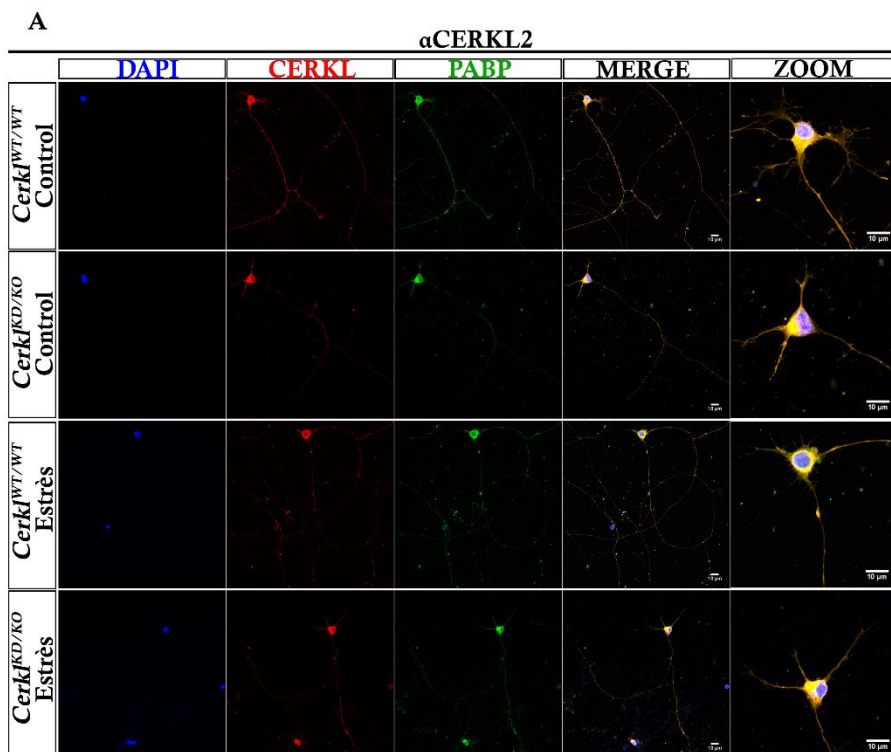
Cerkl^{KD/KO}, el que suggereix que en condicions basals les cèl·lules de les retines *Cerkl^{KD/KO}* ja es troben basalment en una situació d'estrès (Figura 17B).

La detecció amb l'anticòs α CERKL2 no mostra una davallada en la intensitat de CERKL en els individus *Cerkl^{KD/KO}*, aquest resultat pot estar emmascarat per l'efecte de l'estrès propi causat pel cultiu, ja que com veurem en el següent apartat, la intensitat de CERKL incrementa davant l'estímul d'estrès, per exemple, per activació de la transcripció. D'aquesta manera, si les isoformes detectades per aquest anticòs es troben en la primera línia de resposta davant l'estrès, tot i no afegir arsenit sòdic, com el cultiu *per se* ja implica cert estrès cel·lular, s'arriba a un *plateau* d'intensitat que no podem diferenciar (Figura 17C). D'altra banda, la detecció amb l'anticòs α CERKL5 mostra diferències d'intensitat de CERKL segons el genotip. En aquest cas, observem l'esperat decrement en la intensitat de CERKL en les RGCs provinents d'individus *Cerkl^{KD/KO}*. A més, en situació d'estrès, tant a *Cerkl^{WT/WT}* com *Cerkl^{KD/KO}*, s'incrementa notablement l'expressió d'aquestes isoformes (Figura 17G).

Pel que fa a la colocalització de CERKL amb PABP en els SGs, observem un increment d'aquesta colocalització amb els dos anticossos quan les RGCs es troben en condicions d'estrès, particularment en el cas de les RGCs de ratolins *Cerkl^{KD/KO}* (Figura 17D i 17H). Addicionalment, i en consonància amb els resultats del següent apartat, tenint en compte la intensitat total de CERKL, s'observa un increment de CERKL cap als SGs en les RGCs de ratolins *Cerkl^{KD/KO}*, essent aquest increment més exacerbat en situació d'estrès oxidatiu (Figura 17E i 17I).

Finalment, hem pogut determinar que les isoformes de CERKL detectades amb l'anticòs α CERKL2 es localitzen més al nucli en els individus *Cerkl^{KD/KO}* respecte els *Cerkl^{WT/WT}*. Els animals mutants ja presenten cert estrès basal, i en condicions d'estrès oxidatiu induït, aquest desplaçament cap al nucli és encara més notable (Figura 17F). Aquests resultats confirmen i complementen els resultats obtinguts de dinàmica cel·lular de CERKL en cèl·lules en cultiu. D'altra banda, pel que fa a les

isoformes detectades amb l'anticòs α CERKL5 observem una davallada en la intensitat de CERKL al nucli en les RGCs de *Cerkl*^{KD/KO} respecte els *Cerkl*^{WT/WT} (Figura 17J), el que clarament indica que les isoformes de CERKL detectades amb aquest anticòs no es comporten igual, ja que enlloc de translocar-se al nucli com les detectades amb α CERKL2, segurament es desplacen cap a un altre compartiment subcel·lular, com podrien ser els mitocondris. Altres membres del grup estan estudiant la possible associació d'isoformes de CERKL als mitocondris, i conjuntament abordarem aquest moviment subcel·lular diferencial entre isoformes de CERKL.



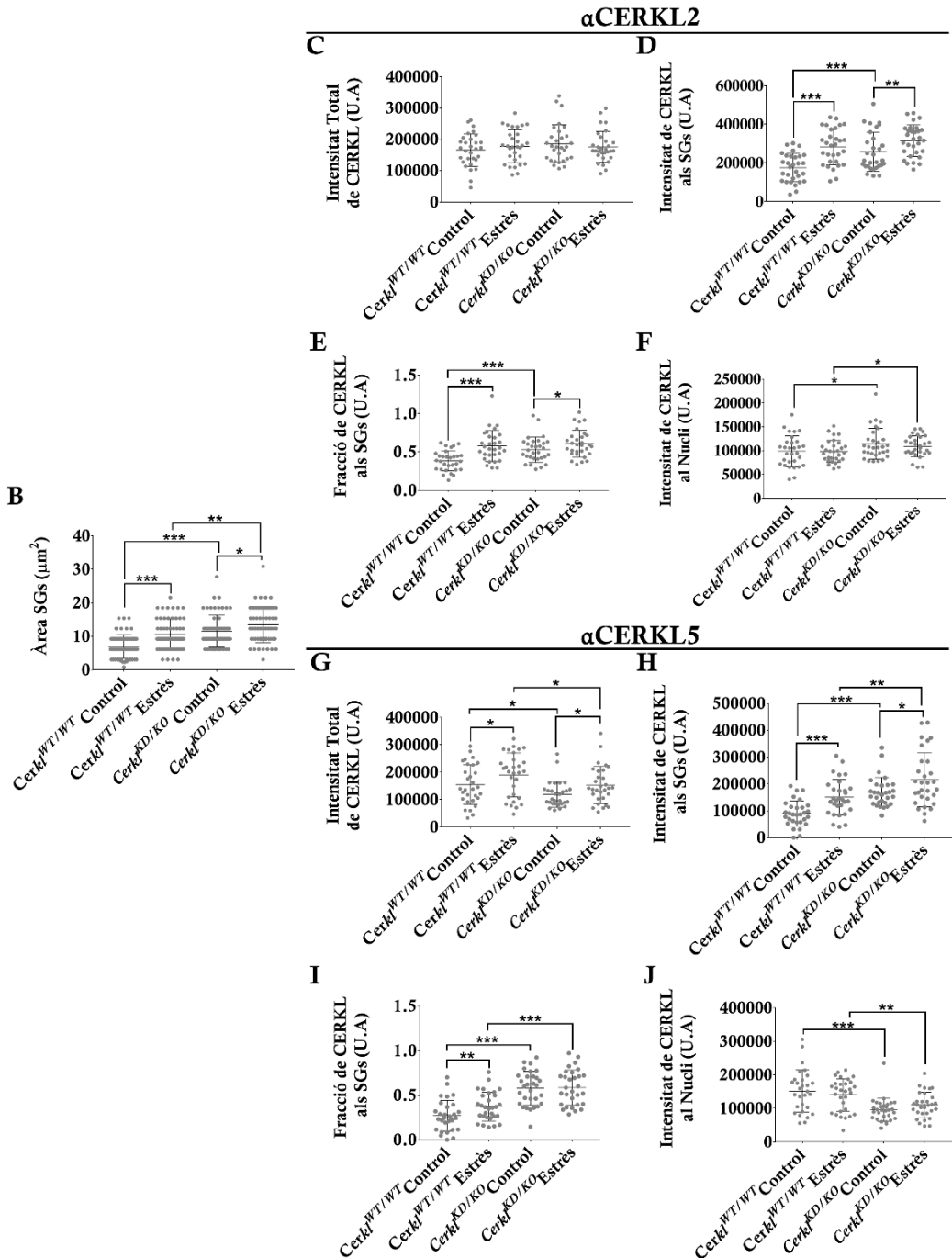


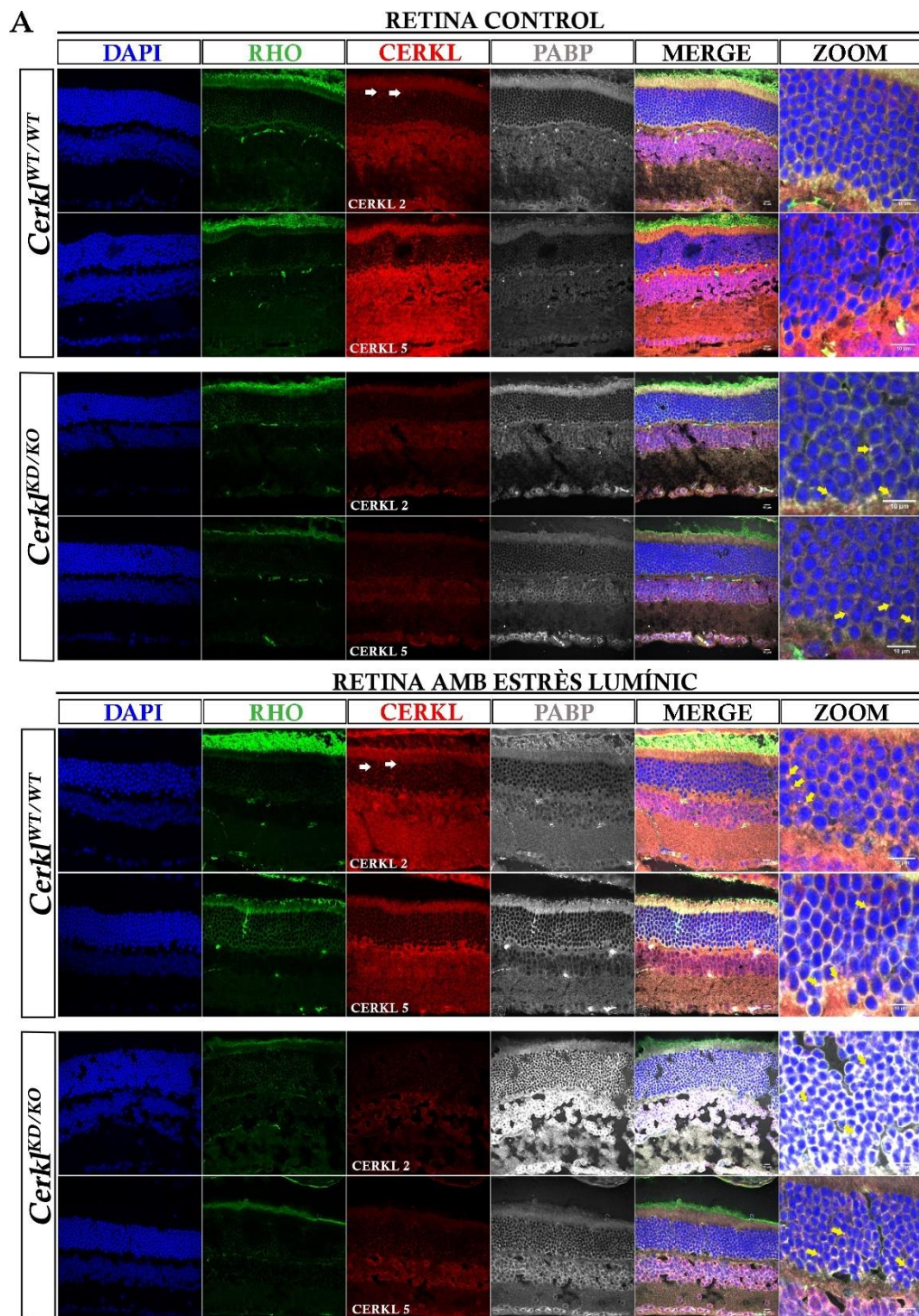
Figura 17. Estudi de la resposta de CERKL en condicions d'estrès oxidatiu en RGCs. A) Immunocitoquímica d'RGCs de retines *Cerkl*^{WT/WT} i *Cerkl*^{KD/KO} en condicions d'estrès oxidatiu i control. B) Àrea dels SGs. C i G) Intensitat total de CERKL. D i H) Intensitat de CERKL als SGs. E i I) Fracció de CERKL que es desplaça als SGs. F i J) Intensitat de CERKL al nucli.

Estudis d'estrès lumínic *in vivo* en retines de ratolins *Cerkl*^{KD/KO}

Un dels objectius del nostre treball és estudiar si CERKL és rellevant a l'hora d'intervenir en la resposta a l'estrès lumínic *in vivo*, ja que la retina és un teixit que es troba constantment exposat a la radiació de la llum, i per tant, pateix molt estrès lumínic i oxidatiu. Els experiments d'estrès lumínic en ratolins únicament es poden dur a terme amb ratolins albins, ja que la retina dels ratolins pigmentats és força resilient a l'irradiació lumínica. Per aquest motiu, mitjançant successius encreuaments de ratolins albins silvestres (que només porten la mutació en homozigosi en el gen *Tyrosinase* (B6(Cg)-Tyrc-2J/J)) amb la soca de mutants doble heterozigots per a *Cerkl* que ja teníem en fons negre (C57BL/6J) (veure l'article presentat al Capítol 1), vam generar la colònia mutant *Cerkl*^{KD/KO} en fons genètic albi.

En aquest estudi es van utilitzar dos ratolins albins, un control *Cerkl*^{WT/WT} i un mutant *Cerkl*^{KD/KO}. Després d'una hora d'estrès lumínic, les dues retines de cada animal van ser utilitzades per fer una IHC per tal de determinar la resposta de CERKL davant d'un estímul de llum. Com era d'esperar i d'acord amb el genotip dels animals, les retines *Cerkl*^{KD/KO} mostren una clara davallada en l'expressió de CERKL en comparació amb l'animal control (Figura 18A). A la retina *Cerkl*^{WT/WT} control, PABP s'expressa de manera ubíqua per tota la retina, en contrast amb l'increment en el nombre d'SGs de la retina sotmesa a l'estrès lumínic del mateix animal. Els SGs a la retina *Cerkl*^{WT/WT} són particularment evidents a la capa de cèl·lules ganglionars, la capa nuclear externa (ONL) i la capa dels fotoreceptors. D'altra banda, la retina *Cerkl*^{KD/KO} presenta més SGs en condicions basals que la *Cerkl*^{WT/WT}, indicant que tot i que no hi hagi una situació d'estrès provocada intencionadament, les cèl·lules de la retina pateixen algun tipus d'estrès basal quan els nivells d'expressió de CERKL són extremadament baixos. De fet, a la retina sotmesa a l'estrès lumínic de l'individu *Cerkl*^{KD/KO} la resposta és notablement exacerbada, mostrant un increment substancial en l'expressió de PABP i en la formació d'SGs

que, en aquest cas, es troben distribuïts per tota la retina en comparació amb la retina control del mateix animal (fletxes grogues, Figura 18A).



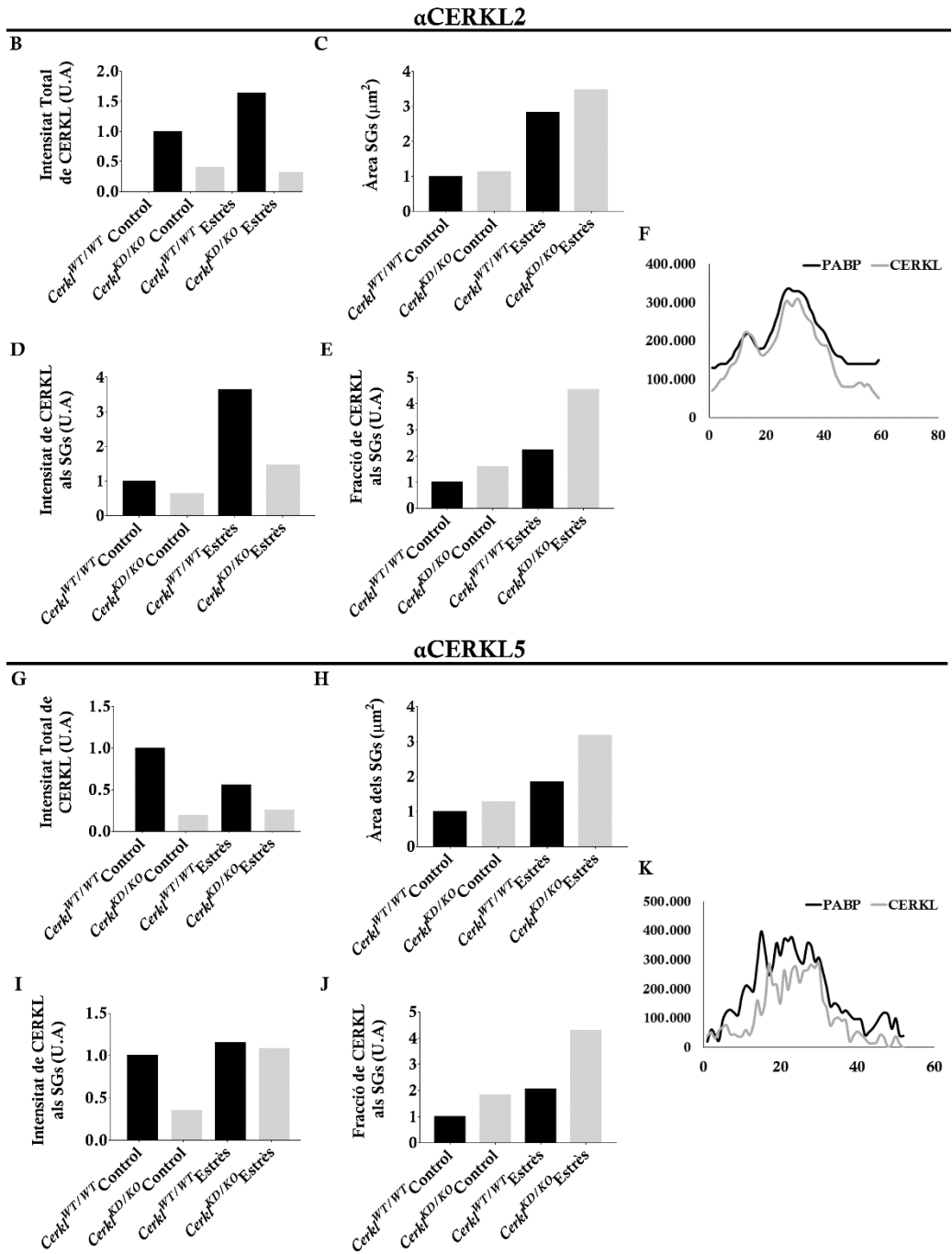


Figura 18. Resposta exacerbada a l'estrès lumínic a retines de ratolins *Cerkl*^{KD/KO}. A) Immunohistoquímica de retines *Cerkl*^{WT/WT} i *Cerkl*^{KD/KO}. Les fletxes blanques indiquen la translocació de CERKL cap a la perifèria nuclear i les fletxes grogues els SGs. B i G) Intensitat total de CERKL. C i H) Àrea dels SGs. D i I) Intensitat de CERKL als SGs. E i J) Fracció de CERKL als SGs. F i K) Gràfics de colocalització de CERKL amb PABP.

Per analitzar el comportament de CERKL, ens hem centrat en les retines *Cerkl*^{WT/WT}, ja que tenen uns nivells d'expressió de CERKL normals. En els nuclis dels fotoreceptors de la condició control, ambdós anticossos que reconeixen CERKL mostren petites però visibles diferències en el patró d'expressió, probablement reflectint la detecció de diferents isoformes segons l'anticòs emprat. D'altra banda, sota condicions d'estrès els dos patrons són molt similars, es produeix un canvi i s'observa una acumulació perinuclear de les isoformes de CERKL detectades amb l'anticòs α CERKL2 (fletxes blanques, Figura 18A). Aquest resultat mostra, no solament que les diferents isoformes poden estar actuant diferent, sinó que segons el tipus cel·lular la resposta de les isoformes també podria ser diferent, ja que en els cultius d'RGCs les isoformes de CERKL detectades amb α CERKL2 en condicions d'estrès es localitzaven més al nucli. Caldria realitzar quantificacions de la localització de CERKL als nuclis dels fotoreceptors al llarg de tota la retina per tal de demostrar si realment existeix aquesta discordança. A més, en condicions d'estrès lumínic, la intensitat total de CERKL detectada per α CERKL2 es veu incrementada en contrast amb la detectada amb α CERKL5 (Figura 18B i 18G).

Pel que fa als grànuls d'estrès, s'ha comparat l'àrea dels SGs en condicions control i en situació d'estrès lumínic en ambdós animals. Aquesta comparació mostra un increment en l'àrea dels SGs en retines sotmeses a estrès lumínic (Figura 18C i 18H). Complementàriament, es va determinar que CERKL colocalitza amb PABP als SGs, particularment sota condicions d'estrès lumínic (Figura 18D i 18I). Finalment, es va quantificar la fracció total de CERKL localitzada en els SGs. Tenint en compte la intensitat total de CERKL, s'observa un desplaçament de CERKL cap als SGs quan la retina es troba sotmesa a aquest estímul, però aquest increment és molt més evident a la retina *Cerkl*^{KD/KO} (Figura 18E i 18J).

L'anàlisi de colocalització de CERKL i PABP es va dur a terme mesurant les intensitats i la possible colocalització en els grànuls d'estrès a la retina *Cerkl*^{WT/WT} sotmesa a estrès lumínic. Els nostres resultats mostren una colocalització

pràcticament perfecte entre ambdues proteïnes quan les retines estan sota estrès, indicant un paper rellevant de CERKL en la formació dels SGs. CERKL va ser detectat amb els dos anticossos, α CERKL2 i α CERKL5 (Figura 18F i 18K). Aquests resultats són encara preliminars i caldria realitzar replicats per tal de tenir robustesa i extreure'n conclusions definitives que complementin la resta de resultats d'aquest apartat.

Anàlisi de l'expressió gènica diferencial en condicions d'estrès lumínic en ratolins *Cerkl*^{KD/KO} per RNA-seq

Com reacciona la retina sota estrès oxidatiu? És evident que les neurones, en particular, les cèl·lules fotoreceptores han d'activar vies senyalitzadores de resiliència i supervivència per fer front al dany sobre les biomolècules. Quan aquestes vies no són suficients per fer front a les lesions, llavors s'activen vies de mort cel·lular programada. Tenint en compte que la nostra hipòtesi és que CERKL és un gen de resiliència que pot ser molt necessari a l'hora de respondre al dany per estrès oxidatiu, i que la seva manca o mutació causa una situació d'estrès basal a les neurones, ens vam preguntar si podríem esbrinar quina és la funció bàsica de CERKL a la cèl·lula i com respon aquesta davant l'estrès respecte a una situació control, identificant la resposta transcripcional diferencial per seqüenciació massiva del transcriptoma.

Així, una anàlisi per RNA-seq ens permet determinar les diferències a nivell transcripcional entre les retines del model que hem generat i aquelles que provenen d'una soca salvatge. Endemés, també ens permet distingir diferències entre la condició d'estrès (llum) i la control (fosc) dins del mateix genotip i entre els genotips. Per tal de tenir una mínima variabilitat entre els controls de fosc i llum, vam fer servir el mateix animal anestesià, amb un ull tapat i l'altre, obert, en resposta a 1h d'il·luminació continuada a 3.000 lux (Figura 19). Les retines van ser processades, l'RNA total obtingut i seqüenciat de forma massiva amb els protocols estàndard.



Figura 19. Esquema de la realització de l'assaig d'estrès lumínic en ratolins albins *Cerkl*^{WT/WT} i *Cerkl*^{KD/KO}.

Les lectures d'RNA (RNA *reads*) de totes quatre condicions (3 animals per a cada genotip, per tant, 12 mostres diferents) van ser "curades" i netejades, també es van normalitzar i comparar entre elles. Una de les primeres mesures que es fa és analitzar la diferència d'expressió en *Fold Change*, que és la *ratio* entre l'expressió del mateix gen entre dues condicions i genotips. Per afavorir la comparació, se'n fa el logaritme en base 2. Com tenim replicats, també es fa una anàlisi estadística dels valors obtinguts intragrup respecte els valors intergrup. Alguns dels resultats es mostren resumits a la Figura 20 en forma de *heatmap*, que representa el $\text{Log}_2\text{FoldChange}$ de ± 2 amb un p-valor ajustat $< 0,05$, on el color lila representa un valor relatiu d'expressió baixa del gen, mentre que en taronja/groc es representen els gens que mostren una elevada expressió. El dendrograma que acompanya al *heatmap* mostra la relació que hi ha entre els patrons d'expressió dels diferents gens segons genotip i tractament.

En aquest mapa d'expressió observem tots aquells gens que presenten diferències de ± 4 vegades d'expressió. Com es pot observar, en molts dels casos es formen grups de gens que en el model animal *Cerkl*^{KD/KO} es troben clarament sub-expressats respecte als ratolins control i viceversa. De fet, les diferències entre genotips són molt evidents, ja en condicions basals. A més, clarament observem que hi ha notables diferències sobretot en el cas dels animals *Cerkl*^{KD/KO} entre les condicions de llum i de foscor, indicant que possiblement presenten més sensibilitat a l'estrès produït amb la llum. En aquest mapa d'expressió i mirant amb un cert detall, podem detectar que

els gens agrupats i que mostren clares diferències són gens no involucrats directament en cap via de senyalització relacionada amb l'estrès, mitocondris, autofàgia o apoptosi, sinó que majoritàriament es tracta de gens no anotats, pseudogens o gens *housekeeping* (Figura 20).

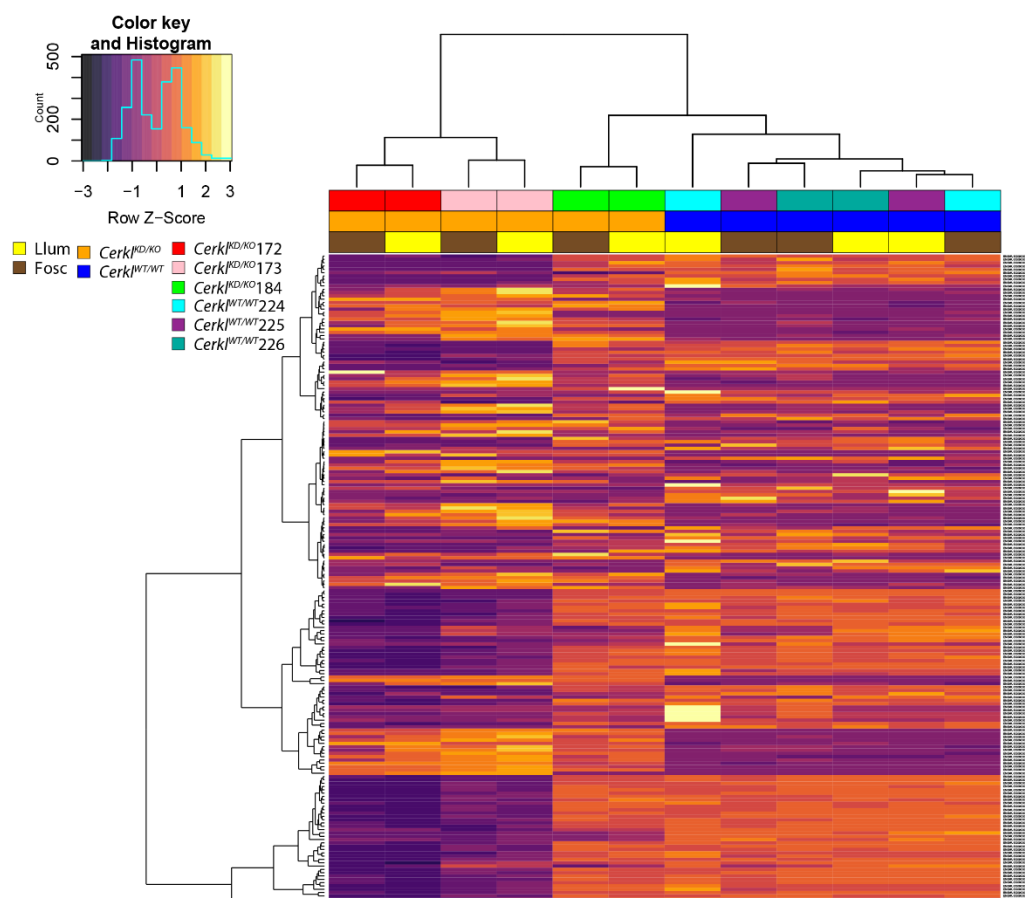


Figura 20. Representació en forma de *heatmap* dels gens obtinguts amb un $\text{Log}_2\text{FoldChange}$ de ± 2 . A la imatge es pot observar grups de gens expressats diferencialment entre genotips i condició.

Això és relativament freqüent en les anàlisis de transcriptòmica, en que es poden trobar diferències degudes a respostes a *heat shock*, també a l'RPE i en diferents tipus de càncer, on els pseudogens s'expressen diferencialment i hi ha hipòtesis que

suggereixen que poden actuar com a "esponges" de miRNA, o com a RNA d'interferència (que tindria un efecte contrari), sobre els seus gens cognats, els gens funcionals [268]–[271]. Per tant, tot i que les diferències més clarament observables en aquest *heatmap* no siguin les esperades respecte a les vies de resposta a estrès, no significa que no estiguin afectades, sinó que les diferències a nivell transcripcional degudes a la manca de *Cerkl* o a la situació d'estrès lumínic són probablement més subtils.

Es veuen diferències tant dins dels genotips, per tant, degudes a la manca d'expressió de *Cerkl*, i també, però de forma menor, en la resposta llum i fosc. Tot i això, els individus no es comporten de forma homogènia, per exemple, la mostra 184, un animal *Cerkl^{KD/KO}*, no sembla agrupar-se en el seu grup, ni presenta gaires diferències de resposta entre llum i fosc. Per tal d'identificar gens codificants que responguessin diferencialment vam decidir generar un altre *heatmap*, amb els gens de *Log₂FoldChange* de $\pm 0,5$ amb un p-valor ajustat $< 0,05$. En aquest cas, el llistat de gens és molt extens i tot i observar blocs de gens d'expressió diferencial a simple vista, no podem determinar fàcilment grups de gens que actuïn en la mateixa via de senyalització, ja que es necessita una anàlisi de grups de gens més fina (Figura 21).

Per aquest motiu, hem realitzat un estudi general del llistat de gens amb un *Log₂FoldChange* de ± 1 , el que significa que es tenen en compte tots els gens que presenten una expressió diferencial del doble o la meitat dins de les comparatives, i observem que hi ha un gran ventall de gens que presenten diferències.

Cal remarcar que l'individu 184, del grup *Cerkl^{KD/KO}*, no presenta un comportament similar als altres animals, ni tampoc és homogeni amb els controls. No presenta resposta diferencial entre llum i fosc i creiem que, a l'estar analitzant grups petits de replicats animals, distorsiona l'anàlisi disminuint la significació de la variació en l'expressió de gens que són rellevants. Caldria fer un *Principal Component Analysis* per a decidir si s'elimina d'aquesta anàlisi, com a *outlier*.

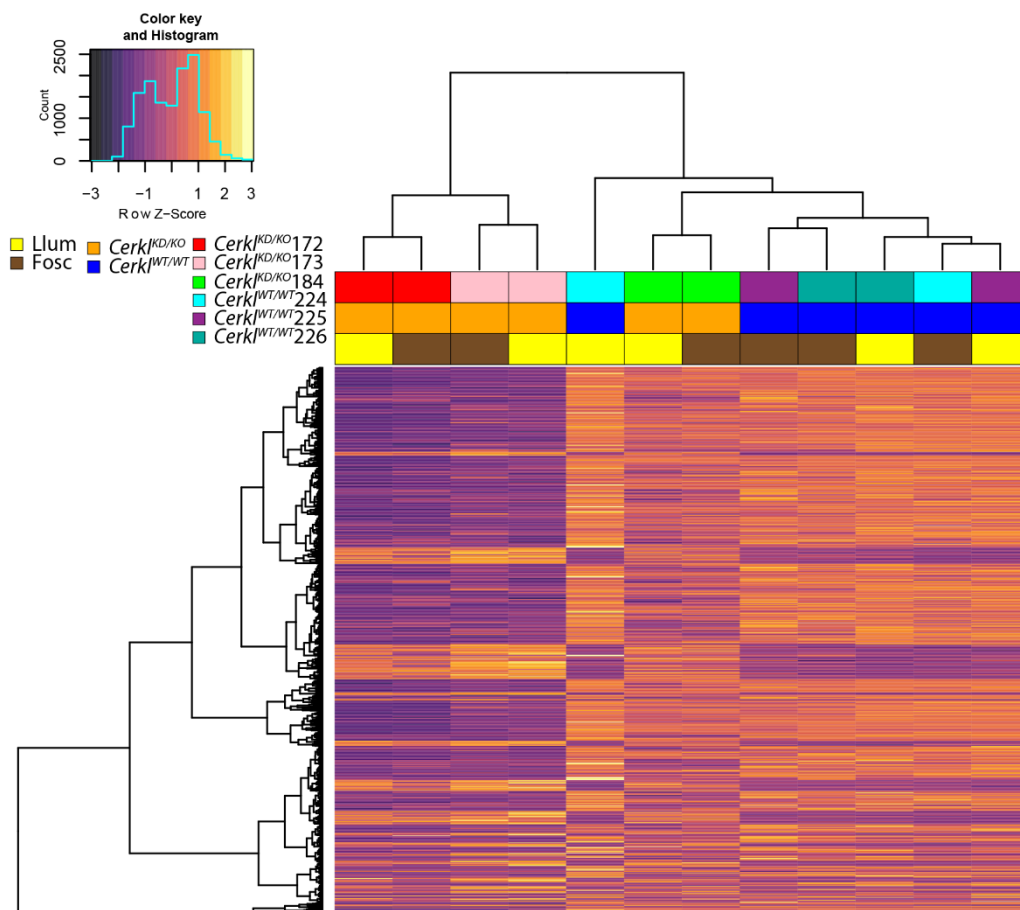


Figura 21. Representació en forma de *heatmap* dels gens obtinguts amb un *Log₂FoldChange* de $\pm 0,5$. A la imatge no podem distingir entre els gens però s'observa que hi ha una clara diferència entre l'expressió de gens segons el genotip i condició.

Pel que fa a la comparativa *Cerkl^{KD/KO}* amb *Cerkl^{WT/WT}* observem que hi ha diferències en l'expressió de gens relacionats amb mitocondris i autofàgia, l'estrès cel·lular, apoptosi i supervivència i metabolisme lipídic. Entre els gens altament expressats en el model trobem: *Alpk1*, gen que promou la mitofàgia quan els mitocondris es despolaritzen, a més d'estar relacionat amb la resposta immunitària innata i estimular la via de senyalització NF κ B; *Trib3*, que s'associa amb la mort neuronal programada; *Atf3*, que és un factor de transcripció implicat en la resposta a l'estrès i

Tnf és un factor pro-inflamatori i apoptòtic. Mentre que entre els gens que estan sub-expressats trobem: *Nr4a3*, que juga un paper en la regulació de la proliferació, la supervivència i la diferenciació cel·lular així com també està implicat en el metabolisme i en la resposta inflamatòria, i *Eif2ak2*, relacionat amb l'apoptosi, proliferació i diferenciació. A més, dintre dels gens sub-expressats també hi ha gens de la via dels esfingolípid i altres lípids de membrana indicant que possiblement alguna via metabòlica implicada en el metabolisme dels lípids es troba alterada (*Pld1* i *B3gnt5*).

La comparativa dels dos genotips en condicions de foscor, a part de mostrar un patró d'expressió similar pels gens que ja hem mencionat, presenta el gen *Ror1*, que està implicat en el creixement neuronal de les dendrites, sub-expressat en les retines del nostre model. I en condició de llum trobem *Trib3* i *Alpk1* sobre-expressats i *Nr4a3* sub-expressat. És suggerent que el gen *Hspb2*, corresponent a una proteïna *heat-shock*, es trobi sub-expressat. Finalment, la comparativa entre les condicions de llum i foscor no mostra diferències significatives entre els gens obtinguts.

Per tal de validar si la manca de *Cerkl* està implicada directament en l'alteració de l'expressió dels gens seleccionats, caldria realitzar una PCR quantitativa a temps real per determinar-ne els nivells d'expressió. Així mateix, si la relació fos indirecta, caldria fer un estudi acurat de les vies de senyalització en les quals estan implicades aquests gens i determinar el punt en el que CERKL està actuant. Actualment, estem duent a terme un estudi més exhaustiu realitzant diferents anàlisis de les dades obtingudes amb l'RNA-seq per determinar gens diferencialment expressats segons la via de senyalització concreta o la funció biològica, ja que d'aquesta manera, enlloc de tenir una visió general del conjunt de gens, ens podem centrar d'una forma més fina en els gens d'una via o resposta concreta i, per tant, augmentarem les possibilitats de trobar possibles interactors de CERKL.

2.3 Estudi de l'expressió de CERKL en copes òptiques de retina derivades d'hiPSCs i resposta enfront l'estrès oxidatiu

ANTECEDENTS

Els organoides derivats d'hiPCs són un model molt útil perquè permeten l'estudi de mutacions concretes en teixits i òrgans impossibles d'aconseguir en humans, de forma que permeten fer models *in vitro* de malalties, amb les mateixes característiques (o molt similars) a les que presenta el pacient, com ja hem explicat a la introducció d'aquesta Tesi. Gràcies a la col·laboració amb el grup de la Dra. Dunja Lukovic i el Dr. Slaven Erceg, del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) de València, es van generar copes òptiques de retina mitjançant la diferenciació d'hiPSCs a partir de fibroblasts d'un pacient afecte de Retinosi Pigmentària, portador de la mutació p. R283* en homozigosi en el gen *CERKL*, i d'una germana homozigota sana, utilitzada com a control [272]. El nostre treball ha estat caracteritzar l'expressió de *CERKL* durant el desenvolupament dels organoides i analitzar la seva resposta davant l'estímul d'estrès oxidatiu.

RESULTATS

Patró d'expressió de CERKL durant el desenvolupament i diferenciació de les copes òptiques de retina derivades d'hiPSCs

La diferenciació cap a copes òptiques a partir de fibroblasts no és senzilla. Es poden seguir diversos protocols, amb diferents factors tròfics i medis de diferenciació. En aquest treball, només es va realitzar una diferenciació cap a retina neuronal, sense epiteli pigmentari. Per tant, les copes òptiques derivades d'hiPSCs que vam estudiar, amb el pas del temps es van anar desenvolupant i estratificant en capes formant una estructura semblant a la de la retina, però sense RPE, que és un element rellevant per a la diferenciació i elongació dels segments externs dels fotoreceptors. A les 8 setmanes de desenvolupament ja presentaven forma de copa òptica (Figura 22A)

però els diferents tipus cel·lulars encara no estan totalment diferenciats. Les copes retinals s'estructuren inicialment formant rosetes de desenvolupament, unes regions a la part cèntrica de la copa on s'originen els precursors cel·lulars, que es divideixen i repliquen, generant cèl·lules que migren cap a la perifèria de la copa, fins a formar la copa òptica definitiva. A les 8 setmanes de desenvolupament, CERKL ja s'expressa però majoritàriament es localitza a la perifèria de la copa òptica, a les cèl·lules que posteriorment esdevindran els fotoreceptors. PNA, que marca els cons, es localitza completament a l'interior de les rosetes indicant la formació de cons immadurs que encara han de migrar a la zona de la copa òptica exterior, on es diferenciaran els fotoreceptors. Marcats amb CD-73 trobem els precursors dels bastons que, a diferència dels cons, ja els detectem a la perifèria de la copa òptica mentre acaben la seva diferenciació (Figura 22B).

A les 17 setmanes de desenvolupament, la copa òptica mostra una estructura completament diferent, amb les cèl·lules estratificades en capes, indicant que ja és un organoid madur. En aquest estadi de desenvolupament podem observar com els fotoreceptors es troben a la perifèria de la copa òptica on la intensitat del marcatge de RHO (bastons) i PNA (cons) és clarament molt més intensa i l'expressió de CERKL es detecta amb una intensitat notable a la zona dels fotoreceptors, colocalitzant amb els marcadors de cons i bastons (Figura 22B).

Val a dir, que durant el transcurs del desenvolupament i diferenciació de les copes òptiques, sempre s'observa la presència de rosetes a zona central i, per tant, hi ha una certa acumulació de tipus cel·lulars en diferents estadis de diferenciació, que migraran fins posicionar-se a la seva localització definitiva.

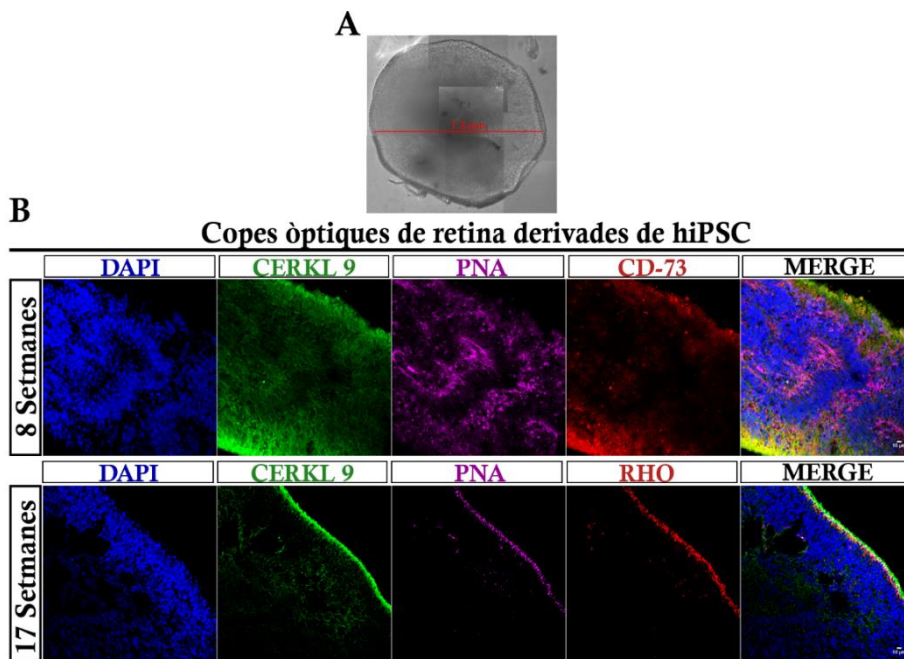


Figura 22. A) Imatge de microscòpia confocal d'una copa òptica de retina derivada d'hiPSC a partir de fibroblasts humans, on s'observa la morfologia d'organoide retinal sense epiteli pigmentari i amb una mida de 1,2 mm de diàmetre. B) Immunohistoquímica de les copes òptiques a setmana 8 i 17 de desenvolupament. A la setmana 8, s'observen les rosetes de creixement i diferenciació cel·lular on es troben els precursors dels tipus cel·lulars que conformaran la copa òptica. A la setmana 17, els precursors cel·lulars ja s'han diferenciat i es localitzen a la posició final dins l'organoide que donarà lloc a una estructura en capes, emulant una retina. Els nuclis es marquen amb DAPI, PNA marca els cons, CD73 i RHO marquen els bastons.

Nivells d'expressió de CERKL en copes òptiques de retina derivades de hiPSCs d'un pacient portador de la mutació p. R283* de CERKL en comparació amb la seva germana sana

Les copes òptiques de retina derivades d'hiPSCs són una eina molt útil per estudiar les malalties de la retina, i en el nostre cas, per a estudiar l'efecte de les mutacions de *CERKL*. Gràcies a aquesta col·laboració, vam poder generar i estudiar copes òptiques generades a partir d'un pacient afecte d'RP portador de la mutació p. R283* de *CERKL* en homozigosi i, com a control, es van generar copes de la seva germana sana (per tal d'intentar el màxim aparellament d'edat i *background* genètic).

Aquest estudi s'ha realitzat en copes òptiques madures d'entre 27 i 34 setmanes de diferenciació, quan ja estan completament estratificades en capes. En la situació control, s'observa una elevada expressió de CERKL a la zona dels fotoreceptors i una expressió més tènue a la resta de capes de la copa. A la roseta de diferenciació també hi podem observar que l'expressió de CERKL és més elevada, però no tant com en els fotoreceptors, zona on clarament hi ha molta expressió.

D'altra banda, respecte la copa òptica provinent del pacient amb la mutació p. R283* observem una davallada notable en l'expressió de CERKL, el que és d'esperar, ja que aquesta mutació genera un codó d'aturada a l'exó 5 que trunca la proteïna. Cal recordar que l'exó 5 presenta *splicing* alternatiu, per això, es podran generar totes les isoformes que no contenen l'exó 5 (Figura 23). Aquests resultats, juntament amb els controls de qualitat, diferenciació i expressió gènica duts a terme pels nostres col·laboradors, confirmen que els organoids de retina generats d'hiPSCs obtingudes a partir de fibroblasts de pacients, són un bon model per estudiar l'efecte fenotípic d'aquesta mutació en un model molt proper a la retina humana.

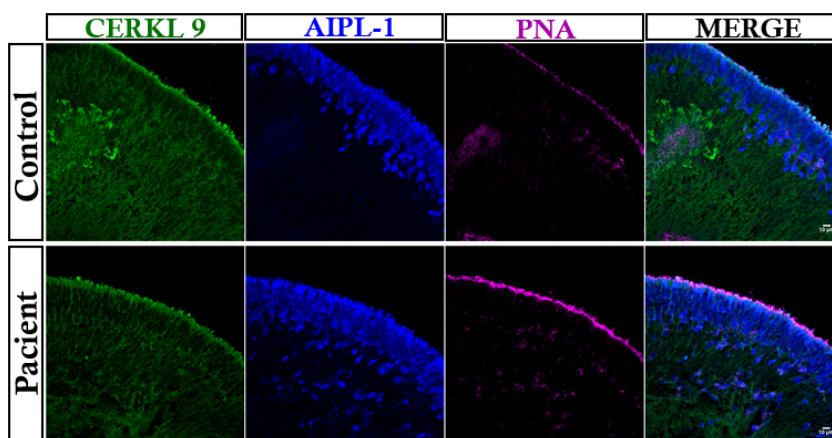


Figura 23. Immunohistoquímica realitzada en un microscopi confocal d'alta resolució on podem observar que les cures òptiques estan estratificades en capes ja que AIPL1 ens marca el segment intern dels fotoreceptors i PNA, els còns. En la copa òptica de l'individu control s'observa una elevada expressió de CERKL a la zona dels fotoreceptors i a la roseta de diferenciació, mentre que en la copa òptica provinent del pacient s'observa el mateix patró d'expressió, però amb un decrement en els nivells d'expressió de CERKL causats per la mutació p. R283*.

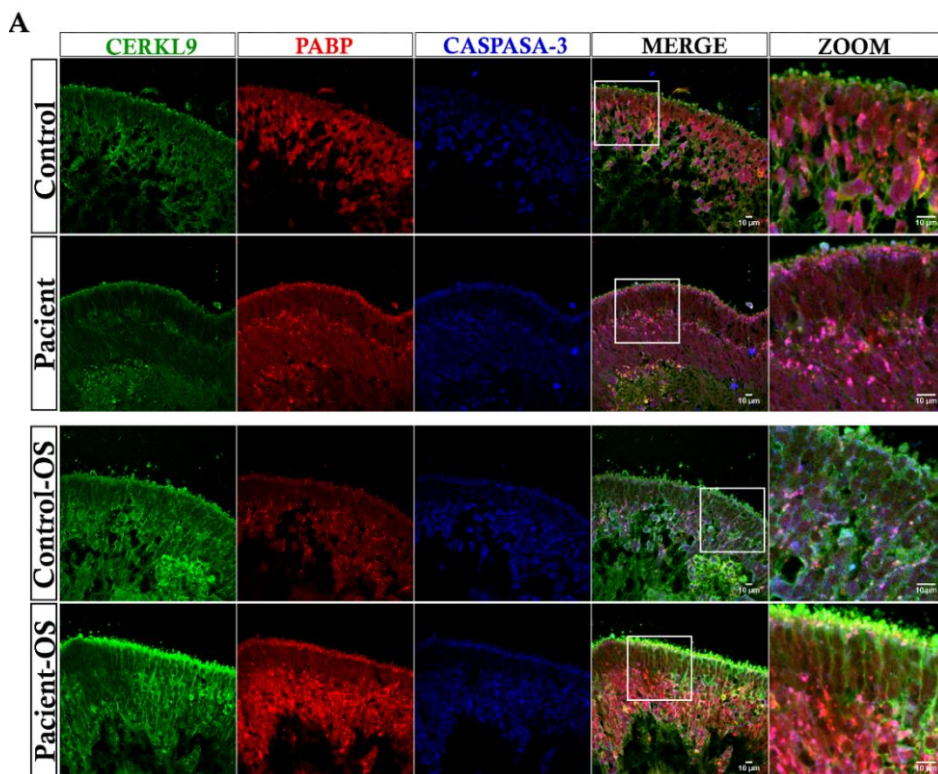
Resposta cel·lular de CERKL en les copes òptiques de retina enfront un estímul d'estrès oxidatiu

En condicions basals i sense estrès oxidatiu, com ja hem vist en l'apartat anterior, l'expressió de CERKL es distribueix per tota la copa òptica però la seva expressió es fa més notable a la zona dels fotoreceptors. L'organoide derivat del pacient, com era d'esperar, presenta una reducció significativa en l'expressió de CERKL. Quan detectem PABP, marcador de grànuls d'estrès, observem que el pacient, de manera basal, ja presenta una elevada quantitat d'SGs en comparació amb el control, el que indica que sense cap estímul extern d'estrès, aquests organoides derivats del pacient ja estan sotmesos a un major estrès basal que els controls (Figura 24A). Quan es realitza un tractament amb arsenit sòdic 0,5 mM durant 45 minuts per a provocar estrès oxidatiu, observem en el cas control un increment significatiu en la formació d'SGs, però en el cas del pacient aquesta resposta és totalment exacerbada, en comparació amb el control. De manera anàloga al model de ratolí, la situació basal del pacient s'assembla molt a la situació en condicions d'estrès del control (Figura 24A i 24B). Pel que fa a l'expressió de CERKL, a les copes òptiques control i en condicions d'estrès oxidatiu, observem un increment significatiu en l'expressió de CERKL respecte les condicions basals, però de nou, aquest increment és molt més exagerat en el pacient, arribant a tenir una expressió de CERKL major que el control (Figura 24C). Això indica que, tot i haver inicialment una menor expressió de CERKL en el pacient, la situació d'estrès oxidatiu desencadena una resposta a nivell transcripcional i/o traduccional, amb un gran increment de la producció de CERKL per tal de fer front a aquest insult.

A més, també hem analitzat la presència de CERKL als SGs. Els nostres resultats mostren que davant l'estímul d'estrès oxidatiu hi ha un increment de localització de CERKL als SGs, tant en el control com en el pacient, essent aquest increment molt més notable en el pacient. Cal remarcar que no s'observen diferències aparents entre la formació d'SGs entre el control estressat i el pacient en condicions basals, el que

indica que el pacient *per se* està molt més estressat que un individu control (Figura 24D). Finalment, vam determinar respecte els nivells totals d'expressió de CERKL, quina fracció es trobava als SGs. En concordança amb els resultats anteriors realitzats en retines de ratolí i cèl·lules ganglionars de la retina, es detecta un increment de CERKL als SGs quan les còpies òptiques estan sotmeses a un estímul d'estrès oxidatiu, essent aquest increment major en el pacient (Figura 24E).

Per acabar, vam determinar la intensitat de CASPASA-3 als grànuls d'estrès, marcador de mort cel·lular. De nou, observem que la comparació entre els nivells de CASPASA-3 entre el control en situació d'estrès oxidatiu i el pacient en condicions basals són molt similars, mentre que es produeix un increment molt exagerat en el pacient amb estrès oxidatiu (Figura 24F). Endemés, si observem els nivells de CASPASA-3 als SGs enriquits en CERKL, les còpies òptiques del pacient, sota condicions d'estrès oxidatiu, també presenten una expressió molt major a la resta de situacions (Figura 24G).



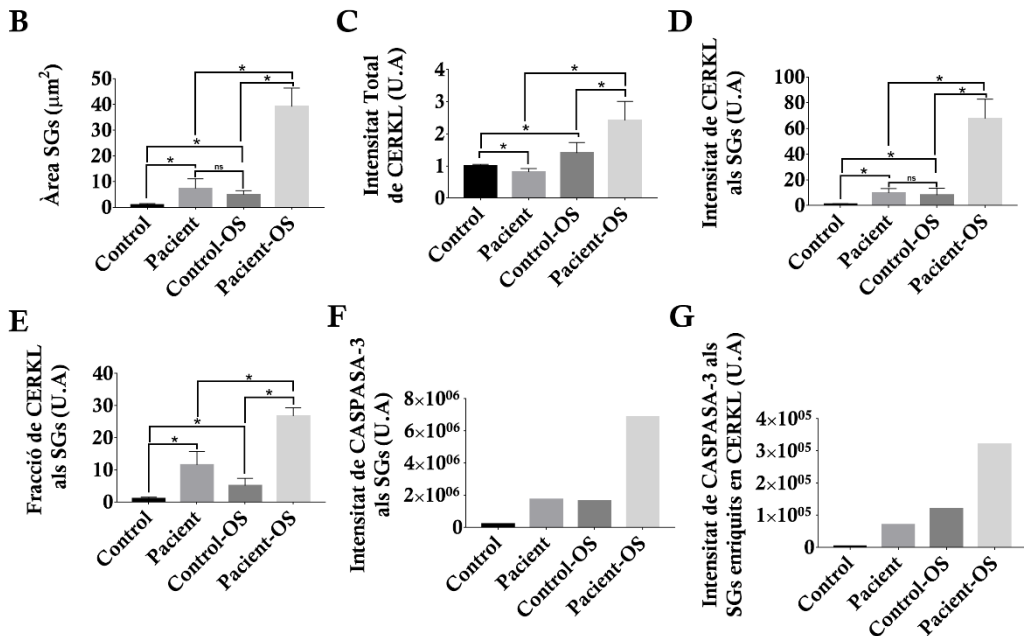


Figura 24. Resposta cel·lular de CERKL a les copes òptiques de retina derivades d'hiPSC d'un pacient de RP portador de la mutació p. R283* en homozigosi i un control sa. A) Immunohistoquímica en condicions basals i d'estrès on es pot observar que el pacient presenta d'entrada nivells d'estrès basals elevats i que la seva resposta a l'estrès és molt més elevada que el control. B) Quantificació de l'àrea dels grànuls d'estrès. C) Intensitat total de CERKL. D) Intensitat de CERKL als grànuls d'estrès. E) Fracció de CERKL als grànuls d'estrès. F i G) Intensitat de CASPASA-3 als grànuls d'estrès segons si estan enriquits amb CERKL. PABP marca els grànuls d'estrès i CASPASA-3 és un marcador de mort cel·lular. La significació estadística s'ha realitzat amb tres rèpliques tècniques amb el test Mann-Whitney (*) p-valor < 0,05.

Aquests resultats indiquen que, molt probablement, les retines de pacients amb mutacions a *CERKL* presenten uns nivells d'estrès basal molt més elevats que els individus sans. Conseqüentment, quan es sotmeten a un estímul d'estrès oxidatiu extern, la resposta davant aquest és molt més exacerbada, produint una quantitat ingent de grànuls d'estrès i incrementant la producció de CERKL. A més, aquests resultats mimetitzen els obtinguts anteriorment en aquest capítol amb el nostre model animal, amb el que també observàvem un increment en la resposta davant

l'estímul d'estrès a les retines dels ratolins on l'expressió de *Cerkl* està molt disminuïda.

En conjunt, els nostres resultats posen de manifest que CERKL podria ser un sensor clau en la detecció i posterior resposta cel·lular davant estímuls d'estrès oxidatiu i, per tant, tenir un paper essencial en la resiliència i supervivència dels fotoreceptors davant els estímuls d'estrès oxidatiu quotidians, com la llum solar.

Transcriptòmica per seqüenciació massiva de *Single-Cell* RNA per determinar l'expressió diferencial de gens en cons i bastons a les còpies òptiques de retina del pacient i del control

Les notables diferències en el comportament enfront l'estrès oxidatiu entre les còpies òptiques de retina del pacient i de l'individu sa suggerien que hi podria haver una expressió gènica diferencial en els diferents tipus cel·lulars dels organoides segons si provenien d'un individu sa o no, i de si rebien un estímul d'estrès, de manera anàloga al que passa amb les retines del model *Cerkl*^{KDKO} respecte al ratolí silvestre en situació d'estrès lumínic. Per aquest motiu vam decidir realitzar una anàlisi transcriptòmic per *Single-Cell*. Aquesta tècnica ens permetria determinar el transcriptoma d'una única cèl·lula i en cas d'obtenir diferents poblacions cel·lulars poder-les comparar entre elles, com per exemple, una possible resposta diferencial entre cons i bastons.

Com a primera aproximació, vam intentar realitzar la disgregació de les còpies retinals i la posterior separació de les cèl·lules per citometria de flux. A diferència dels fotoreceptors de ratolí, amb els que prèviament ja havíem intentat infructuosament fer una separació mitjançant aquesta tècnica, els fotoreceptors de les còpies òptiques presenten un cilí i un segment extern molt més curts, i vam hipotetitzar que no serien tan fràgils (Figura 25).

Seguidament, es va realitzar el control de qualitat de l'RNA de les cèl·lules de la placa però, desafortunadament en el nostre cas, no van superar el control de qualitat.

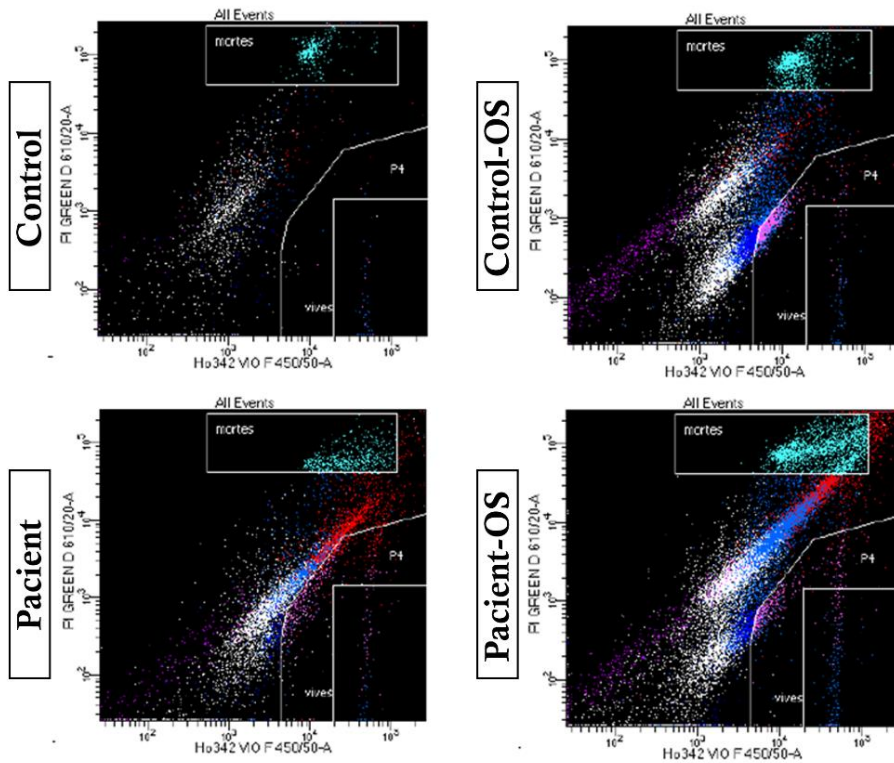


Figura 25. Separació per citometria de flux de cons i bastons de les copes òptiques.

Vam fer algun intent més, però sense èxit. Malgrat la dificultat per aïllar i obtenir RNA dels fotoreceptors, vam decidir realitzar finalment una anàlisi d'RNA-seq de les copes òptiques amb un protocol d'obtenció d'RNA a partir de mostres altament degradades. Vam considerar que si no podíem obtenir poblacions cel·lulars aïllades, podríem analitzar les diferències d'expressió gènica de manera general. Les copes òptiques, tot i ser molt útils, són un recurs costós i escàs, així que vam obtenir l'RNA dels talls de les crioseccions. Aquesta vegada l'RNA va superar amb èxit les proves de control de qualitat i es van generar les llibreries per analitzar les diferències entre les diferents mostres (Figura 26).

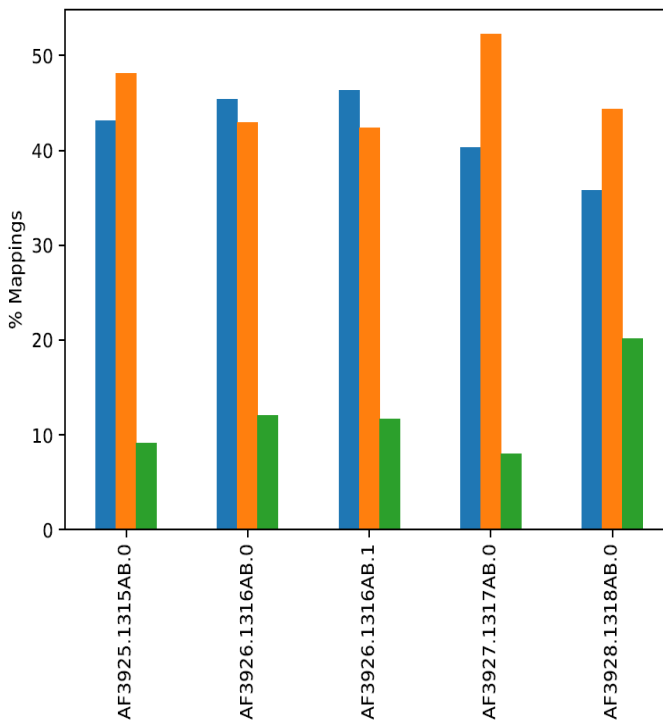


Figura 26. Anotacions de les lectures (*reads*). **AF3925:** Control-OS, **AF3926:** Control, **AF3927:** Pacient-OS, **AF3928:** Pacient. **Blau:** regions exòniques, **taronja:** regions intròniques i **verd:** regions intergèniques.

Les mostres obtingudes presentaven molta contaminació de DNA genòmic com es pot veure a la Figura 26, ja que hi ha un elevat percentatge de regions intròniques i, en menor quantitat, intergèniques. Això es deu a que l'extracció d'RNA es va realitzar de crioseccions de còpies òptiques fetes en condicions que no eren lliures de RNAses i el tipus d'aïllament no és òptim. Amb aquests resultats, l'anàlisi que es va decidir realitzar no va ser incloent-hi totes les dades de seqüències obtingudes. Per tal d'evitar biaixos importants a les anàlisis, vam decidir concentrar-nos només en els *split-reads*, que són el conjunt de lectures que cada extrem mapa a regions properes però no contigües del genoma, és a dir, que corresponen a lectures de la unió de dos exons després d'un procés d'*splicing* (i per tant, que corresponen amb seguretat a

lectures de cDNA. Tot i tenir un baix percentatge d'*split-reads*, vam pensar que reflecteixen, ni que sigui parcialment, els nivells d'expressió gènica.

Aquesta anàlisi s'està realitzant actualment i un cop obtinguts els resultats realitzarem la comparativa humà-ratolí, per tal de poder validar les dades en els dos models. Aquesta anàlisi és d'elevada rellevància, ja que ens permetrà identificar gens que es troben diferencialment expressats en el pacient i a més aquells que són de resposta a l'estrès, expressió dels quals és essencial per gestionar la resposta a l'estrès evitant la mort cel·lular.

ANNEX CAPÍTOL 2 - MATERIALS I MÈTODES

Cultius cel·lulars, transfecció i tractaments

Per dur a terme els assajos de dinàmica cel·lular en situació control i d'estrès oxidatiu es van utilitzar cèl·lules humanes embrionàries de ronyó (HEK293). Les cèl·lules van ser cultivades en medi DMEM *High Glucose* amb L-Glutamina (ATCC) suplementat amb 10% v/v de sèrum boví fetal (FBS) prèviament inactivat a 55°C durant 15 minuts) (Invitrogen) i un 1% v/v de penicil·lina/estreptomicina i incubades a 37°C i 5% de CO₂.

Per a la transfecció de construccions, es van sembrar aproximadament 50.000 cèl·lules per pou quan l'anàlisi posterior era *western-blot*, i entre 15.000-25.000 cèl·lules per pou quan s'havia de fer una immunocitoquímica (ICC). La sembra de cèl·lules HEK293 es va realitzar 24 hores abans de realitzar la transfecció en un medi sense antibiòtic i en plaques de 24 pous. Al dia següent, es va realitzar la transfecció amb Lipotransfectina (Nitorlab) seguint les indicacions del fabricant. Finalment, els lipoplexes van ser afegits a les cèl·lules i incubats durant 4-6 h a 37°C. Seguidament, el medi va ser canviat per medi amb antibiòtic, i les cèl·lules es van incubar durant

48h. Seguint aquest protocol es van transfectar el vector buit pEGFP-N2 i la construcció, prèviament generada a aquesta Tesi, CERKL-GFP.

Per induir una situació d'estrès oxidatiu es va afegir arsenit sòdic (NaAsO_2) 0,5 mM al cultiu durant 45 minuts. Per estudiar la dinàmica de CERKL *in vitro*, les cèl·lules es van tractar amb leptomicina B, un agent inhibidor de l'exportació nuclear que pot ser usat per estudiar el tràfic nucli-citoplasma de les proteïnes. La leptomicina B (Alomone Labs) va ser afegida als cultius cel·lulars a una concentració final de 40 nM durant 4h.

Seguidament, les cèl·lules van ser fixades i processades al microscopi confocal o lisades per realitzar la immunodetecció per *western-blot*.

Immunocitoquímica (ICC)

Per tal de realitzar una ICC, les cèl·lules es van fer créixer sobre un cobreobjectes prèviament tractat amb 0,01% de Poli-L-Lisina (Sigma Aldrich). Un cop finalitzada la transfecció, les cèl·lules van ser fixades amb 2% de PFA durant 5 minuts, i al 4% durant 20 minuts. Seguidament, es van rentar tres vegades amb PBS 1x i es van permeabilitzar i bloquejar durant 1h amb una solució de 0,1% Tritó X-100 i 2% de *Sheep* sèrum en PBS 1x a temperatura ambient (RT). Finalment, es van incubar tota la nit amb l'anticòs primari específic en la solució prèviament utilitzada. Al dia següent, les cèl·lules es van rentar tres vegades amb PBS 1x i van ser incubades amb l'anticòs secundari corresponent i DAPI (Roche) en PBS 1x durant 1h a RT. Després de tres rentat amb PBS 1x, els cobreobjectes van ser muntats en un portaobjectes amb *Mowiol* per poder-los visualitzar al microscopi confocal (SP5, Leica Microsystems). Els anticossos utilitzats van ser els següents: α GFP (Abcam 290) 1:1.000 i Alexa FluorR 488 α Rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific A11070) 1:400.

Anàlisi i quantificació de la localització nuclear de CERKL

Les imatges obtingudes amb el microscopi confocal van ser analitzades amb el software processador d'imatges FIJI. Per determinar la quantitat de CERKL localitzada al nucli en comparació amb el total es van generar dues màscares. La primera màscara mesura la fluorescència total de CERKL-GFP de la imatge i la segona màscara únicament considera els nuclis, tenyits amb DAPI. La primera màscara ens serveix per mesurar la fluorescència total de CERKL, mentre que la segona màscara, quan se superposa a la imatge de CERKL, obtenim el valor de fluorescència corresponent a la proteïna de fusió que es troba al nucli. La divisió entre la fluorescència dins del nucli i la total ens permet determinar el percentatge de CERKL amb localització nuclear respecte del total.

Immunodetecció per *western-blot*

Les cèl·lules van ser lisades usant tampó Laemmli 1x. Seguidament, es va realitzar l'electroforesi de les mostres en un gel SDS-PAGE, que van ser transferides a una membrana PVDF (Roche Applied Science), la qual va ser bloquejada amb un 5% de llet i 5% de BSA (Sigma Aldrich) en PBS que contenia el 0,1% de *Tween*-20 (PBST). Els anticossos primaris van ser incubats durant la nit a 4°C i al dia següent es va incubar amb l'anticòs secundari corresponent. Els anticossos que es van utilitzar van ser els següents: α GFP (Abcam 290) 1:1000, α GAPDH (Abcam 9484) 1:1000, Peroxidase-Conjugated α Rabbit (GE Healthcare NA934VS) 1:2.000 i Peroxidase-Conjugated α Mouse (Sigma Aldrich AB5706) 1:2.000.

Estrès lumínic i oxidatiu *in vivo*

Els experiments d'estrès lumínic es van dur a terme en animals adults *Cerkl*^{WT/WT} i *Cerkl*^{KD/KO} amb un fons genètic albi (B6 (Cg)-Tyr^{c-2J}/J). Els animals van ser anestesiats per prevenir el seu patiment amb la combinació de relaxant muscular Xilacina (10mg/Kg) i l'anestèsic Ketamina (100ng/Kg). Un ull de cada animal va ser cobert

per tal que el control negatiu fos l'altre ull, al qual se li va aplicar el col·liri *Cyclogyl*, per tal de dilatar la pupil·la. L'animal va ser exposat durant 1h a una llum blanca de 3.000 lux d'intensitat. Finalment, els animals van ser eutanasiats per dislocació cervical i els ulls es van extreure per futurs experiments. Per dur a terme els experiments d'estrès oxidatiu en cultius primaris de cèl·lules ganglionars de la retina s'ha seguit el mateix protocol esmentat en l'apartat anterior de resultats.

Enucleació de l'ull

Es va seguir el protocol descrit prèviament [273]. Posteriorment, es van realitzar crioseccions de retina de 12 µm de gruix, que van ser congelades a -80°C fins a posteriors tractaments.

Immunohistoquímica (IHC)

Es va seguir el mateix protocol que el de l'article "*A new Cerkl mouse model generated by CRISPR-Cas9 shows progressive retinal degeneration and altered morphological and electrophysiological phenotype*" presentat al Capítol 1 d'aquesta Tesi. Els anticossos primaris utilitzats i les dilucions van ser les següents: αCERKL2 (1:200, generat al laboratori), Rabbit αCERKL5 (1:100, generat al laboratori), Rabbit αCERKL9 (1:100, generat al laboratori) Mouse αRhodopsin (1:300, ab5417, Abcam, Cambridge, UK), Rabbit αL/M Opsin (1:300, AB5405, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA), DAPI (1:1000, 10236276001, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), PNA (1:50, L32460, Invitrogen, Carlsbad, California, USA), αPABP-488 (1:50, sc-166381 AF488, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), αPABP-647 (1:50, sc-166381 AF647, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), αPABP-488 (1:50 sc-166381 AF48 Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) i αCaspase-3 (1:200, 559565, BD Biosciences).

Cultius primaris de cèl·lules ganglionars de la retina

Es va realitzar el mateix protocol que el de l'article "*A new Cerkl mouse model generated by CRISPR-Cas9 shows progressive retinal degeneration and altered morphological and electrophysiological phenotype*" presentat al Capítol 1 d'aquesta Tesi, excepte perquè en aquest cas es van utilitzar retines d'embrions E16.

Microscòpia confocal i anàlisi d'imatges

La visualització de les imatges es va realitzar usant un microscopi confocal (Zeiss LSM 880, Thornwood, NY, USA), (LEICA TCS-SP2, Wetzlar, Germany) i un microscopi confocal d'alta resolució (LEICA SP5 STED CW). Per totes les IHCs d'aquest treball que han estat quantificades s'ha realitzat el següent procediment: a l'hora de determinar l'àrea de les imatges, aquestes han estat segmentades en dues fases, establint un llindar segons el que volguéssim calcular, tant per CERKL com per PABP:

- **Intensitat o àrea total:** El llindar es defineix en el valor d'intensitat que selecciona tota l'àrea amb senyal.
- **Intensitat o àrea dels grànuls d'estrès:** El llindar es defineix en el valor d'intensitat que selecciona només els grànuls d'estrès.

Un cop els llindars s'han determinat, les imatges s'han fet binàries, generant el que anomenem màscara. El càlcul de l'àrea es realitza sobre la màscara, calculant la mitjana i multiplicant-la pel nombre de píxels al quadrat i per la mida del píxel al quadrat. D'altra banda, per calcular la intensitat, es multiplica la màscara del que volem calcular sobre la imatge corresponent, i el valor de la mitjana es multiplica pel nombre de píxels al quadrat.

Pel que fa a les imatges corresponents a α CERKL9 es va realitzar un tractament inicial normalitzant-les per la seva mitjana en una àrea de senyal basal (àrea dels

fotoreceptors) i es va multiplicar per la mitjana basal de les tres rèpliques, d'aquesta manera es va suavitzar la variabilitat entre les mostres, ja que provenien del mateix pacient/control i qualsevol variació era causada per les rèpliques tècniques. Finalment, tots els valors han estat normalitzats per la mitjana de la intensitat del control.

Per determinar la significació estadística es va utilitzar un T-test en els casos que es complia normalitat i igualtat de variàncies, i un test de Mann-Whitney en cas que no es complissin els paràmetres requerits. (*) p-valor<0,05, (**) p-valor<0,001 i (***) p-valor<0,0001.

RNA-seq de retines de ratolí

Es van utilitzar 3 ratolins albins *Cerkl^{WT/WT}* i *Cerkl^{KD/KO}* de la mateixa edat i sexe. En primer lloc, es va realitzar el protocol d'estrès lumínic (descriu anteriorment) i un cop eutanasiats els ratolins es van extreure les retines i es va procedir a aïllar l'RNA mitjançant el kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanya), seguint les indicacions del fabricant. Un cop obtingut l'RNA es va enviar al Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica (CNAG) on es van realitzar els controls de qualitat i les llibreries pel posterior anàlisi. L'RNA total de les retines de ratolí va ser quantificat per Qubit® RNA BR Assay kit (Thermo Fisher Scientific) i la integritat de l'RNA va ser estimada per RNA 6000 Nano Bioanalyzer 2100 Assay (Agilent). Les llibreries de l'RNA-seq van ser preparades amb *KAPA Stranded mRNA-Seq Illumina® Platforms Kit* (Roche) seguint les recomanacions del fabricant. De 100-300 ng d'RNA total van ser usats per l'enriquiment de la fracció amb poly-A amb boles magnètiques d'oligo-dT, seguit d'una fragmentació de l'mRNA per ions divalents a elevada temperatura. L'especificitat de cadena es va aconseguir durant la síntesi de la segona cadena duta a terme en presència de dUTP enlloc de dTTP. El cDNA d'extremus de doble cadena va ser adenilat a la regió 3' i se li van afegir els adaptadors *Illumina* de la plataforma compatible d'adaptadors amb índex duals únics i

identificadors moleculars únics (Integrated DNA Technologies). El producte de la lligació va ser enriquit amb 15 cicles de PCR i la llibreria final va ser validada amb Agilent 2100 Bioanalyzer amb el DNA 7500 assay. Les llibreries van ser seqüenciades amb HiSeq 4000 (Illumina), amb una longitud de lectures de 2x76bp+8bp+8bp usant HiSeq 4000 SBS kit (Illumina) i HiSeq 4000 PE Cluster kit (Illumina), seguint les indicacions del fabricant del protocol per indexació dual. L'anàlisi de les lectures i la puntuació de la qualitat es va dur a terme amb el *software Real Time Analysis* (RTA 2.7.7).

Gràcies a una col·laboració amb els grups del Dr. Pep Abril i el Dr. Jordi Garcia-Fernández del Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística hem pogut realitzar l'anàlisi de les dades obtingudes. Els reads crus de l'RNA-seq van ser mapats contra el genoma de ratolí i els comptatges van ser realitzats mitjançant el programa *edgeR v3.28.1* [274]. Els comptatges dels *reads* van ser analitzats per detectar gens diferencialment expressats amb el paquet *R DESeq2 (v1.26.0)* [275] incloent a la fórmula del disseny experimental els diferents individus, condicions d'estrès lumínic i genotip pel gen *Cerkl*. Els paràmetres per a considerar un gen diferencialment expressat com a significatiu han estat p-valor ajustat $< 0,05$ i un canvi en l'expressió $>1 \log_2$ (*Fold Change*). L' anotació automàtica dels gens es va realitzar mitjançant *DAVID (v6.8)* [276] utilitzant l'*Ensembl GeneID* disponible i buscant els codis GO disponibles en les tres categories (BP, CC, MF), així com la seva participació en rutes gèniques (BBID, BIOCARTA, KEGG), paraules clau relacionades amb la funció del gen i dominis proteics (INTERPRO, PIR, SMART).

Generació de còpies òptiques de retina derivades de hiPSCs

Les còpies òptiques de retina es van realitzar en col·laboració amb el grup dels Drs. Erceg i Lukovic del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF). El protocol de generació de les còpies el van realitzar íntegrament allà [272], mentre que el nostre grup va realitzar la caracterització de l'expressió de CERKL durant les setmanes de diferenciació, així com les proves d'estrès oxidatiu, d'ICH i de RNA-Seq.

Transcriptòmica *Single-Cell* de les còpies òptiques humanes derivades de hiPSCs

En primer lloc es va realitzar un tractament amb arsenit sòdic 0,5 mM durant 45 minuts a dues còpies òptiques del pacient i dues del control, i es van deixar sense tractar dues còpies òptiques del pacient i dues del control. Transcorregut aquest temps es va seguir el mateix protocol descrit a l'apartat de materials i mètodes del Capítol 1 "Separació dels cons i bastons de la retina de ratolí per citometria de flux". Cada cèl·lula es va dipositar a una placa de 96 pous (SMART-seq2 plate que conté tampó de lisi 0,2% Tritó X-100 i 1U/ μ L d'inhibidor de proteases). Aquestes plaques han estat congelades prèviament a -20°C fins el dia de l'experiment, en què s'han descongelat i centrifugat 1 minut a 2000 rpm i 4°C . Un cop la placa està plena amb una cèl·lula per pou, es cobreix amb un plàstic que fa la funció de tapa i es centrifuga durant 1 minut a 2.000 rpm i 4°C i es congela ràpidament amb gel sec. Finalment, les mostres es van congelar a -80°C fins al moment d'enviar-les al CNAG, on es va dur a terme el control de qualitat i l'anàlisi. El protocol que es va seguir va consistir en una transcripció inversa mitjançant la transcriptasa inversa SuperScript II (ThermoFisher Scientific), en presència d'1 μM d'oligo-dT30VN (IDT), 1 μM d'oligonucleòtids per a fer el canvi de motlle, i 1 M de betaïna. El cDNA es va amplificar usant *KAPA Hifi Hotstart ReadyMix* (Kapa Biosystems) i *IS PCR primer*, amb 15 cicles d'amplificació. Seguidament es va realitzar una purificació amb *Agencourt Ampure XP beads* (Beckmann Coulter), i la distribució del producte i la quantitat va ser obtinguda amb el Bioanalyzer usant el kit *High Sensitivity DNA* (Agilent Technologies).

Aïllament d'RNA a partir de crioseccions amb OCT d'hiPSC i RNA-seq

Per aïllar RNA a partir de crioseccions, s'afegeix trizol a sobre del teixit, s'incuba durant 5 minuts a temperatura ambient i es centrifuga a 10.600 rpm a 4°C durant 10 minuts. Seguidament, es transfereix el sobrenedant a un tub nou i s'afegeix una dilució 1:5 de cloroform, es barreja mitjançant vòrtex i s'incuba a temperatura

ambient 2 minuts. A continuació, es centrifuga a 10.600 rpm a 4°C durant 15 minuts, la fase aquosa es transfereix a un nou tub i s'afegeix isopropanol en relació 1:1, es realitza un vòrtex i s'incuba a temperatura ambient durant 10 minuts. Seguidament, es centrifuga a 10.600 rpm a 4°C durant 10 minuts i es descarta el sobrenedant. El pellet es renta dues vegades amb etanol al 75% i es centrifuga a 5.000 rpm a 4°C durant 5 minuts. Finalment, s'asseca el pellet a l'aire i es resuspèn amb aigua pre-escalfada a 65°C.

La seqüenciació per RNA-seq es va dur a terme al CNAG, on es va seguir el protocol per generar llibreries d'RNA usant el *SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit v2 - Pico Input Mammalian* (Takara, Bio USA, Inc.), seguint les recomanacions del fabricant, per RNA molt degradat. Per cada mostra, es van usar 10 ng d'RNA total per dur a terme la transcripció inversa. Seguidament, adaptador i índexs d'Illumina van ser afegits al cDNA, que va ser purificat mitjançant *Agencourt Ampure XP beads* (Beckmann Coulter). A continuació, els transcrits de cDNA ribosòmics (18S i 28S) i mitocondrials (m12S i m16) van ser eliminats i les llibreries d'RNA-seq van ser amplificades durant 16 cicles. Finalment, després de dues purificacions consecutives, es va analitzar la mida dels productes i la quantitat obtinguda gràcies al *Bioanalyzer* usant el *kit High Sensitivity DNA* (Agilent Technologies). La seqüenciació de les llibreries finals es va dur a terme mitjançant *Illumina HiSeq2500 v4*.

Capítol 3

Nanopartícules d'or com a potencial
vector terapèutic en malalties de la
retina: prova de principi

Publicació 3

*In Vitro Gene Delivery in Retinal Pigment
Epithelium Cells by Plasmid DNA-Wrapped Gold
Nanoparticles*

PUBLICACIÓ 3**TÍTOL**

“In Vitro Gene Delivery in Retinal Pigment Epithelium Cells by Plasmid DNA-Wrapped Gold Nanoparticles”

AUTORS (ANY)

Sònia Trigueros, Elena B. Domènech, Vasileios Toulis i Gemma Marfany (2019)

REFERÈNCIA

Genes (10) 4: 289, DOI: 10.3390/genes10040289 (Índex d'impacte 3,331)

RESUM

Moltes malalties rares presenten afectacions als òrgans neurosensorials. Entre aquests teixits i òrgans destaca la retina neuroepitelial que, d'una banda, és molt vulnerable a causa de l'exposició constant a la llum i el consegüent estrès oxidatiu, però de l'altra, és una part del sistema nerviós central accessible i fàcil de manipular genèticament. Actualment, les teràpies d'addició gènica que tenen com a diana el teixit retinal (tant els fotoreceptors com l'epiteli pigmentari), per exemple, en les distròfies de retina hereditàries, es basen en l'ús d'adenovirus associats (AAVs) com a vectors d'entrega del material genètic. No obstant l'èxit d'algunes teràpies que ja es troben en fase II/III, l'eficiència i la seguretat d'aquesta estratègia no sempre és òptima. L'entrega mitjançant una injecció subretinal implica un tractament invasiu, és un tractament d'una única administració, per aquests motius cal explorar metodologies alternatives. Basant-nos en la nostra experiència i en col·laboració amb el grup de la Dra. Sònia Trigueros (University of Oxford), actualment estem estudiant les innovadores propietats físiques, a escala nanomètrica, de partícules inorgàniques d'or per tal d'alliberar àcids nucleics (gens) a cèl·lules de l'epiteli pigmentari de la retina (RPE), com una potencial alternativa, eficient i segura. En



aquest treball, presentarem els nostres resultats preliminars emprant nanopartícules carregades amb DNA (DNA-NPs d'or) com a vectors per a l'entrega de càrrega gènica en cultius de cèl·lules de l'epiteli pigmentari humà *in vitro*. Aquests assajos constitueixen una primera prova de principi per determinar la viabilitat de realitzar l'entrega de gens *in vivo*. Els nostres resultats mostren que les cèl·lules transfectades amb DNA-NPs d'or expressen molt més ràpidament el gen reporter en comparació amb aquelles transfectades amb complexos DNA-liposomes. Addicionalment, també demostrem que les DNA-NPs d'or segueixen una via d'entrada a la cèl·lula i rutes de tràfic vesicular diferent comparat amb les NP sense DNA, molt probablement evadint, encara que parcialment, el sistema endosomal/lisosomal que acabaria destruint el DNA entregat.

APORTACIÓ PERSONAL AL TREBALL

La meua aportació a aquest treball ha estat el cultiu i la transfecció de cèl·lules ARPE-19, tant amb nanopartícules com amb liposomes, així com la realització i visualització de les preparacions al microscopi confocal. Finalment, he realitzat les quantificacions i muntatge d'imatges (Muntatge de totes les imatges de microscòpia confocal, Figura 1 quantificació a les 16h, Figura 2 quantificació control i Figura 3 quantificació EEA1).

Article

In Vitro Gene Delivery in Retinal Pigment Epithelium Cells by Plasmid DNA-Wrapped Gold Nanoparticles

Sònia Trigueros ^{1,*} , Elena B. Domènech ^{2,3}, Vasileios Toulis ^{2,3} and Gemma Marfany ^{2,3,4,*} 

¹ Department of Zoology, University of Oxford, Oxford OX1 3PS, UK

² Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; elenabdomenech@ub.edu (E.B.D.); vtoulis@ub.edu (V.T.)

³ CIBERER, ISCIII, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

⁴ Institute of Biomedicine (IBUB-IRSJD), Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

* Correspondence: sonia.trigueros@zoo.ox.ac.uk (S.T.); gmarfany@ub.edu (G.M.)

Received: 19 March 2019; Accepted: 8 April 2019; Published: 9 April 2019



Abstract: Many rare diseases course with affection of neurosensory organs. Among them, the neuroepithelial retina is very vulnerable due to constant light/oxidative stress, but it is also the most accessible and amenable to gene manipulation. Currently, gene addition therapies targeting retinal tissue (either photoreceptors or the retinal pigment epithelium), as a therapy for inherited retinal dystrophies, use adeno-associated virus (AAV)-based approaches. However, efficiency and safety of therapeutic strategies are relevant issues that are not always resolved in virus-based gene delivery and alternative methodologies should be explored. Based on our experience, we are currently assessing the novel physical properties at the nanoscale of inorganic gold nanoparticles for delivering genes to the retinal pigment epithelium (RPE) as a safe and efficient alternative approach. In this work, we present our preliminary results using DNA-wrapped gold nanoparticles (DNA-gold NPs) for successful in vitro gene delivery on human retinal pigment epithelium cell cultures, as a proof-of-principle to assess its feasibility for retina in vivo gene delivery. Our results show faster expression of a reporter gene in cells transfected with DNA-gold NPs compared to DNA-liposome complexes. Furthermore, we show that the DNA-gold NPs follow different uptake, internalization and intracellular vesicle trafficking routes compared to pristine NPs.

Keywords: gene therapy; gold nanoparticles; DNA-wrapped gold nanoparticles; ARPE-19 cells; retinal pigment epithelium; clathrin-coated vesicles; endosomal trafficking

1. Introduction

The dysfunction and death of photoreceptors are the main cause of vision loss in inherited retinal diseases (IRDs), a group of mendelian rare disorders with high genetic and clinical heterogeneity. After more than 30 years of intense clinical and genetic studies to identify IRD genes, around 300 causative genes have been identified that cause the dysfunction of photoreceptors or alter the function of the adjacent retinal pigment epithelium (RPE), thus leading to the progressive attrition of photoreceptors [1,2].

From the clinical side and most relevant to patients, the main challenge is to devise effective treatments to halt the progression of the disease or regain visual capacity. Depending on the gene and type of mutation, different molecular approaches for therapy can be devised; but, at least for autosomal recessive retinal diseases, the most straightforward strategy is the restoration of a fully functional version of the protein via DNA-based gene therapy, even though gene delivery to fully differentiated and mature cells is not an easy task [3,4]. On the other hand, the eye is an excellent target for gene therapy since it is accessible, amenable to non-invasive examination, possesses a

well-defined anatomy and is relatively immune privileged [3–5]. Ocular gene therapy for retinal disorders is starting to be developed and the first commercial gene therapy to treat a severe infantile genetic blindness (Leber congenital amaurosis caused by bi-allelic mutations in the *RPE65* gene) was approved last year. These and other ongoing therapies in different clinical trial phases are based on adeno-associated virus (AAV) vectors [6]. However, viral gene delivery also raises several concerns, such as small size capacity (maximum packaging size for 5 kb), high production costs, probability of immunogenicity and inflammatory responses and their invasive route of administration to the retina (subretinal microinjection), which have fostered basic research on non-viral vectors such as nanoparticles (NPs) for gene delivery.

NPs are highly customizable, and can be designed and optimized for cellular uptake, bypassing the degradative machinery of the cells and improving gene expression in the nucleus [7]. Although a priori NPs might yield lower transgene expression levels compared to viral vectors, they overcome most safety concerns of viral vectors, are cost-effective and easily customizable and, most relevant, have a large DNA capacity, critical for gene delivery of large ocular disease genes [4,8]. All these desirable characteristics make the study of NPs for gene delivery to ocular tissues (cornea, retina and retinal pigment epithelium (RPE)) a research priority in order to explore viable alternatives to viral vectors. Nanoparticles made from different materials that display distinct properties, such as inorganic NPs, liposomes, solid lipids and polymeric NPs, have potential use in retinal cells [3,4,9,10]. Some successful attempts using compact DNA polycationic nanoparticles for gene delivery into the retina of pre-clinical animal models have also been reported [11,12].

However, more basic research is still needed to provide a full toolbox of NPs for different uses in the retina, including gene therapy. For instance, liposomal-based NPs, particularly those with positive charges, show cytotoxicity at the large quantities required for efficient gene delivery [13]. The use of polyethylenimine (PEI)-coated NPs increases cellular uptake but PEI is also cytotoxic [3,9]. Gold NPs are mostly non-toxic, but cellular uptake strongly depends on their size and diameter. Several reports indicate that gold NPs ranging between 20 and 50 nm are non-toxic [10]. Indeed, NPs display different physicochemical properties depending on the size, shape, surface charge and hydrophilicity, and these parameters directly impact cellular uptake by different types of vesicular and non-vesicular entry pathways, thereby determining the endocytic route and the final destination of NPs. In gene delivery, the internalization of NPs through the endosomes and eventual fusion of late endosomes with lysosomes should be avoided since it involves the destruction of nucleic acids by lysosomal hydrolases before the genetic material reaches the nucleus [7,14]. Moreover, it has been shown that the lysosomal accumulation of inorganic NPs, elicited by the acidic conditions of the lysosomal cellular compartment, enhance surface instability and ion release. Intracellular ion release is responsible for the cascading events associated with nanoparticle-induced intracellular toxicity [15] and therefore, accumulation of NPs in lysosomes should be avoided.

In this work, we explored the feasibility of gene delivery in cultured differentiated RPE cells using DNA-wrapped gold NPs (DNA-gold NPs). In particular, we focused on cellular uptake and intracellular endosomal trafficking routes of pristine gold NPs and DNA-gold NPs, showing that a higher proportion of DNA-gold NPs (compared to pristine gold NPs) are internalized through clathrin-independent routes that do not end up in late endosomes, thereby avoiding lysosomal degradation. These uptake routes most probably allow faster gene delivery into the nucleus as measured by an early expression of the green fluorescent protein (GFP) reporter gene.

2. Materials and Methods

2.1. ARPE-19 Cell Culture and Differentiation Conditions

Human ARPE-19 cells, acquired from ATCC (CRL_2302), were cultured in 1:1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (ATCC, Manassas, VA, USA) and Ham's F-12 Nutrient Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (Life Technologies, Carlsbad, CA,

USA) and 1% penicillin-streptomycin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in a 5% CO₂ humidified chamber at 37 °C. For immunocytochemistry, human ARPE-19 cells (1.5 × 10⁵ cells/well) were seeded in growth medium without antibiotics onto poly-L-lysine-coated coverslips in 24-well plates. To induce differentiation, ARPE-19 cells were deprived of FBS for 48 h and maintained in a 1:1 media of DMEM and Ham's F-12 Nutrient Mix. Subsequently, 48 h post-differentiation, cells were transfected with either nanoparticles or liposomes. For dynasore treatment, the media was changed at 48 h of differentiation, cells were washed once in PBS 1×, and dynasore was added at 80 μM (final concentration) for 30 min. Cell medium was then changed and cells were immediately nanotransfected.

2.2. Lipofection

After 48 h of differentiation, cells were co-transfected with the pEGFP reporter vector (500 ng/well), using Lipotransfectine (Nitorlab, Guillena, Spain) (DNA: Lipotransfectine ratio of 1:3) in differentiation medium without antibiotics. This medium was replaced 5 h post-transfection with differentiation medium with antibiotics. After 16 h or 48 h of transfection, cells were fixed with 4% PFA for 20 min at RT and used for immunocytochemistry.

2.3. Gold NP Production and Nanotransfection

Gold nanoparticles (40 nm) at OD 1, stabilized in sodium citrate, were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) (S-741981). One hundred microliters of gold nanoparticles at OD1 were spun down and resuspended in 10 μL of Milli-Q water and mixed with 1 μL (0.250 μg/μL) of pEGFP plasmid DNA per well. Plasmid DNA-gold hybrid structures were produced by allowing conditions in which double-stranded DNA (dsDNA) loops wrap over the surface of the nanoparticle. The dsDNA-nanoparticle complexes made by this method have an excellent dispersion in different solutions from water to cell culture medium [16]. DNA-wrapped gold nanoparticles were introduced in each well with seeded cells. Photothermal plasmon resonance of the DNA-gold nanoparticles was activated by white light irradiation [17]. Cells were allowed to grow for either 2 h (for immunocytochemistry), or 16 h/48 h (for EGFP expression). For transfection efficiency studies, cells were allowed to grow for 4 h before medium was changed. The details of the wrapping reaction and cell-transfection are currently subject to a patent and published under standard free patent procedures [18].

2.4. Immunocytochemistry

After 2 h, 16 h or 48 h post-transfection with either pristine gold NPs, DNA-wrapped gold NPs or liposomes, cells were fixed with 4% PFA for 20 min at RT, washed in PBS (3 × 5 min), permeabilized in 0.2% Triton X-100 (St. Louis, MO, USA) in PBS (20 min at RT), and blocked for 1 h in 4% sheep serum in PBS. Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C in a 1:200 dilution in blocking solution (rabbit anti-GFP, rabbit anti-EEA1, mouse anti-RAB7, all from Abcam, Cambridge, UK). After incubation, coverslips with cells were rinsed in PBS 1× (3 × 5 min), incubated with the corresponding secondary antibodies conjugated to either Alexa Fluor 488, 568 or 647 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) (1:400) at RT (1 h) in blocking solution, nuclei were stained with DAPI (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) (1:1000), washed again in PBS 1× (3 × 5 min), mounted in Mowiol 4-88 (Merck, Darmstadt, Germany) and analysed by confocal microscopy and optical transmission microscopy (Zeiss LSM 880, Thornwood, NY, USA). To quantify GFP-positive cells, coverslips were visualized in a ZOE™ Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

2.5. Imaging and Statistical Analyses

Image analyses were performed using ImageJ (FIJI) software 1.52i. Stack images from five consecutive planes (0.46 μm of separation each) centred on the subcellular location with maximum vesicle intensity were retrieved, segmented in the different channels (clathrin, EEA1, RAB7 or NP), measured and analysed. In the case that the total concentration of the protein of interest had to be

determined, the fluorescence threshold value was manually selected and converted into a binary mask. Then, the binary mask of each protein was converted to area values. In the case that the area of the nanoparticles had to be determined, the threshold value was restricted to the dark spots produced by the plasmon resonance of the nanoparticles. The binary mask of NPs was superimposed over the image of interest—for example, the mask of the NP field was superimposed over the image of the clathrin-positive vesicles' signal. Then, the intersection area between the two selected channels generated a new image, of which the total intensity was determined. To calculate the percentage of NPs in each type of intracellular vesicles, the area of intersection image (e.g., NPs on clathrin-positive cells) was measured and compared to the total area covered by NPs. For statistical analysis, three independent replicates were performed per condition, and three representative different regions of interest (ROIs) per condition and replicate were quantified. Values, ratios and statistical significance were analysed using GraphPad Prism 7.03 (San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Comparison of Transfection Efficiency of Standard Liposomes Versus DNA-Wrapped Gold NPs in Differentiated ARPE-19 Cells

Differentiated cells are usually difficult to transfect by standard means even in *in vitro* cell cultures, since lipofection, electroporation or calcium phosphate-mediated transfection strongly depend on plasma and nuclear membrane composition and physicochemical characteristics, such as lability or stiffness. As a first assay, we attempted to directly compare the transfection efficiency in differentiated retinal pigment epithelium cells using GFP as a reporter gene. Dividing ARPE-19 cells (1.5×10^5 cells) were seeded in 24-well plates. The shift to DMEM minimal medium without supplementation of FBS together with cell confluence promotes differentiation to retinal pigment epithelium cells. Under those conditions, ARPE-19 cells stop dividing and in 48 h produce one cilium per cell, demonstrative of their differentiation state. At that stage, liposome-DNA complexes obtained following manufacturer's conditions (Lipotransfectine, 0.500 μg per well) and DNA-wrapped gold NPs (40 nm gold nanoparticles from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), wrapped with pEGFP plasmid DNA following the procedure stated in [18]) (0.250 μg per well) were used to transfect ARPE-19 cells. The plasmon resonance of DNA-gold NPs was activated by white light. After 16 h or 48 h post-transfection, fluorescence images were obtained in a ZOE fluorescent cell imager using the same fluorescence settings (Figure 1A,B and Figure S1). Several images were processed per well and condition and the number of green positive cells was counted manually in a total of 1100–1600 cells.

The number of transfected cells, around 1.4%, was very similar using both methods after 48 h (Figure 1C), even though the amount of DNA used was lower (half) for DNA-gold NP complexes. These results indicated that DNA-gold NPs can be used to transfect differentiated cells with a similar yield than other widely used transfection methods. Remarkably, when using DNA-gold NPs, the same percentage of transfected cells (around 1.2%) was detectable at 16 h and at 48 h, which suggested that the expression of the reporter gene was relatively fast (Figure 1C). Liposome-DNA complexes enter through clathrin-coated vesicles and after trafficking through the endosomal pathway mainly end up fusing to lysosomes (where DNA and lipids are degraded) [19–21]. Our results showing an early reporter gene expression at 16 h indicated that at least a pool of DNA-gold NP complexes might enter the cell through faster routes than clathrin-coated vesicles, thus escaping the endosomal-lysosomal pathway and reaching the nucleus in less time.

3.2. DNA-Gold Nanoparticles Enter RPE Cells by Clathrin-Mediated Vesicles and Other Cellular Uptake Routes

In order to assess whether the cellular uptake of DNA-wrapped gold NPs was clathrin-dependent or independent, we performed colocalization assays of gold NPs and DNA-gold NPs with clathrin-coated vesicles at 2 h post-transfection. Since clathrin internalization is dependent on dynamin activity for closure of the forming vesicles at the membrane, we also treated cells with dynasore for 30 min

immediately before transfection. Dynasore is a strong and irreversible inhibitor of dynamin enzymatic activity and therefore, clathrin-coated vesicles can be neither closed up nor internalized. Dynasore also affects the cell membrane stiffness and thus alters lipid raft-mediated processes [22,23].

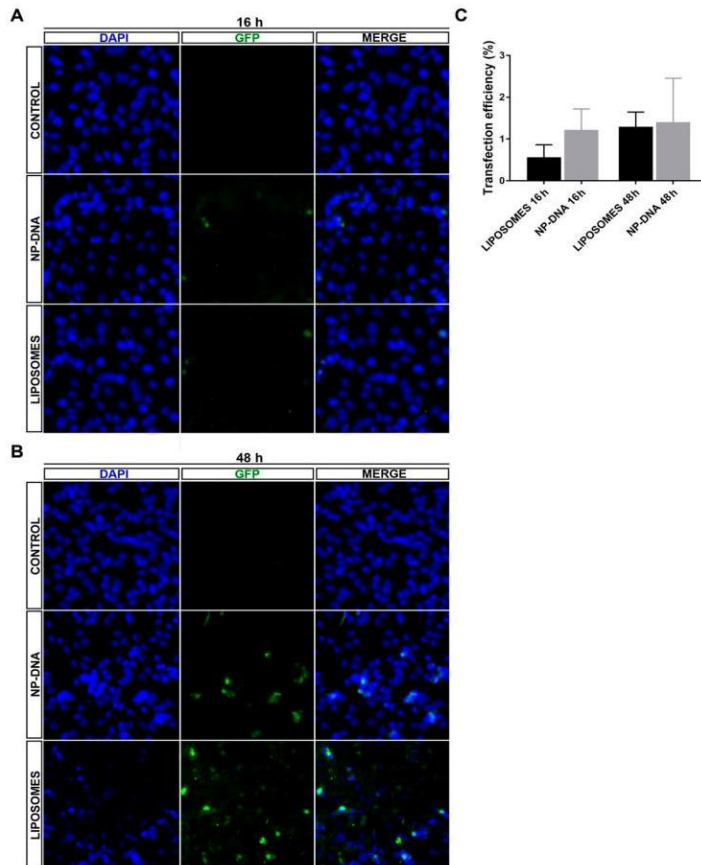


Figure 1. Analysis of transfection efficiency of DNA-wrapped gold nanoparticles (40 nm) compared to liposomes in differentiated ARPE-19 cells. Representative images of differentiated ARPE-19 cells transfected with the pEGFP reporter vector using either liposomes (LIPOTRANSFECTINE) or nanoparticles at (A) 16 h and (B) 48 h (for wider field images with a lower amplification, see Supplementary Materials, Figure S1). (C) Quantification of green fluorescent protein (GFP)-positive cells showed similar levels of transfection efficiency by nanoparticles (1.4% positive cells using 0.25 $\mu\text{g}/150,000$ cells) compared to standard lipofection (1.31% positive cells using 0.5 $\mu\text{g}/150,000$ cells) at 48 h. Remarkably, nanoparticles promoted GFP expression in transfected cells at an earlier time after transfection compared to liposomes, since at 16 h, 1.2% cells were GFP-positive in nanoparticle-transfected cells compared to 0.54% in those transfected with liposomes, thus suggesting different cellular uptake and/or intracellular vesicular trafficking routes for the two transfection systems. Quantification on 1100–1600 cells per condition.

Figure 2A shows representative images of the intracellular localization of clathrin vesicles (immunodetected in red) and NPs (detected as black dots in optic tomography field, see zoom panels) in differentiated ARPE-19 cells at 2 h post-transfection. Confocal image stacks were centred in the subcellular localization where clathrin vesicles were more prominent (relatively close to the plasma membrane). Several image masks were used to analyse the localization of NPs in the clathrin-coated

vesicles under control (panels at the left) and dynasore treatment (panels at the right) conditions. Inhibition of dynamin-mediated events by addition of dynasore was effective, since it significantly reduced the number of clathrin-coated vesicles down to 60% in control untransfected cells (Figure 2A,B).

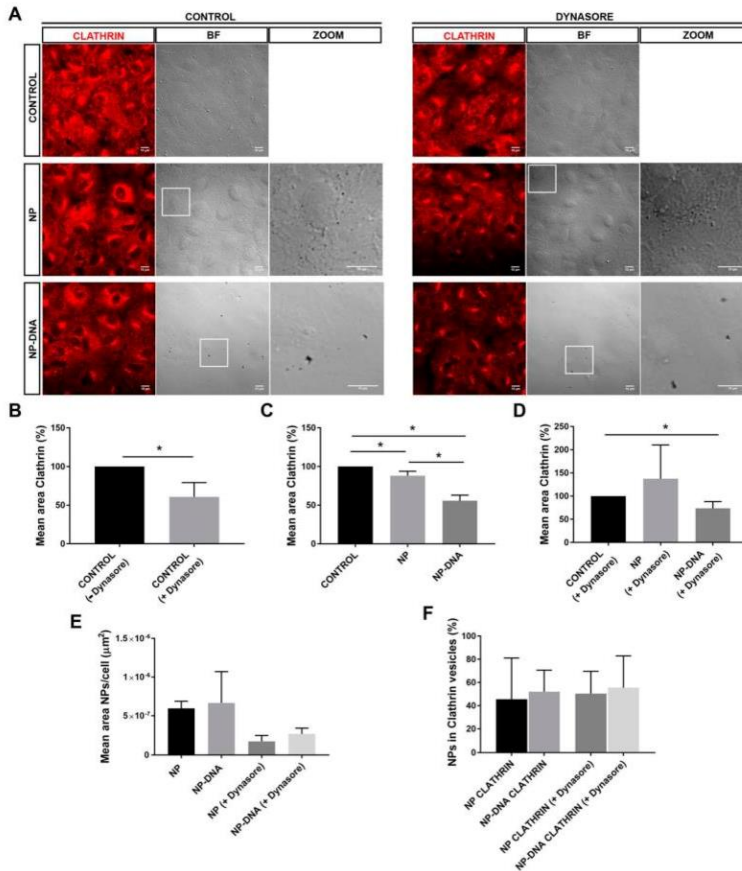


Figure 2. DNA-gold nanoparticles are uptaken by differentiated ARPE-19 cells through different vesicular and/or non-vesicular routes. (A) After 2 h post-transfection, between 40 and 60% of pristine gold NPs and DNA-wrapped gold NPs are detected in clathrin-coated vesicles. NPs are visualized as black dots in the optic transmission microscopy channel (BF-bright field, see also zoom panels). DNA nanoparticles appear in clusters compared to pristine 40 nm gold particles. Clathrin-coated vesicles are immunodetected in red. Dynasore treatment inhibited the uptake by dynamin-mediated events. Image analyses of colocalization were performed by using masks over different channels. (B) Treatment with dynasore reduced down to 60% the number of clathrin-coated vesicles in untransfected cells, after 2 h. Addition of DNA nanoparticles in either (C) control conditions or (D) with dynasore treatment significantly reduced down to 55% the number of clathrin-coated particles. (E) At 2 h post-transfection, the mean area of NPs/cell uptaken by differentiated RPE is reduced two-fold in dynasore-treated cells, reflecting that at least half of the nanoparticles are internalized by dynamin-mediated events; remarkably, the mean area of internal NPs is higher in cells transfected by DNA-wrapped NPs compared to pristine NPs. (F) Percentage of NPs/cell in clathrin-coated vesicles is highly similar in all conditions, ranging between 40 and 50%, indicating that a large pool of NPs was not uptaken by RPE cells using this route. Representative images from three independent replicates (three images per replicate and condition) were quantified. Statistical significance was analysed by the non-parametric Mann-Whitney test (* indicates $p < 0.05$).

Notably, the addition of pristine gold NPs, but particularly of DNA-gold NPs, also significantly reduced the area of clathrin vesicles down to 55% compared to control untransfected cells, which were considered the control reference (Figure 2A panels at the left, and Figure 2C), in a reduction effect similar to that caused by dynasore treatment. This reduction in the area of clathrin vesicles in cells transfected with DNA-gold NPs was also observed after treatment with dynasore (Figure 2A panels at the right, and Figure 2D). This consistent reduction in clathrin area (in all cases after correction per number of cells in each image) may reflect that at the cell–NP interface, surface properties of the DNA-gold NPs, which also differ from those of pristine gold NPs, can alter the formation in number and/or size of clathrin vesicles at the cell membrane of ARPE-19 cells.

Cell uptake of either pristine gold NPs or DNA-gold NPs (measured by the mean area covered by black dots in each image corrected per cell) was reduced, but not abrogated, after dynamin-inhibition in both cases (Figure 2E). However, the percentage of NPs colocalizing within clathrin-coated vesicles was maintained in all conditions and for both types of NPs, with no statistically significant differences (Figure 2F). Therefore, although dynasore treatment reduced the number of clathrin vesicles as well as the total amount of internalized NPs per cell, the percentage of NP uptake via clathrin by ARPE-19 cells was maintained close to 50%.

Overall, these results showed that the presence of DNA-gold NPs (40 nm diameter) altered the dynamics of the differentiated ARPE-19 plasma membrane since the area of clathrin-coated vesicles was diminished at 2 h post-transfection. The percentage of gold NPs in clathrin-coated vesicles was around 50% in all tested conditions, irrespective of the presence of the DNA wrapping and despite inhibition of dynamin activity. Therefore, at least 50% of gold NPs (40 nm), with or without DNA, could enter differentiating ARPE-19 cells through non-clathrin-mediated means.

3.3. Differences in the Intracellular Endosomal Trafficking of DNA-Wrapped Gold NPs Compared to Pristine Gold NPs in RPE Cells

Once inside the cell, clathrin-coated and other endocytic vesicles (e.g., receptor- or caveolin-mediated) enter into the dynamics of the endosomal pathway. The key internalization proteins (clathrin, receptors, caveolin) are recycled and the vesicles fuse to endosomes. Early endosomes mature into late endosomes, and this maturation process involves shifts in the protein epitopes of the endosomal membranes. Late endosomes usually fuse to lysosomes, which degrade the engulfed particles within. There are some exceptions to this endosomal trafficking pathway that leads to degradation. For instance, caveolin-mediated vesicles fuse to neutral endosomes and particles within can be liberated in the cytoplasm and bypass degradation [7,14]. Therefore, we decided to analyse the colocalization of internalized gold NPs with endosomal markers, to assess whether NPs were localized in early and/or late endosomes. After 2 h post-transfection with either pristine gold NPs or DNA-gold NPs, under control and dynamin inhibition conditions, differentiated ARPE-19 were immunodetected for EEA1 (in red) and RAB7 (in white), which are markers for early and late endosomes (Figure 3A). Confocal image stacks were selected at the internal subcellular region with an optimum detection of early and late endosomes. NPs were visualized as black dots in optic transmission microscopy. Several masks were applied to quantify mean areas of NPs and colocalization of NPs within early or late endosomes.

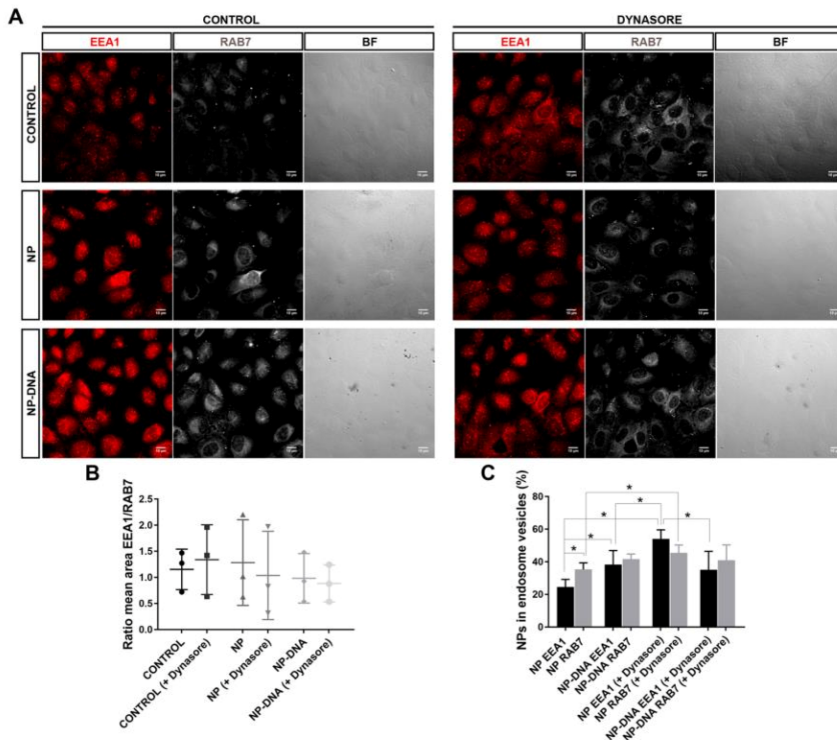


Figure 3. A significant pool of DNA-wrapped gold NPs colocalized in early and late endosomes in differentiated ARPE-19 cells. **(A)** After 2 h post-transfection, a significant pool of NPs colocalized in early endosomes (early endosome marker EEA1, in red) and late endosomes (mature endosome marker RAB7, in white). NPs are visualized as black dots in the optic transmission microscopy channel (BF). Dynasore treatment (panels at the right) was also performed to inhibit dynamin-mediated uptake events. The merge field is not shown since nanoparticles were not distinguishable on the dark background of immunofluorescent images, but image analyses of colocalization were performed by using masks over different channels. **(B)** The number of early and late endosomes was analysed as a ratio (to normalize per cell and condition). After 2 h of transfection with NPs, the ratio EEA1/RAB7 was variable but not significantly different either between cells treated with dynasore compared to controls or between control cells compared to cells transfected with pristine gold NPs or DNA nanoparticles. **(C)** Percentage of pristine NPs and DNA-nanoparticle colocalization with early or late endosomes/cell. At 2 h post-transfection, NPs showed a fluid trafficking between early and late endosomal compartments, as detected by 35% localization in late (35%) versus 25% in early endosomes. Instead, DNA NPs showed a higher localization in the endosomal compartment (close to 100%) but with a similar distribution between early and late endosomes. The addition of dynasore changed the proportion of NPs detected in early and late endosomes when analysing pristine NPs, but not when analysing DNA NPs, indicating that internalization and intracellular trafficking routes differ between pristine gold NPs and DNA NPs. Representative images from three independent replicates (three images per replicate and condition) were quantified. Statistical significance was analysed by the non-parametric Mann-Whitney test (* indicates $p < 0.05$).

First, we assessed that the ratio of early and late endosomes did not vary comparing control cells with cells transfected with either pristine gold NPs or DNA-gold NPs after 2 h post-transfection, in either normal conditions or post-treatment with dynasore (when applicable). No significant differences between the ratio of areas of total early/late endosomes per cell were observed in any tested condition and transfection, including cells treated with dynasore (Figure 3B). However, a more accurate

quantification to assess the percentage of NPs within each endosomal compartment, whether in early or in late endosomes, did show statistically significant differences (Figure 3C) when using different NPs and conditions.

Concerning pristine gold NPs, 35% localized in late endosomes and only 25% within the early endosome compartment (Figure 3C). Therefore, the amount of gold NPs that did not localize to the endosomal pathway was close to 40%. In clear contrast, DNA-gold NPs showed an equivalent distribution in both compartments, early and late, summing up to a total of 80% of NPs within the analysed endosomal compartments and 20% outside endosomes. These difference in distribution between pristine and DNA-gold NPs was statistically significant (Figure 3C).

On the other hand, the NPs trafficking through the endosomal pathway after inhibiting dynamin was also divergent between the two types of NPs. After dynasore treatment, pristine gold NPs were mainly found in the endosomal compartments (summing up to 100%), with a significant high increase in the localization within the early endosomes compared to control conditions. Cells transfected with DNA-gold NPs responded differently, since there was no significant variation between NPs localizing at early or late endosomes, rendering similar values to untreated cells, overall indicating that a pool of DNA-gold NPs did not enter through clathrin-coated vesicles. The high number of early endosomes with DNA-wrapped NPs in treated and untreated cells suggest that these particles promote an endocytosis route with a higher number of early endosomes that do not mature into the late compartment. These endosomes might release the cargo into the cytoplasm (in this case, the reporter plasmid pEGFP), which could reach the nucleus and be expressed much faster compared to the early/late endosomal trafficking followed by liposomes, as observed by the early GFP detection at 16 h when using DNA-gold NPs.

4. Discussion

Gene augmentation therapy in recessive mendelian disorders caused by loss of function mutations is, in principle, a plausible option for treatment. Addition of a wild-type copy of the gene should be effective, provided that the gene is delivered and correctly expressed at the target tissue. In IRDs, retinal degeneration is caused by mutations in either genes expressed in photoreceptors or genes expressed in the adjacent RPE, as it is the case with mutations in RPE65, MERTK or LRAT. AAV-based vectors are being used for gene delivery to photoreceptors, but non-viral vectors based on NPs should be concurrently explored for cases in which viral approaches may not be desirable [3,4,8]. Several reports have shown that RPE is particularly amenable for transfection with NPs. This apparent feasibility may be due to the phagocytic nature of RPE cells, which easily engulf and internalize photoreceptor outer segments as well as other exogenous particles [4,9]. Phagocytosis involves the formation of large vesicles, but most small particles enter the cell via pinocytosis, which involve internalization routes mediated by different protein and lipid interactions, for example, clathrin- and caveolae-mediated vesicles as well as clathrin- and caveolae-independent endocytosis [7,14]. The endocytic entry route is key to the final outcome of the internalized particles, since cargo internalized via clathrin vesicles mainly end up being degraded by the lysosome, whereas cargo internalized by caveolin-mediated vesicles or clathrin-independent routes bypass lysosomal degradation. In this context, we have explored the potential use of gold NPs to transfect RPE cells in culture, focusing on the uptake routes and the intracellular endosomal trafficking pathways.

Several authors have reported that *in vitro* biocompatibility of gold nanoparticles largely depended on their shape and size, and determined that sizes between 5 and 30 nm were more cytotoxic, even though the rate of internalization was higher than that of the less toxic NPs of 50–100 nm (reviewed in [10]). We have used NPs of 40 nm as a compromise between cytotoxicity and internalization. In addition, surface chemical modification of NPs is a critical step that decreases toxicity, increases stability, reduces aggregation and modulates cellular uptake. Most NPs use positive charges at the surface to facilitate the entry at the negatively charged cell membranes, but positively charged NPs induce cell death, whereas negatively charged surfaces induce internalization by clathrin/caveolae-independent endocytosis [7,14].

18. Trigueros, S. Nanostructure Coated with a Twist-Strained Double-Stranded Circular Deoxyribonucleic Acid (DNA), Method for Making and Use. U.S. Patent Application 20180318424, 11 August 2018.
19. Rejman, J.; Conese, M.; Hoekstra, D.J. Gene Transfer by Means of Lipo and Polyplexes: Role of Clathrin and Caveolae-Mediated Endocytosis. *J. Liposome Res.* **2006**, *16*, 237–247. [[CrossRef](#)]
20. Soriano, J.; Villanueva, A.; Stockert, J.C.; Cañete, M. Vehiculization determines the endocytic internalization mechanism of Zn(II)-phthalocyanine. *Histochem. Cell. Biol.* **2013**, *139*, 149–160. [[CrossRef](#)]
21. Agirre, M.; Ojeda, E.; Zarate, J.; Puras, G.; Grijalvo, S.; Eritja, R.; García del Caño, G.; Barrondo, S.; González-Burguera, I.; López de Jesús, M.; et al. New Insights into Gene Delivery to Human Neuronal Precursor NT2 Cells: A Comparative Study between Lipoplexes, Nioplexes, and Polyplexes. *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 4056–4066. [[CrossRef](#)]
22. Girard, E.; Paul, J.L.; Fournier, N.; Beaune, P.; Johannes, L. The Dynamin Chemical Inhibitor Dynasore Impairs Cholesterol Trafficking and Sterol-Sensitive Genes Transcription in Human HeLa Cells and Macrophages. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e29042. [[CrossRef](#)]
23. Preta, G.; Cronin, J.G.; Sheldon, I.M. Dynasore—not just a dynamin inhibitor. *Cell Commun. Signal.* **2015**, *13*, 24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zhang, J.; Chang, D.; Yang, Y.; Zhang, X.; Tao, W. Systematic investigation on the intracellular trafficking network of polymeric nanoparticles. *Nanoscale* **2017**, *9*, 3269–3282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Annex Capítol 3

Entrega de DNA en òrgans en cultiu mitjançant
nanopartícules d'or

3.1. Eficiència de transfecció en cultius primaris organotípics de retina emprant nanopartícules d'or com a vector d'entrega de DNA

ANTECEDENTS

Malauradament, encara no existeix una teràpia efectiva per a totes les cegueres hereditàries. La teràpia gènica, sola o combinada amb la teràpia cel·lular, és la única opció de tractament per tots aquells individus que pateixen una distròfia de retina hereditària. Actualment, hi ha diversos assajos clínics de teràpies per a malalties de la retina realitzades majoritàriament amb virus adeno-associats com a vectors per a l'entrega del gen terapèutic en teràpies d'addició gènica, o amb oligonucleòtids antisentit nus en teràpies gèniques post-transcripcionals. De fet, una de les teràpies, basada en l'addició del gen *RPE65* mitjançant AAVs per transfectar cèl·lules de l'RPE de pacients afectats per mutacions bi-al·lèliques en aquest gen, ha estat desenvolupada per *Spark Therapeutics* i comercialitzada a Europa per Novartis. Malgrat que aquest èxit i el d'altres teràpies que estan en procés de desenvolupament aporten esperança a molts pacients, encara queda un llarg camí per recórrer ja que hi ha més de 300 gens que quan estan mutats causen malalties de la visió, i la teràpia gènica és específica de gen i, en alguns casos, específica de mutació.

Un dels inconvenients de l'ús dels virus o molècules inorgàniques per alliberar gens dins les cèl·lules és la seva toxicitat, o la possible resposta immunogènica que desencadenin per part del pacient (tot i que la barrera hematoretiniana ofereix una certa contenció a l'ull). Per aquest motiu, i tenint en compte l'èxit en l'alliberament d'unes nanopartícules d'or *in vitro* (Article presentat en aquest Capítol) en cèl·lules en cultiu de l'RPE, que són una de les dianes terapèutiques a la retina, vam decidir provar la capacitat d'alliberament de càrrega gènica d'aquestes nanopartícules de forma *ex vivo* en cultius primaris organotípics de retina de ratolí.

RESULTATS

Eficàcia de transfecció amb les DNA-NP d'or en cultius primaris organotípics de retina de ratolí

Els explants de retina són una tècnica emprada per treballar amb retines senceres i vives de manera *ex vivo* (Figura 27). Aquesta tècnica permet manipular i treballar amb la retina de manera que les cèl·lules retinals tenen el context tissular, tot i que no es trobin dins de l'organisme. Els explants es cultiven en un medi ric en una placa de cultiu cel·lular sobre un *transwell*, una membrana porosa, que permet que arribin els nutrients necessaris per capil·laritat sense que l'explant quedi inundat. La col·locació de la retina sobre el *transwell* és essencial, ja que els fotoreceptors s'han d'orientar cap amunt per afavorir la supervivència. Aquest tipus de cultiu presenta un límit de supervivència, que és d'aproximadament 72h, però que és suficient per poder transfectar les NPs d'or i determinar si són capaces d'entrar dins del teixit i expressar la càrrega gènica. Després de la prova en cèl·lules *in vitro*, ens vam proposar determinar si era possible transfectar les neurones de la retina quan estan formant un teixit, ja que són un tipus cel·lular diferenciat i complex. Aconseguir l'entrada i expressió de càrrega gènica mitjançant les NPs d'or podria ser un pas endavant per trobar un vehicle per a la teràpia gènica no invasiu.

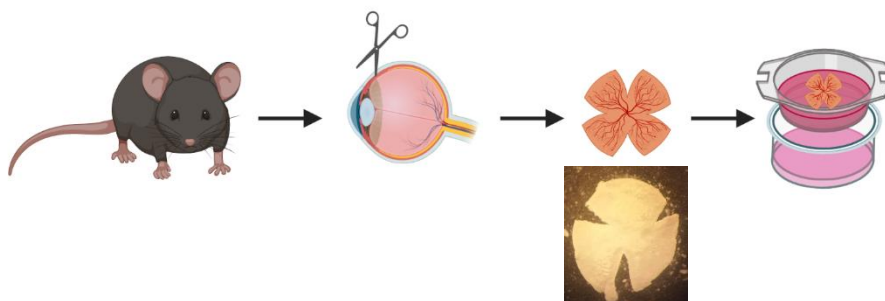


Figura 27. Representació esquemàtica per obtenir explants de retina. En primer lloc s'eutanàsia al ratolí i s'extreu l'ull sencer, seguidament es talla l'ull per l'ora serrata i s'extreu el cristal·lí. A continuació, aplicant pressió per la part posterior de l'ull s'extreu la retina sencera sense l'epiteli pigmentari. Finalment es realitzen un talls per aplanar la retina, que queda en forma de flor, i es col·loca sobre el *transwell*.

Es van realitzar tres replicats de l'experiment de transfecció d'explants amb NPs d'or de 40 nm amb el plasmidi pEGFP-N2 com a càrrega gènica demostrant que, a partir de les 24h post-transfecció, les DNA-NP d'or són capaces d'entrar a la retina –un teixit sencer, organitzat i complex, format per neurones diferenciades– i el plasmidi amb el gen reporter (pEGFP-N2) és alliberat i expressat amb èxit (Figura 28). Aquests resultats posen de manifest la rapidesa d'entrada de les DNA-NPs d'or a les cèl·lules que estan formant un teixit (ja que normalment es necessita més temps, al voltant de >36 hores per a una detecció de GFP elevada).

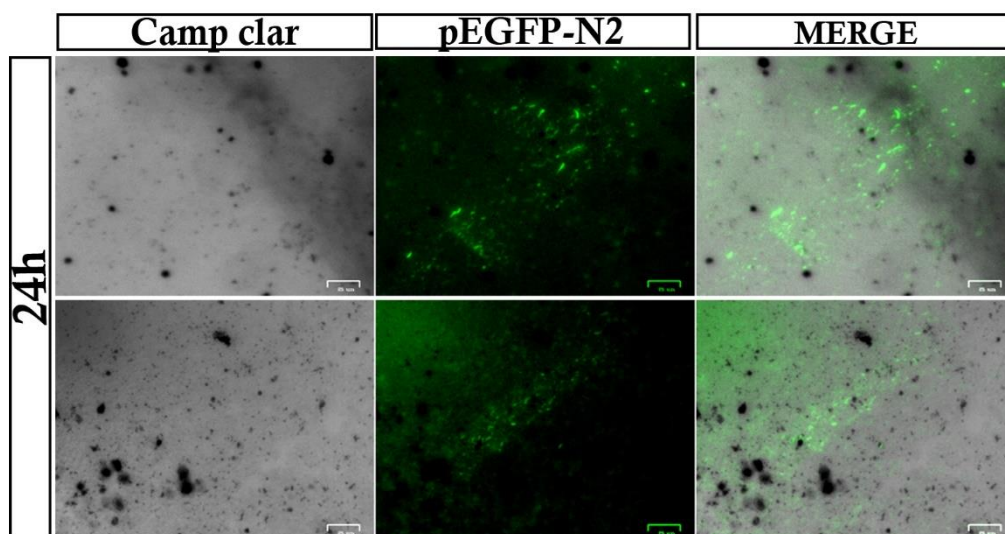


Figura 28. Imatge representativa de les nanotrasfeccions amb DNA-NPs d'or en cultius primaris organotípics de retina de ratolí. Es poden observar àrees de la retina on les DNA-NPs d'or han alliberat la càrrega gènica, en aquest cas el plasmidi pEGFP-N2, de forma que aquesta proteïna s'ha pogut expressar en aproximadament 24h.

No es va detectar una afectació de la viabilitat cel·lular, pel que aparentment, les DNA-NPs d'or no semblen presentar toxicitat, almenys a curt termini. Caldria efectuar assajos de viabilitat i supervivència a més temps per a determinar si les partícules d'or podrien generar algun tipus de toxicitat retardada.

Preferència cel·lular de les DNA-NPs d'or a la retina

La retina és un teixit amb diferents tipus neuronals i a l'observar que les NPs eren capaces de penetrar dins del teixit i expressar la càrrega gènica, vam proposar-nos determinar si les NPs d'or entraven indiferentment a tots els tipus cel·lulars, o tenien algun tipus de preferència. Endemés, vam decidir provar diferents tipus de condicions de nanotransfecció per determinar si en el teixit, la llum també activa la ressonància plasmònica de les NPs causant que la seva entrada sigui major.

Únicament vam realitzar un replicat i vam utilitzar 5 explants diferents i cada un va ser sotmès a una condició diferent de nanotransfecció: 1) un control de condicions basals, que no vam nanotransfectar; 2) un segon control transfectant pEGFP-N2 sense les nanopartícules per comprovar si el DNA nu, sense un vector físic, tenia capacitat d'entrar a les cèl·lules del teixit; 3) nanotransfecció amb el plasmidi en condicions normals; 4) i 5) les dues condicions següents es van realitzar, una en foscor i l'altra, aplicant un pols de llum durant 2 minuts ja que, com s'ha descrit a l'article presentat a l'inici del Capítol 3, la llum activa la ressonància plasmònica de les nanopartícules i pot millorar l'eficiència d'entrada.

Els resultats obtinguts en aquest experiment no solament suporten els resultats que ja havíem obtingut *ex vivo* sobre els explants, és a dir, que les DNA-NP d'or són capaces d'entrar en un teixit diferenciat i entregar el DNA que serà expressat, sinó que a més, quan són activades per la llum, millora molt notablement la seva capacitat de penetració. Addicionalment, podem observar que la majoria de cèl·lules nanotransfectades colocalitzen amb els cons, marcats amb PNA, el que suggereix que, tant la membrana dels cons com la superfície de les DNA-NPs d'or, presentarien unes característiques que n'afavoririen l'entrada (Figura 29).

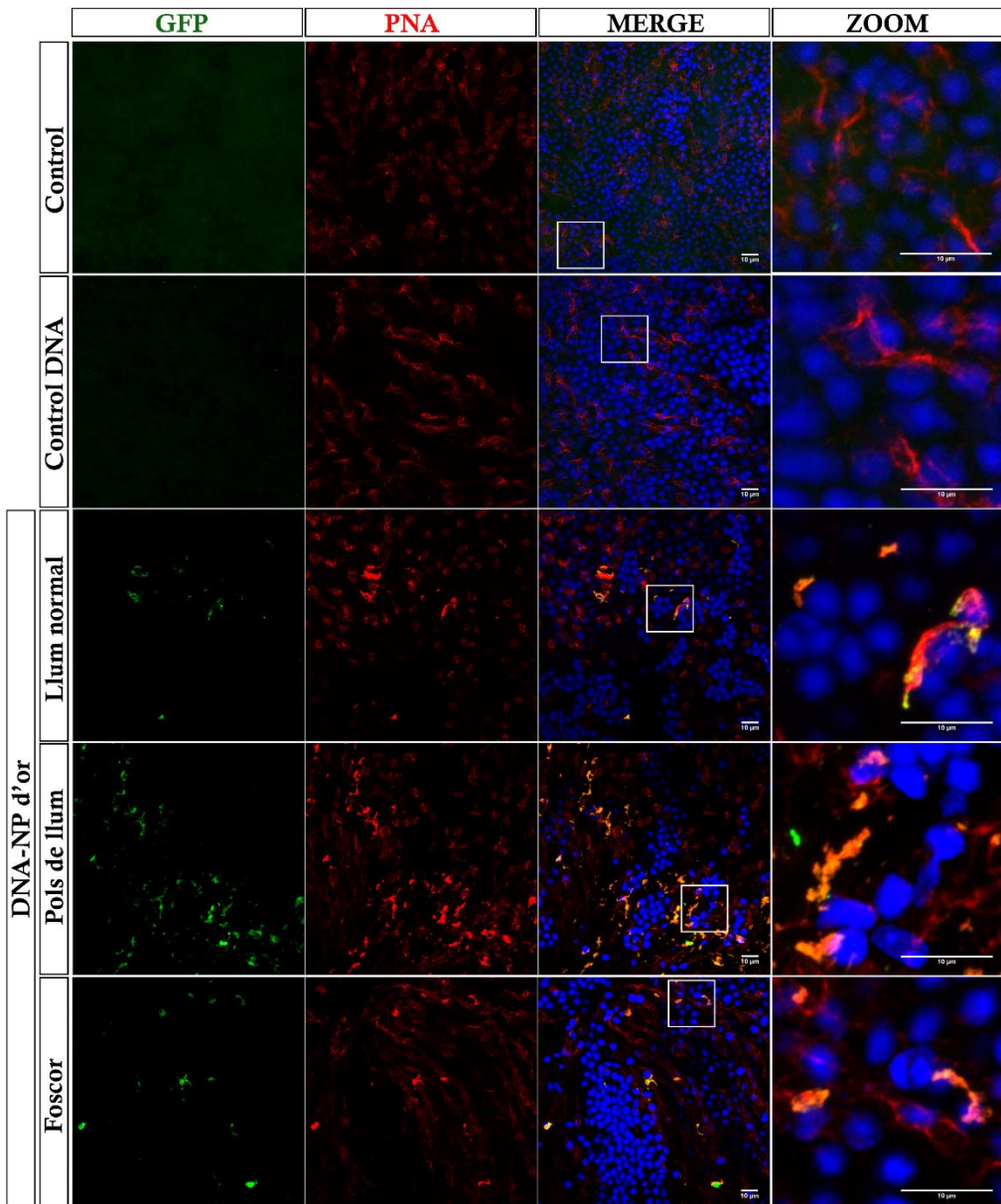


Figura 29. Immunohistoquímica d'explants de retina nanotransfectats amb DNA-NPs d'or. Control: Sense DNA ni NPs. Control DNA: Transfectades amb DNA, però sense NPs. Llum normal: Transfectades amb DNA-NPs d'or en condicions normals de llum. Pols de llum: Transfectades amb DNA-NPs d'or en condicions normals de llum, però després d'afegir les DNA-NPs d'or, es fa un pols de llum blanca de 2 minuts. Foscor: Transfectades amb DNA-NPs d'or en condicions de foscor. S'observa que hi ha una major proporció de cèl·lules transfectades després del pols de llum. En tots els casos s'observa una major colocalització de GFP amb PNA (marcador de cons), indicant una certa preferència de les DNA-NPs d'or per als cons. Els nuclis estan marcats amb DAPI.

Malgrat que caldria realitzar més replicats, aquests resultats revelen l'elevat potencial d'aquestes DNA-NPs d'or per ser optimitzades i utilitzades com a futura teràpia en distròfies de retina hereditàries. Arribats a aquest punt, el següent pas seria provar d'alliberar CERKL-GFP per comprovar si el nostre gen d'interès és capaç de ser introduït dins les cèl·lules fotoreceptores mitjançant aquest sistema i comprovar-ne la seva expressió. Un cop aconseguida aquesta fita, el següent pas seria intentar realitzar un rescat en el model murí que hem generat per comprovar que realment aconseguim una millora fenotípica a la retina d'aquests animals. Evidentment, caldria molta més recerca per esbrinar quin és l'efecte de les NPs d'or un cop alliberat el DNA, i com és excretat de les cèl·lules, si poden ser fagocitades per l'RPE i expulsades via endoteli a la sang, o si s'acumulen, abans de pensar en un possible ús com a futur vector per a teràpia gènica.

Finalment, ja que teníem la tècnica de cultius d'RGCs posada a punt i que les DNA-NPs d'or són capaces de ser nanotransfectades en cèl·lules ARPE-19 en cultiu i en explants de retina, vam pensar en transfectar les NPs en RGCs i comprovar si érem capaços de nanotransfectar neurones retinals aïllades, a més de comparar l'eficiència d'expressió del gen reporter amb les tècniques de transfecció amb lipoplexes i l'electroporació. Els cultius d'RGCs són cultius primaris, pel que serien un terme entremig entre les cèl·lules immortalitzades que ja hem vist en l'article presentat en aquest Capítol i els explants. A més, podrien ser receptives a la nanotransfecció, considerant que aquest sistema sembla ser més eficient que els lipoplexes en cultius organotípics, com els explants, on pot entregar la càrrega gènica alliberada per les NPs.

Vam realitzar diversos intents de nanotransfecció, electroporació i transfecció amb lipoplexes en cultius primaris d'RGCs però malauradament en cap dels casos vam aconseguir expressar el gen reporter en RGCs, únicament la glia present al cultiu es transfectava. A més, en el cas de l'electroporació la mortalitat de les RGCs augmentava molt significativament. Pel que fa a la nanotransfecció vam provar de

nanotransfectar quan les cèl·lules encara no estan enganxades a la placa i a 3 dies de diferenciació *in vitro*, però en cap dels tres casos vam obtenir resultats positius.

Es probable que al ser un cultiu primari de cèl·lules aïllades ja diferenciades i complexes tinguin unes propietats de membrana diferents a quan es troben en el context del teixit, tot i ser *ex vivo* com són els explants. Per tal de fer comparacions d'eficiència i tenint en compte que la nanotransfecció en explants és possible que realitzem aquest experiment en explants. Així com, també comprovarem si altres tipus cel·lulars de la retina com les RGCs són capaces d'expressar el gen reporter alliberat per les NPs dins del teixit i no solament els fotoreceptors.

Per últim, vam nanotransfectar el cultiu organotípic i al cap de 48h vam disgregar-lo i cultivar una porció per obtenir cèl·lules ganglionars, però tampoc en vam trobar cap que expressés el gen reporter. En aquest cas, és lògic pensar que la probabilitat de cultivar justament aquelles que són fluorescents en un cultiu de nombre limitat de cèl·lules a l'atzar és poc probable. Per aquest motiu, un possible abordament seria realitzar la nanotransfecció en el cultiu organotípic i a les 24-48h quan ja hi ha expressió del gen reporter separar aquelles cèl·lules GFP+ per citometria de flux i cultivar-les per, posteriorment, amb una ICC determinar de quin tipus cel·lular es tracta.

ANNEX CAPÍTOL 3 - MATERIALS I MÈTODES

Preparació de les DNA-NPs d'or de 40 nm

La preparació de les NPs amb DNA es troba en aquests moments sota patent. Les quantitats de NPs i DNA, així com la referència de la patent, es troben descrites en l'article presentat en aquest Capítol.

Cultius primaris organotípics de retina de ratolí

Es va realitzar el mateix protocol que el de l'article "*A new Cerkl mouse model generated by CRISPR-Cas9 shows progressive retinal degeneration and altered morphological and electrophysiological phenotype*" presentat al Capítol 1 d'aquesta Tesi, excepte per la tinció que es descriu en IHC d'aquest apartat.

Nanotransfecció en cultius primaris organotípics de retina de ratolí

Es dipositen retines de ratolins silvestres senceres i planes amb els fotoreceptors orientats cap a munt sobre una membrana d'un *transwell* per a cultiu de cèl·lules (Millicell® cell Culture Inserts 0,4 µm, 30 mm de diàmetre Millipore) que s'introdueixen sobre una placa de cultiu cel·lular de 6 pous amb 2 mL de medi de cultiu Neurobasal®-A (Gibco), suplementat amb penicil·lina/estreptomicina 1x (BioWest), L-glutamina 1mM (Gibco), D-glucosa 0,06% (Sigma), bicarbonat sòdic 0,0045% i B27® 1x (Gibco) i s'incuba durant 3 hores a 37°C i 5% CO₂. Transcorregut aquest temps, s'afegeixen 20 µL de DNA-NPs d'or (nanopartícules carregades amb el plasmidi pEGFP-N2) sobre els explants. En alguns casos van ser afegides en condicions de baixa intensitat de llum seguit de fosc (es va cobrir la placa amb paper d'alumini per evitar l'entrada de llum); en altres, es van afegir en condicions normals de llum, i en una última condició, es va donar un pols de llum blanca durant 2 minuts, després d'afegir les DNA-NPs. Finalment, es van incubar durant 24h a 37°C i 5% CO₂.

Immunohistoquímica (IHC)

Es col·loca l'explant sobre d'un portaobjectes amb els fotoreceptors orientats cap a munt, i es fixa amb una solució de 4% de PFA en PBSx1 durant 1h a temperatura ambient. Seguidament, es realitzen tres rentats de 5 minuts amb PBS 1x i es bloqueja amb una solució de PBS 1x amb 2% de sèrum d'ovella (*Sheep serum*) i 0,3% de Tritó X-100 durant 1h a temperatura ambient. Seguidament s'incuba amb l'anticòs

primari α GFP (1:500 Abcam ab290) durant 90 minuts. A continuació es realitzen tres rentats de 5 minuts amb PBS 1x i s'incuba amb PNA-conjugat a Alexa Fluor 647 (1:50 ThermoFisher) per marcar els cons, i l'anticòs secundari α -Rabbit conjugat a Alexa Fluor 488 (ThermoFisher) durant 90 minuts a temperatura ambient. Finalment, es realitzen 3 rentats de 5 minuts amb PBS 1x i s'afegeix un cobreobjectes amb medi de muntatge Fluoprep (bioMèrieux).

Cultius primaris de cèl·lules ganglionars de la retina

Es va realitzar el mateix protocol que el de l'article "*A new Cerkl mouse model generated by CRISPR-Cas9 shows progressive retinal degeneration and altered morphological and electrophysiological phenotype*" presentat al Capítol 1 d'aquesta Tesi, excepte que en aquest cas, es van utilitzar retines d'embrions E16.

Nanotransfecció amb NPs d'or de 40 nm, electroporació i transfecció amb lipoplexes de RGCs de retina de ratolí E16

Per nanotransfectar amb DNA-NPs els cultius d'RGCs es van sembrar de 50.000-100.000 cèl·lules per pou i es va deixar que les cèl·lules sedimentessin al fons de la placa. Per la nanotransfecció de cèl·lules en suspensió, se'ls va afegir directament les NP-DNA i al cap de 30 minuts se'ls hi va aplicar el pols de llum. Per la condició de cèl·lules enganxades, es van deixar diferenciar durant 3 dies *in vitro* i se'ls va afegir les NP-DNA seguit del pols de llum.

Pel que fa a l'electroporació entre 50.000-100.000 cèl·lules RGCs van ser electroporades amb el *Neon*® *Transfection System* (Invitrogen), seguint les instruccions del fabricant. Es van utilitzar 16 μ g del plasmidi pEGFP-N2 en un volum final de 15 μ L de *Buffer R* per electroporació, i una configuració de l'electroporador de 800 V, 50 ms i 5 polsos. Finalment, es van plaquejar les cèl·lules ganglionars i es van deixar en cultiu durant 7 dies.

La transfecció mitjançant lipoplexes de DNA es va realitzar als 3 dies de diferenciació *in vitro*. En primer lloc es van incubar 800 ng del plasmidi pEGFP-N2 en 2 µL de *Lipofectamine*®2000 (Invitrogen) en un total de 100 µL de medi òptim durant 20 minuts. Seguidament es va afegir la barreja a les cèl·lules en cultiu i es va deixar durant 20 minuts. Transcorregut aquest temps, es va canviar el medi per evitar la mort de les neurones i es van deixar en cultiu fins a 7 dies.

Microscòpia confocal

Les imatges van ser obtingudes al microscopi confocal (Zeiss LSM 880, Thornwood, NY, USA) i al microscopi ZOE™ Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Discussió

Per què el *knockout* de *Cerkl* és letal per l'organisme?

La generació d'un model *knockout* de *Cerkl* és crucial per tal d'estudiar la seva funció. Diferents investigadors, incloent-hi el nostre grup de recerca, han intentat prèviament generar un model *knockout* però, malauradament, en tots els casos ha estat impossible degut a la complexitat transcripcional de *Cerkl* [181], [239]. Com ja s'ha comentat, un primer model generat per un altre grup en que es va deleccionar l'exó 5 del gen no va mostrar cap alteració en la fosforilació d'esfingolípid ni, aparentment, tampoc a la retina, tot i que cal dir que no es va publicar cap imatge de la retina ni es va fer un estudi en animals d'edat avançada [180]. El model previ a aquesta Tesi que es va generar al nostre grup anava dirigit a aconseguir el *knockout* total o condicional (mitjançant cre/loxP) mitjançant la deleció del promotor proximal i del primer exó. Tot i així, es va descobrir que hi romanía una expressió del 40% de *Cerkl* mitjançant l'ús alternatiu d'un promotor més a 5', el del gen *NeuroD1*. Aquest nou model, més un *knockdown* que un *knockout*, es va anomenar *Cerkl^{KD/KD}* i tampoc no mostrava alteracions morfològiques aparents a la retina (ni en ratolins joves ni vells), únicament es va observar un desplaçament moderat en l'electrofisiologia dels potencials oscil·latoris de les cèl·lules ganglionars, indicant que aquestes cèl·lules podien estar alterades [181]. En tots dos models, romanía expressió de *Cerkl*, ja que s'expressaven algunes de les isoformes produïdes pel gen encara que alguns dominis proteics no hi fossin presents.

Donat que fins el moment d'inici de la Tesi encara no s'havia aconseguit generar un model murí *knockout* de *Cerkl* que presentés degeneració de la retina, i que les mutacions en aquest gen són una de les causes més prevalents d'RP i CRD a Espanya, vam decidir generar un model de ratolí *knockout* de *Cerkl* per deleció total del locus, mitjançant la tècnica d'edició gènica CRISPR/Cas9. Malauradament, la deleció completa del locus *Cerkl* no és viable en homozigosi, però això no ens indica si la letalitat és deguda a la deleció del locus o del gen. A continuació, vam generar

una aproximació a un model *knockout*, el doble heterozigot *Cerkl*^{KD/KO}, mitjançant encreuaments amb el model *knockdown* anterior [181]. Aquest nou model presenta una expressió de *Cerkl* menor al 10% (només algunes isoformes hi són expressades) i, fenotípicament, mostra una degeneració progressiva de retina ja que, mentre animals amb edats d'entre 6-10 mesos no se'ls troba afectació, en ratolins d'edats més avançades, d'entre 12-18 mesos, sí s'observen alteracions a la retina (Figura 30). Aquest model mimetitzava la degeneració progressiva que s'observa en humans amb mutacions a *CERKL*, ja que l'al·lel més freqüent és relativament hipomorf (p. R283*, com ja hem comentat), i la majoria de pacients són o bé homozigots o dobles heterozigots amb aquest al·lel. Depenent de la combinatòria de les mutacions la severitat del fenotip varia, així com el diagnòstic, essent RP o CRD, però la relació genotip-fenotip no és gens clara, ja que pot variar entre humans homozigots per aquesta mutació, fins i tot, dins de la mateixa família [74], [277], [278], el que apunta a la contribució de gens modificadors del fenotip. El nostre model murí, comparat amb les mutacions humanes descrites fins el moment, semblaria mostrar semblances a nivell genètic amb la mutació c. 238+1 G>A identificada en una població iemenita, que afecta a la regió donadora d'*splicing* de l'exó 1 [38] i, per tant, totes les isoformes provinents del promotor proximal de *CERKL* no es poden generar, al igual que succeeix en el nostre model, ja que presenta una deleció completa d'un al·lel i en l'altre una deleció del promotor proximal i l'exó 1. De fet, el model *Cerkl*^{KD/KD} en homozigosi també hauria d'assimilar-se des del punt de l'efecte molecular. Tant pels pacients humans, com pel nostre model, les isoformes de *CERKL* que es generen són aquelles que provenen del promotor de *NeuroD1* però, en canvi, la severitat i el temps de detecció del fenotip és molt diferent. Mentre que els humans amb aquesta mutació mostren un fenotip sever de ràpida aparició i amb una greu afectació macular, els ratolins del nostre model presenten una afectació lenta i progressiva de degeneració de la retina. Aquestes diferències fenotípiques en la severitat entre humans i ratolins amb alteracions genètiques semblants posa de manifest la dificultat de generar un model murí que mimetitzi l'efecte d'una mutació de

neurodegeneració progressiva, perquè els temps de desenvolupament i progressió d'una malaltia respecte la longevitat màxima entre humans i ratolins són molt diferents.

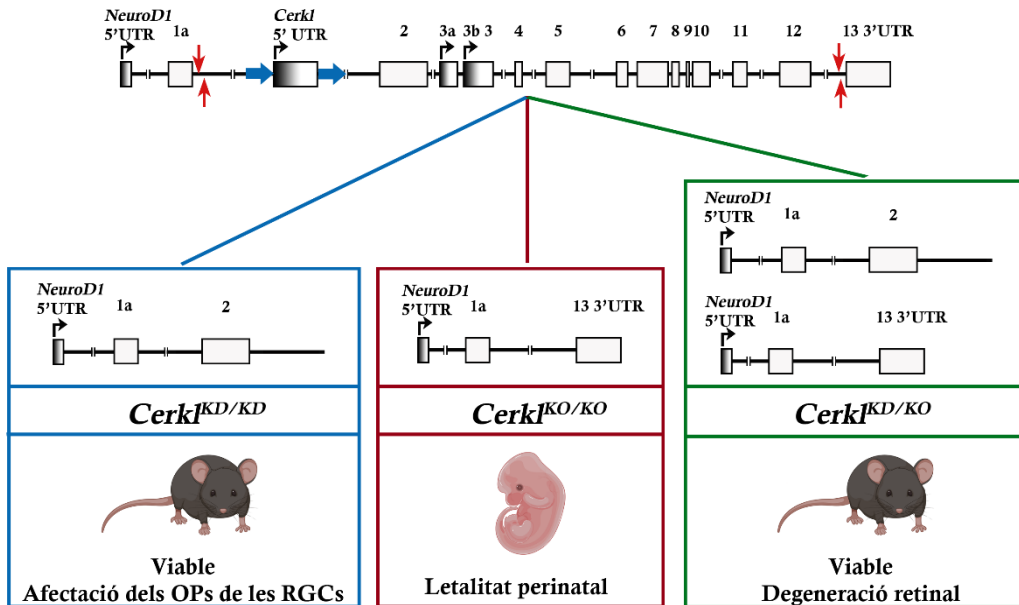


Figura 30. Representació esquemàtica dels models murins de *Cerkl* generats i l'afectació fenotípica que presenten. A la zona superior s'indica l'organització genòmica de *Cerkl* (no està a escala), amb la posició dels exons (rectangles blancs), diferents TSS (rectangles en degradat). Les fletxes blaves indiquen la localització de les seqüències loxP, i les fletxes vermelles verticals, la localització de la seqüència PAM reconeguda pel sistema CRISPR/Cas9. **OPs:** Potencials oscil·latoris. **RGCs:** Cèl·lules ganglionars de la retina.

La letalitat causada per l'abrogació total de *Cerkl* podria ser una letalitat deguda a la deleció del gen o per la deleció del locus, és a dir, la deleció de *Cerkl* és letal perquè la funció d'algunes isoformes de CERKL estan directament lligades a la viabilitat de l'organisme o bé, perquè dins del locus de *Cerkl* s'hi localitzen regions reguladores essencials per a l'expressió d'altres gens, vitals per a l'organisme. *Cerkl* està expressat ubiqüament, incloent-hi òrgans vitals [33], [39] pel que la letalitat causada per l'ablació completa del propi gen no pot ser descartada. D'altra banda, s'han descrit elements reguladors, del tipus *enhancer*, en *cis* dins del locus humà de *CERKL* (Taula

6), seqüències que han estat descrites funcionalment en línies cel·lulars humanes (<https://www.genecards.org/> i <https://genome.ucsc.edu/>), i que podrien regular tant l'expressió del gen *CERKL* com del gen *NEUROD1*.

Taula 6. *Enhancers* localitzats dins del locus de *CERKL* que podrien regular l'expressió tant de *CERKL* com de *NEUROD1*.

Enhancer/ Promotor*	Localització	Conservació	Mostres
GH02H181655 * <i>Super-enhancer</i>	chr2:181655555- 181657417 → Intró 1.	Semiconservat	TAD 18/20
GH02H181586 <i>Super-enhancer</i>	chr2:181586714- 181586863 → Intró 2.	Altament conservat	TAD 8/20
GH02H181629 Pertany a 2 <i>super-enhancers</i>	chr2:181629630- 181629974 → Intró 1.	Conservat	TAD 12/20
GH02H181615 Pertany a 2 <i>super-enhancers</i>	chr2:181615268- 181615508 → Intró 1.	Altament conservat	TAD 12/20
GH02H181619 Pertany a 2 <i>super-enhancers</i>	chr2:181619295- 181620804 → Intró 1.	Conservat	TAD 12/20
GH02H181572	chr2:181572784- 181572798 → Intró 3	Semiconservat	TAD 5/20
GH02H181554	chr2:181554162- 181554554 → Intró 6	Altament conservat	TAD 5/20

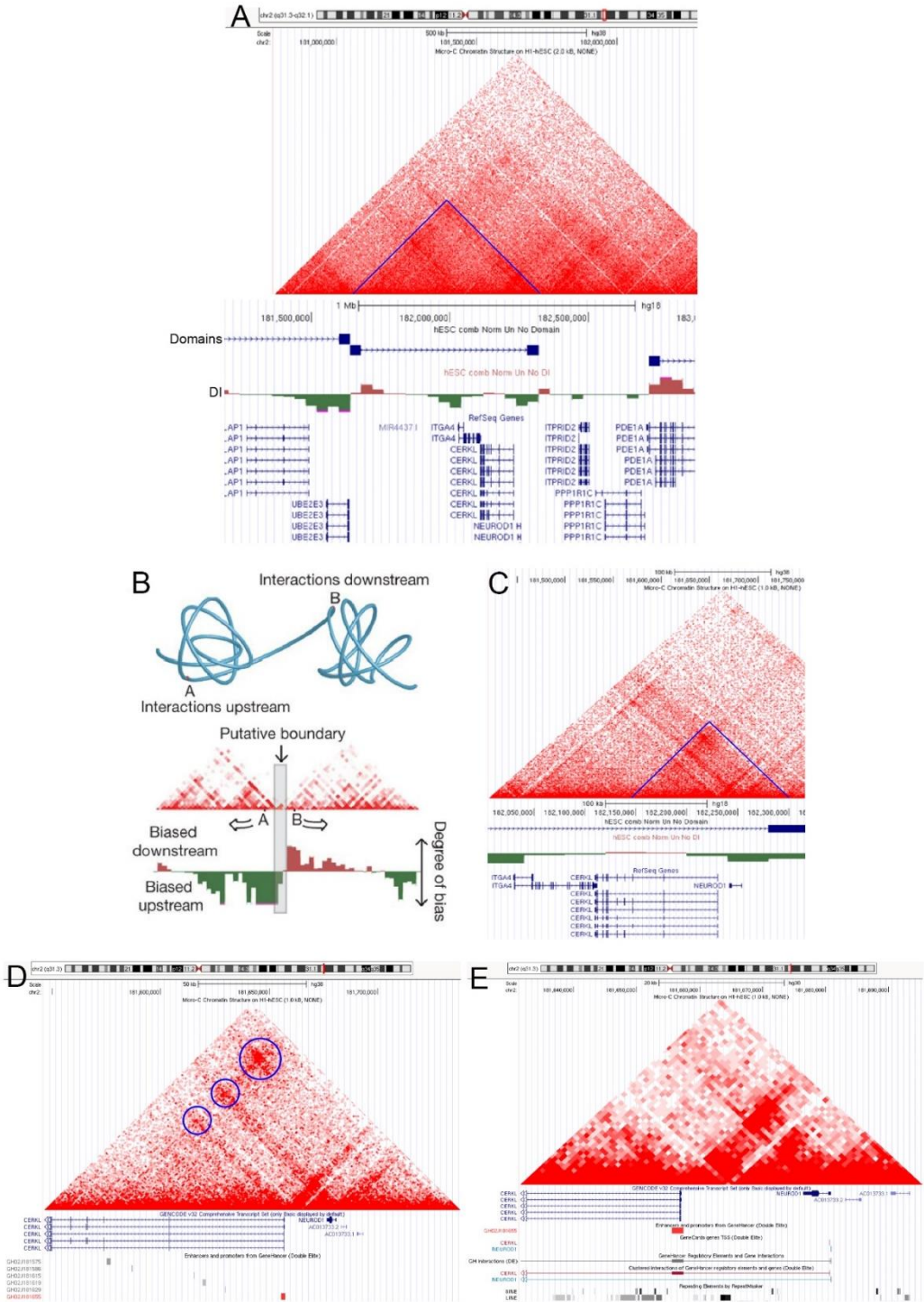
Chr: Cromosoma, **TAD:** Domini associat topològicament.

Si realitzem un estudi *in silico* de les interaccions de la cromatina a la regió genòmica de *CERKL* observem que el domini del locus de *CERKL* inclou els loci de *NEUROD1* i *ITGα4*. De fet, els gens *CERKL* i *ITGα4* es transcriuen a partir de cadenes complementàries i les seves regions 3' UTR es troben solapades. El biaix al final del domini no és pronunciat i altres bases de dades (<http://3dgenome.org>) consideren que el domini acaba allà on comença el següent (Figura 31A). L'índex d'interacció (DI) és una mesura estadística del grau del biaix d'interacció *upstream* o *downstream*

per a una regió genòmica. Amb els DI i un model de Hidden Markov s'inferí la localització dels dominis topològics (Figura 31B) [279].

Quan ens centrem en la regió de *CERKL*, les interaccions entre *CERKL* i *NEUROD1* són visibles al *heatmap* i els DI no mostren un biaix significatiu per a considerar-lo un subdomini (Figura 31C). La magnificació revela que la regió que conté els exons 3 i 4 de *CERKL* està interaccionant amb tres regions diferents: i) el promotor proximal de *CERKL*, ii) el promotor proximal de *NEUROD1* i, iii) i amb el final del domini descrit (Figura 31D). Finalment, el promotor proximal de *CERKL* es troba interaccionant amb la regió promotora de *NEUROD1*. Existeix una regió aïllada sense contactes en el *heatmap*, que coincideix amb un LINE (*long interspersed nuclear element*), un retrotransposó sense LTRs, i una regió altament metilada (Figura 31E).

La conservació en l'evolució d'aquests *super-enhancers* en els genomes dels vertebrats, concretament els GH02H181586, GH02H181615 i GH02H181554, remarca la seva importància (Figura 31F). Cal recordar que el gen *CERKL* és una innovació del llinatge dels vertebrats, no existeix cap ortòleg en genoma d'invertebrats i el locus que comprendria els dos gens adjacents no està disposat de la mateixa manera. *NeuroD1* és un factor de transcripció neural i pancreàtic implicat en la regulació del cicle cel·lular, la gènesi de les cèl·lules de la retina i el desenvolupament neuronal [200], [280], i els ratolins que no expressen *NeuroD1* moren pocs dies després del naixement a causa d'una diabetis severa [281]. Arrel de l'observació que la deleció de *Cerkl* causa una davallada significativa en l'expressió de *NeuroD1*, una possible explicació per la letalitat causada per la deleció de *Cerkl* en homozigosi podria ser provocada tant per la pèrdua directa de *Cerkl* en òrgans vitals com el fetge o els pulmons i per la notable reducció en l'expressió de *NeuroD1* causada per la deleció dels seus *enhancers*. Val a dir que s'haurien de trobar més evidències per acabar de demostrar les causes de la letalitat associada a la deleció del locus de *Cerkl*.



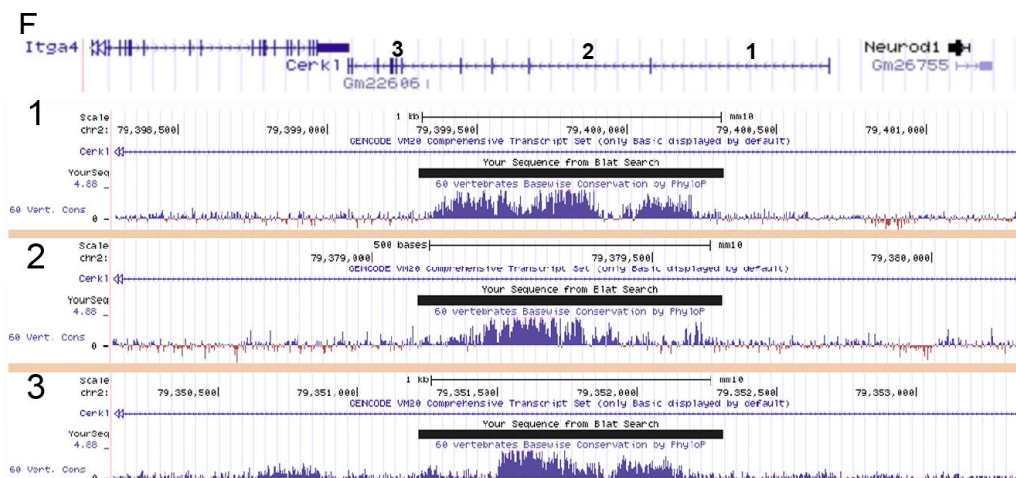


Figura 31. A) *Heatmap* que mostra les interaccions de la cromatina a la regió genòmica de *CERKL* tenint en compte el DI i el context genòmic. B) Esquema dels dominis topològics i del biaix direccional resultant (extret i adaptat de J.R. Dixon, *et al.*, *Nat*, 2012). C) Interaccions de la cromatina centrades en el locus de *CERKL* i el seu voltant tenint en compte el DI i el context genòmic. D) *Heatmap* dels loci de *CERKL* i *NEUROD1* tenint en compte les regions reguladores descrites. E) Conservació en els 60 vertebrats dels *enhancers* GH02H181615 (identificat amb el número 1), GH02H181586 (identificat amb el número 2) i GH02H181554 (identificat amb el número 3) localitzats al locus de *CERKL*. Imatges A-E cedides per Joan Sala Garriga i presentades al seu TFM 2020 elaborades a partir de dades a <https://genome.ucsc.edu/>).

Actualment, un membre del grup ha clonat els tres *super-enhancers* altament conservats evolutivament en un vector d'expressió específic de peix zebra per tal de generar una línia estable de peixos zebra i comprovar l'acció reguladora dels *enhancers*, és a dir, si determinen l'expressió en òrgans on s'expressa *cerkl* o *neuroD1*.

Finalment, per abordar el tema de la letalitat, si s'hagués de generar un nou model ratolí considerant tot el que ara coneixem, o bé caldria dissenyar un model murí condicional induïble de retina per tal d'estudiar l'efecte del *knockout* total a la retina, tot i que en humans no s'hagi descrit cap individu amb manca completa de *CERKL*, o bé es podria deletar –o trencar la pauta de lectura– des de l'exó 6 fins al 12 de

Cerkl, evitant que es formés qualsevol isoforma, ja que totes les isoformes presenten els últims exons del gen. D'aquesta manera tindriem, bé un model que fos completament *knockout* a la retina (i per tant no causaria la letalitat de l'individu ja que no es tracta d'un òrgan vital) o, en l'altre cas, mantindriem els *enhancers*, de manera que si no fos letal sabríem que segurament la letalitat ve donada únicament per la manca de *Cerkl*, ja que els *enhancers* continuarien trobant-se en el locus.

Quina rellevància tenen les diferents isoformes de *Cerkl* en les distròfies de retina?

La complexitat transcripcional de *Cerkl* a la retina suggereix una expressió preferencial d'isoformes en els diferents tipus neuronals. Per aquesta raó vam generar dos anticossos dirigits contra pèptids codificats en diferents exons, α CERKL2 i α CERKL5, que reconeixen isoformes diferents de CERKL encara que també n'hi ha de compartides. La immunohistoquímica de crioseccions de retina de ratolí va mostrar que aquelles isoformes que contenen l'exó 2 es localitzen principalment en cons, mentre que les que presenten l'exó 5 s'expressen preferentment en bastons, suggerint que diferents isoformes de CERKL s'expressen preferentment segons el tipus cel·lular de la retina. A més, estudis de transcripció amb poblacions cel·lulars enriquides en RGCs o en bastons van revelar la presència d'isoformes d'mRNA majoritàries diferents en aquests tipus neuronals. Malauradament, no es van poder separar completament les poblacions de cons i bastons per tal de realitzar un estudi exhaustiu i determinar quin tipus d'isoforma s'expressa en cada tipus cel·lular. No obstant, s'observa una expressió diferencial d'isoformes que suggereix funcions diferents, ja que la majoria d'*splicings* alternatius impliquen la presència o absència de dominis rellevants de la proteïna, com el DAGK, NLS o el d'unió als RNAs i, per tant, la manca o presència d'aquests dominis podria definir la necessitat d'una isoforma o una altra, segons el tipus o el requeriment cel·lular en un moment concret. Caldria realitzar més experiments sobre l'efecte de les mutacions i la funció de les diferents isoformes de *CERKL*, a més de l'efecte dels gens modificadors, per poder explicar per què en alguns pacients

els trets fenotípics es troben clínicament associats a RP mentre que en altres casos causen CRD.

Per tal d'abordar el problema de la separació dels cons, caldria realitzar uns experiments similars als que realitzen altres investigadors emprant organoides de retina, en que els fotoreceptors presenten l'expressió d'un gen reporter sota el control d'un promotor de fotoreceptor específic que facilita la separació per FACS per tipus cel·lular i realitzar, posteriorment, el transcriptoma [282]. En el nostre cas, emprant aquest mètode podríem determinar l'expressió d'isoformes diferencials de *CERKL* en ambdós tipus de fotoreceptors. També podríem cercar bancs de dades de transcriptòmica per *single-cell* de retina que ja existeixen per tal d'analitzar la presència diferencial d'alguns exons en les isoformes. Aquest és un treball bioinformàtic que s'abordarà en un futur. D'altra banda, pensem aprofitar els resultats de transcriptòmica generats en els nostres experiments, per intentar esbrinar la presència de formes diferencialment expressades en condicions d'estrès lumínic.

Per últim, les isoformes proteiques reconegudes per tots dos anticossos semblen presentar localitzacions subcel·lulars diferents. En el nostre cas, ens hem centrat particularment en la importació/exportació nuclear i la formació de grànuls d'estrès, però sabem que algunes de les isoformes de *CERKL* poden estar associades a mitocondris, i aquesta és una feina desenvolupada per altres membres del grup.

És similar el fenotip dels ratolins *Cerkl*^{KD/KO} respecte als pacients humans amb mutacions a *CERKL*?

Pel que fa al fenotip a la retina dels animals *Cerkl*^{KD/KO}, vam observar una elongació molt significativa dels fotoreceptors (tant cons com bastons) i una deslocalització de les opsines des d'una edat molt inicial (retines d'animals de 2 mesos). L'elongació del segment extern dels fotoreceptors seguia un gradient longitudinal de la regió dorsal a la ventral de la retina, mostrant un possible paper de *Cerkl* en el patró dels fotoreceptors. A més, les retines amb una expressió menor de *Cerkl* presenten els

segments externs dels fotoreceptors desorganitzats, alteracions en l'apilament dels discs i una acumulació de vesícules. Aquests trets suggereixen que hi podria existir una disfunció en la fagocitosi duta a terme per l'RPE, ja que molt recentment s'ha demostrat que una davallada en els nivells d'expressió de *Cerkl* està associada amb defectes en l'autofàgia i la macrofàgia [241]. Val a dir que les retines de ratolins *Cerkl*^{KD/KO} vells (18 mesos d'edat) mostren uns microvilli desorganitzats incapaces d'embolcallar les puntes dels segments externs, i l'RPE mostra una acumulació de fagosomes a la membrana basal i un increment en el nombre total de lisosomes, el que es troba en plena concordança amb un estudi prèviament realitzat en un model de *cerkl* en peix zebra [240], i per tant, apuntaria a un nou paper de CERKL en la regulació de la formació de vesícules, autofàgia i fagocitosi dels segments externs.

El model generat també presenta alteracions en la longitud de les neurites, essent les neurites dels ratolins *Cerkl*^{KD/KO} més curtes. Aquesta manca en el creixement de les neurites podria ser causat per la davallada de *NeuroD1* associada a la manca de *Cerkl*, ja que *NeuroD1* és un factor neurogènic. Endemés, l'RNA-seq ha revelat que el gen *Ror1*, que pertany a la família de tirosines cinases, es troba sota-expressat en el nostre model i regula el creixement de les neurites. ROR1 és el receptor de WNT3 que s'ha vist que estimula l'expressió de *NeuroD1* i conseqüentment activa la neurogènesi [283]. Per tant, la davallada en els nivells de *NeuroD1* causada per uns nivells molt baixos de *Cerkl* podria ser la causa, directa a través dels *enhancers*, o indirecta a través de *Ror1*, per la que les neurites del model no són capaces de créixer correctament.

Un altre defecte morfològic observat en les retines dels ratolins *Cerkl*^{KD/KO} és el gruix asimètric de la retina causat per diferències de gruix de la capa plexiforme interna i l'elongació també asimètrica dels fotoreceptors a regió dorsal de la retina. Aquestes característiques fenotípiques s'associen amb una degeneració lenta però progressiva de les retines dels ratolins *Cerkl*^{KD/KO}, ja que mostren una pèrdua progressiva en el nombre de cons i una clara davallada en el nombre de nuclis de fotoreceptors amb el temps. Molts d'aquests trets s'observen en pacients humans portadors de

mutacions a *CERKL*, els quals mostren un aprimament de la fòvea, regió extremadament rica en cons, amb pèrdua de la capa nuclear externa o que presenta una laminació anormal, com s'ha observat mitjançant tomografia de coherència òptica (OCT) [284]. A més, la severa reducció en l'expressió de *Cerkl* afecta directament a l'homeòstasi de la retina, ja que l'expressió de GFAP produïda pels astròcits de la retina i les cèl·lules de Müller es troba notablement incrementada en les retines *Cerkl^{KD/KO}*, fet que es reproduïx en altres malalties de la retina com la degeneració macular associada a l'edat [285].

En conclusió, el nou model murí de *Cerkl* generat presenta menys d'un 10% d'expressió de *Cerkl* i mimetitza trets característics de CRD, ja que presenta una pèrdua primerenca de cons, seguida d'una degeneració progressiva dels fotoreceptors. A mida que els ratolins envelleixen, el nostre model mostra un decrement en el nombre de cons, pèrdua de nuclis dels fotoreceptors, elongació dels segments externs dels fotoreceptors amb deslocalització de les opsines, alteracions en els microvilli de l'RPE i la fagocitosi i alteracions associades a l'estrès, com ara l'increment en l'expressió de GFAP. Aquestes alteracions morfològiques, en conjunt, causen una disfunció fisiològica de la retina i promouen l'apoptosi dels fotoreceptors. Remarcablement, els ERGs inicials realitzats en animals de 6 mesos d'edat no mostren diferències significatives entre mutants i controls, però en animals vells, de 18 mesos d'edat, aquestes alteracions en la resposta electrofisiològica són molt aparents, indicant una degeneració lenta i progressiva, a diferència d'altres models murins d'RP, on la degeneració és molt més ràpida. Per exemple, per a *PRPH2*, el fenotip del model murí presenta una ràpida afectació (a les dues setmanes d'edat presenta pèrdua de nuclis a la ONL i als 9 mesos es completament cec [138], [286]), mentre que en humans és d'aparició tardana i causa una degeneració lenta dels fotoreceptors, més marcada a partir de la segona dècada de la vida.

Malgrat no tots els trets fenotípics es comparteixen entre humans i ratolins, com ja hem esmentat, el fenotip del model de ratolí *Cerkl^{KD/KO}* és, de fet, molt més similar a

la degeneració retinal que mostren la majoria de pacients humans portadors de la mutació més prevalent de *CERKL* (p. R283*) que altres models ja reportats. Aquest model permetrà realitzar una dissecció exhaustiva del rol de *CERKL* a la retina i testar nous tractaments terapèutics.

És *Cerkl* un gen poc convencional?

CERKL és un dels pocs gens que presenta un donador d'*splicing* GC enlloc de GU, localitzat a l'exó 5 (en humans també a l'exó 4b). Aquest tipus de donador d'*splicing* poc freqüent està relacionat amb l'*splicing* alternatiu [287], ja que no és una seqüència consens que sigui altament reconeguda per l'*spliceosome*. La maquinària d'*splicing* (*spliceosome*) és un sistema molt refinat i conservat al llarg de l'evolució dels eucariotes, que regula de manera molt fina el tall i l'empalmament de transcrits. Endemés, *CERKL* no solament presenta aquest tipus de donador sinó que es troba majoritàriament conservat entre els mamífers, el que suggereix que la seva presència no és casual, que té una funcionalitat i que hi ha una pressió evolutiva per a la seva conservació (Figura 32). Aquest donador d'*splicing* no convencional facilitaria l'*exon skipping* i l'*splicing* alternatiu, afavorint la generació de diferents isoformes de *CERKL*, per exemple, en resposta a l'estrès ja que en molts casos s'ha observat una correlació entre certs *splicings* alternatius i les situacions d'estrès cel·lular [288].

	EXÓ 5	INTRÓ 5
<i>Homo sapiens</i>	CGAATCCTGACTCCTGTCCAGAGCACAGCTTCCACTTGGCTTAATACCAGCAG	gcaagggga
<i>Macaca fascicularis</i>	CGAATCCTGATTCCTGTCCAGAGCACAGCTTCCACTTGGCTTAATACCAGCAG	gcaagggga
<i>Canis lupus</i>	AGCATCCTCACCCTGTCCGAGCACAGCTCCGCTTGGGTAAATACCAGCAG	gcaagggga
<i>Equus caballus</i>	AGCATCCTGACTCCTGTCCAAGCACAGCTTCCACTTGGTGTAAATACCAGCAG	gcaagggga
<i>Bos taurus</i>	AGCATCCTGACTCCTGTCCGAGCCCAGCTTCCACTTGGTGTGATACCAGCAG	gcaagggga
<i>Mus musculus</i>	TGCATCCCGACTCTCGTGGAGCAGAGCTTCCCTTGGCTTCATACCAGCAG	gcaagggcg
<i>Felis catus</i>	CGCATCCTCACCCTGTCCGTGCAGAGCTCCCTCTGGGTTAAATACCAGCAG	gtgagggga
<i>Gallus gallus</i>	TACATACCAGCACCTGTCCAGAGCACCAATCCCTTGGAGTGATACCAGCAG	gtgagagct
<i>Xenopus laevis</i>	ACGATTTTCAGCCAGTGAGAGCACCAATCCCTTGGGCATAATACCAGCAG	gtgagggat
<i>Danio rerio</i>	TCCATCTTTCAGCCTGTCCAAGCAGCACTTCCCTCTCGGCGTAATACCAGCAG	gtgagggat

Figura 32. Alineament de la seqüència genòmica del final de l'exó 5 de *CERKL* a diferents espècies. El donador alternatiu d'*splicing* GC de l'intró 5 de *CERKL* està marcat en vermell. Seqüències extretes d'UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>) alineades amb CLUSTAL Omega (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) i ajustades a ull.

D'altra banda i com ja hem esmentat, CERKL és una proteïna amb diferents dominis de localització i exportació nuclear. En condicions basals, CERKL es troba en constant moviment dins de la cèl·lula, tenint la capacitat d'entrar i sortir del nucli, associar-se als mitocondris, al reticle endoplasmàtic i a l'aparell de Golgi [41], [42]. Hem demostrat que CERKL és una proteïna altament dinàmica, ja que hi ha una notable acumulació al nucli quan s'inhibeix l'exportació nuclear amb Leptomycin B. A més, en resposta a l'estrès oxidatiu, aquest increment de CERKL al nucli és molt significatiu. D'acord amb treballs previs, CERKL presenta un domini d'unió a l'RNA [41] i probablement es desplaça al nucli per unir-se als RNAs naixents per tal de protegir-los formant part, posteriorment, dels grànuls d'estrès. El nostre treball demostra que a la retina de ratolí, davant un estímul d'estrès lumínic, la localització nuclear detectada amb α CERKL2 als nuclis de cons canvia, i es detecta CERKL a nivell perinuclear. Aquest canvi de localització subcel·lular davant l'estímul d'estrès d'algunes isoformes de CERKL indicaria una funció diferencial en cada tipus cel·lular depenent de la seva susceptibilitat a l'estrès lumínic/oxidatiu.

També sabem que la regió de localització nuclear està codificada a l'exó 2, que el domini d'unió a l'RNA es localitza a la regió N-terminal de la proteïna (en els primers 256 amino àcids), i que la mutació C125W causa que CERKL no es pugui desplaçar cap al nucli i, per tant, no pot unir RNA ni formar part dels SGs [41]. D'aquests resultats previs sabem que els dominis codificats a l'exó 2 són importants per a formar part dels grànuls d'estrès. Si ara enfrontem aquest coneixement, amb el fet que en el ratolí *Cerk^{KD/KO}* no hi ha cap metionina que pugui actuar d'iniciadora de la traducció fins arribar a l'exó 5, teníem una situació difícil d'interpretar, ja que al nostre model: I) tenim proteïnes reconegudes per l'anticòs α CERKL2 i II) sabem que CERKL forma grànuls d'estrès i s'hi localitza de forma preferencial i incrementada. Per tant, els dominis codificats a l'exó 2 han de poder expressar-se al nostre model. Vam raonar que si no hi ha cap metionina iniciadora, CERKL hauria de produir-se a partir d'inicis no convencionals de traducció. Quan als assajos de

proteòmica vam detectar un pèptid codificat a l'exó 2, i poc més amunt a la pauta vam identificar en pauta dues leucines en tàndem codificades pel codó CUG (recordem que el codó CUG és el segon més freqüent després de l'universal AUG), vam pensar que aquest era un possible inici de traducció alternatiu. D'altra banda, si l'únic codó d'inici era la metionina de l'exó 5, no era gaire comprensible produir un 40% de transcrits a retina amb quatre exons no codificants, a més amb una metionina en un exó alternatiu, el que de forma efectiva eliminaria la producció de CERKL en moltes isoformes.

Totes aquestes dades són concordants si una (o ambdues) de les dues leucines identificades, codificades a l'inici de l'exó 2, són inicis de traducció alternatius. La conservació de totes dues, o al menys una (codó CUG) als vertebrats suggereixen que realment són rellevants a nivell funcional (Figura 33).

	EXÓ 1	EXÓ 2	
<i>Danio rerio</i>	TPIQPETPT	AD--RD L KKQEEYVDLKDVF	159
<i>Xenopus laevis</i>	SPIQPESP-	GSTS L THQKKEEILDRLDIFS	231
<i>Gallus gallus</i>	SPIVPESPA	GDSSTAL Q VKEEIIQMKDVS	121
<i>Mus musculus</i>	RRIQPPELPA	GGTRHD LL SKEESLELEDIFS	114
<i>Felis catus</i>	RPIQPERPA	GDSKYD V LCKEEFIELKDIFS	130
<i>Bos taurus</i>	-----	GDSKYD F LHKEEFVELKDIFS	52
<i>Equus caballus</i>	RPIQPERPA	GDFQYD LL CKEEFIELKDIFS	130
<i>Homo sapiens</i>	RPIQPERPA	GDSKYD LL CKEEFIELKDIFS	130
<i>Macaca fascicularis</i>	RPIQPERPA	GDSQYD LL CKEEFIELKDIFS	130
		. : ** : : . : * : * : * : * : * : . * * * * * : * * :	

Figura 33. Alineament entre la seqüència proteica de CERKL de diverses espècies de vertebrats. S'observa la conservació d'una o les dues leucines (indicades en vermell) trobades a l'inici de l'exó 2 que podrien actuar com a inici de traducció alternatiu en els transcrits generats a partir del promotor de *NeuroD1*. Seqüències de CERKL obtingudes de bancs de dades de proteïnes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>), alineades amb CLUSTAL omega (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) i ajustades a ull.

Tot i que semblaria que davant l'estrès oxidatiu no hem identificat modificacions post-traduccionals a CERKL, el fet que hi hagi un inici de traducció alternatiu diferent a la metionina convencional suggereix que la proteïna podria estar implicada en la resposta a l'estrès oxidatiu, ja que, en altres casos s'ha demostrat que proteïnes amb inicis de traducció no convencionals, com les leucines en el nostre

cas, regulen processos claus durant el desenvolupament o en situacions d'estrès usant una maquinària d'iniciació de la traducció alternativa. Aquesta situació es veu afavorida en estrès oxidatiu, ja que molta part de la maquinària traduccional, incloent-hi el factor d'iniciació, està "segrestada" als grànuls d'estrès i la cèl·lula disposa de vies alternatives de traducció per a les proteïnes que requereix per a fer front al dany, com seria CERKL. De fet, se sap que la desregulació d'iniciació des d'inicis alternatius pot causar malalties neurodegeneratives [266], [289]. Per tant, el gen *CERKL* deu tenir una funció rellevant, almenys a la retina, ja que presenta múltiples nivells de regulació, tant a nivell transcripcional, com traduccional.

És CERKL una proteïna sensora de l'estrès?

Les retines i les cèl·lules ganglionars en cultiu *Cerkl^{KD/KO}*, de manera basal i en comparació amb el control, presenten grànuls d'estrès, el que indica que sense rebre cap estímul ja pateixen un cert estrès. A més, quan reben una inducció de dany per estrès oxidatiu, l'increment en la formació de grànuls d'estrès és molt més exagerat, indicant una resposta desproporcionada davant l'estímul d'estrès oxidatiu. A més, s'observa que CERKL es troba en els grànuls d'estrès i que hi ha un desplaçament cap a aquests davant del dany. Pel que fa a la seva localització al nucli, trobem dues situacions depenent de les isoformes que detectem. Respecte les isoformes detectades amb l'anticòs α CERKL2 observem un increment de CERKL cap al nucli en ratolins *Cerkl^{KD/KO}* en comparació amb el control i en situació d'estrès aquest increment es torna més notable, indicant que probablement les isoformes detectades amb aquest anticòs es desplacen al nucli per embolcallar als RNAs naixents i transportar-los als grànuls d'estrès per tal que siguin protegits durant el període que duri el dany. D'altra banda, quan detectem CERKL amb l'anticòs α CERKL5 observem una davallada en el nucli en els individus *Cerkl^{KD/KO}* indicant que les isoformes detectades amb aquest anticòs davant de l'estímul d'estrès es desplacen a un altre compartiment cel·lular com podrien ser els mitocondris, on s'ha vist associat prèviament i podria tenir un rol important en el control de la dinàmica mitocondrial

[241]. Així mateix, les interaccions entre el reticle endoplasmàtic (RE) i els mitocondris són ben conegudes per ser un punt de regulació de la fusió i fissió mitocondrial a més de ser el lloc on es dur a terme la regulació lipídica on està altament controlada [290]. Aquests llocs d'interacció entre el RE i els mitocondris es coneixen com a regions MAM i s'hi localitzen moltes proteïnes, com ara NLRP3, que actuen de sensors front l'estrès oxidatiu i la inflamació [291], pel que certes isoformes de CERKL podrien actuar de sensors i nodes de comunicació davant d'una situació d'estrès amb proteïnes de les MAMs, per tal de desencadenar una resposta cel·lular per fer front a l'estímul d'estrès oxidatiu. Aquesta serà una de les línies de treball en el futur. Per tant, aquests resultats reforcen la hipòtesi de que diferents isoformes de CERKL presenten funcions diferents i que podria tenir un paper clau en la resposta a l'estrès oxidatiu.

El model *knockdown* prèviament generat presentava una davallada significativa en tots els lípids, molt especialment en les glucosil- i galactosil-ceramides, tot i que no hi havia diferències entre les ceramides i esfingomielines saturades i insaturades [45]. Posteriorment, en el model *Cerkl^{KD/KO}* hem observat gràcies a l'anàlisi d'RNA-seq en retines de ratolí que hi ha un conjunt de proteïnes relacionades amb esfingolípid sub-expressades en el nostre model. Els lípids es troben altament representats en la retina, ja que hi ha un elevat contingut lipídic. Per aquest motiu, alteracions en la composició de lípids podrien causar afectacions visuals [292], a més la composició lipídica varia en les membranes dels fotoreceptors i altres tipus cel·lulars que formen part de la retina [293]. S'ha observat que les diferents isoformes de proteïnes amb *splicings* alternatius regulen diferencialment certs lípids [294], pel que en el cas de CERKL, algunes isoformes podrien tenir una funció més enfocada a la regulació lipídica com, per exemple, aquelles que tenen el domini DAGK. Malgrat mai no s'ha demostrat que CERKL presenti una activitat cinasa, podria actuar com a transportador de lípids, o com activador mitjançant canvis conformacionals, o fins i tot, transportant o regulant les cinases que controlen la

forma activa dels enzims, com ara *B3gnt5*, gen sub-expressat en els ratolins *Cerkl^{KD/KO}*, que és essencial per la síntesi de glicolípid a partir de ceramides.

Pel que fa a *Pdl1*, que es troba sub-expressat en la comparativa *Cerkl^{KD/KO} versus Cerkl^{WT/WT}*, es coneix que regula l'autofàgia hidrolitzant fosfolípids per suplir les necessitats mitocondrials d'àcids grassos per tal d'oxidar-los. S'ha observat que en baixes condicions de PLD1 disminueix la producció d'ATP i incrementen les ROS, el que eventualment pot conduir a la mort cel·lular en cèl·lules del càncer [295]. D'altra banda a l'epiteli pigmentari de la retina, s'ha observat que la inhibició de PLD1 incrementa l'autofàgia i que això podria promoure la supervivència cel·lular [296], però com ja hem vist, l'autofàgia podria presentar un paper dual en la supervivència neuronal, ja que nivells elevats d'autofàgia durant un període perllongat de temps podrien agreujar el dany cel·lular i, consegüentment, causar la mort. Per tal d'estudiar la composició lipídica del nostre model a part de realitzar un estudi lipídic convencional, es podria realitzar combinar amb un estudi d'imatge d'alta resolució per fer un MALDI capa per capa, amb la fi de determinar les diferències en els diferents tipus cel·lulars segons la capa retinal [297] i realitzar la comparativa en una situació d'estrès.

Exerceix CERKL una funció protectora *in vivo*?

Donat que ambdós anticossos reconeixen isoformes diferents de CERKL i que aquest s'uneix i forma part dels grànuls d'estrès, un estudi que podria ser de gran interès seria determinar a quins RNAs s'uneix CERKL per formar els SGs. Sabem que la formació dels grànuls d'estrès no és aleatòria sinó que els RNAs són reconeguts per les proteïnes i específicament escollits per formar els grànuls, i que no tots els SGs són iguals [115]. Per aquest motiu, seria rellevant determinar si hi ha diferències entre les diferents isoformes de CERKL a l'hora d'unir-se a un RNA o a un altre, ja que ens permetria elucidar sobre quines possibles vies de senyalització actua CERKL. Per aquest estudi, es podria dur a terme un RIP (Immunoprecipitació d'RNA), tècnica que es basa en immunoprecipitar una

proteïna i seqüenciar els RNAs que té units, d'aquesta manera podríem immunoprecipitar amb els dos anticossos i seqüenciar els RNAs que s'hi han unit en cada cas.

Pel que fa a la resposta a l'estrès lumínic, que en el fons es tracta d'estrès oxidatiu, observem que CERKL incrementa la seva expressió i es desplaça cap als grànuls d'estrès, indicant que probablement es tracta d'un sensor que desencadena una resposta protectora davant l'estímul d'estrès oxidatiu. L'estudi general de l'RNA-seq demostra que hi ha grans blocs de gens que es troben sobre- o sub-expressats en el model animal respecte els individus control, a més aquests canvis també són notables davant l'estímul d'estrès lumínic, confirmant els resultats previs que demostren que presenta un paper important en la resposta front l'estrès oxidatiu. Actualment, estem realitzant un estudi refinat de les dades segons vies de senyalització, òrgànul o funció per poder trobar gens candidats que puguin determinar alguna de les vies de senyalització o interactors de *Cerkl*. Davant la manca o reducció dels nivells d'expressió de *Cerkl*, la cèl·lula respon d'una manera exacerbada a l'estrès i, per tant, aquest estímul pot conduir eventualment a la mort cel·lular. Segons la base de dades RPSNet (<https://compgen.bio.ub.edu/RPSNet/>), CERKL presenta interactors directes, com ara PPM1A, PPM1B, PPM1G, STK26, VHL o EIF3G, que són majoritàriament moduladors de l'apoptosi i, en el cas de PPM1G, un regulador negatiu de l'estrès oxidatiu (Figura 34), de nou confirmant la relació entre CERKL i l'estrès. A més, observem que també interacciona amb SIRT1, proteïna que modula l'autofàgia i que, quan manca CERKL, s'ha trobat sub-expressada [241], tot indicant una relació directe d'elevada importància, ja que un augment descontrolat en l'autofàgia a causa de l'estrès oxidatiu, conduiria a les cèl·lules a la seva mort.

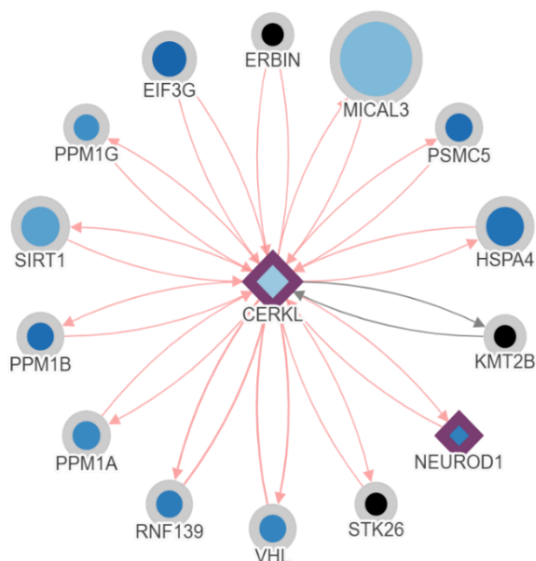


Figura 34. Representació esquemàtica dels interactors directes de CERKL, pels quals s'ha trobat evidències. La informació ha estat obtinguda a través de la base de dades (<https://compgen.bio.ub.edu/RPGeNet/>).

Un estudi massiu del transcriptoma de la retina i de diferents tipus cel·lulars retinals per separat demostra que CERKL és una proteïna que presenta resposta a l'estrès lumínic i que el pic màxim d'expressió es dona a les 24h post-estrès a les cèl·lules fotoreceptores. Aquests resultats enforteixen la hipòtesi de que CERKL es tracta d'una proteïna de resposta a l'estrès i no solament de resposta a l'estrès sinó que resultaria rellevant per la viabilitat cel·lular, ja que els seus nivells d'expressió incrementen fins a 24h després del dany (Figura 35). De fet, sabem per experiments previs del grup que CERKL té una finestra de temps en que la seva sobre-expressió és efectiva per protegir a les cèl·lules dels efectes de l'estrès oxidatiu (a 24h però menys de 48h). Tanmateix, el paper com a proteïna sensora/ protectora va més enllà d'una resposta momentània per evitar el dany cel·lular massiu (per ex. participant en la formació d'SGs i, probablement, en la resposta mitocondrial), sinó que també participaria en la resposta a llarg termini, modulant vies senyalitzadores de la cèl·lula per a decidir entre apoptosi o supervivència.

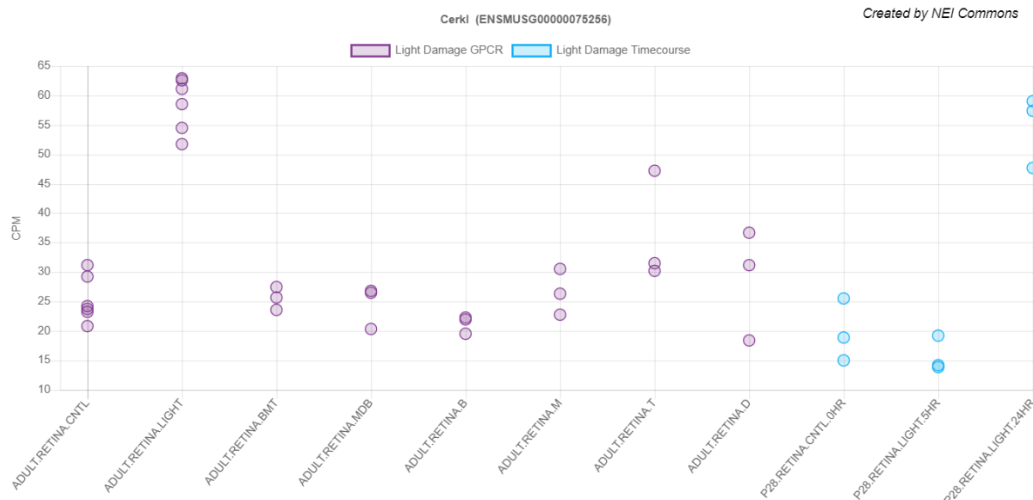


Figura 35. Anàlisi transcriptòmic de *Cerkl* a retina de ratolí en diferents condicions. En lila s’indica l’efecte immediat de l’estrès lumínic sobre l’expressió de *Cerkl* en les cèl·lules fotoreceptores (GPCR). En blau s’indica l’efecte de l’estrès lumínic en l’expressió de *Cerkl* després d’un període de temps. En tots els casos s’ha observat l’efecte en retina adulta. CNTL: control; LIGHT: condició d’estrès lumínic. La informació ha estat obtinguda a través de la base de dades (<https://neicommons.nei.nih.gov/#/analysis>).

Les còpies òptiques derivades de hiPSCs de pacients, una nova eina per a estudiar la funció de CERKL en la resposta a l’estrès oxidatiu

L’impacte de la pèrdua de visió en pacients afectats per una malaltia degenerativa de la retina, com l’RP, és devastador a l’hora d’adaptar-se i tenir una qualitat de vida similar a la que tenien abans de perdre la visió. Per aquest motiu, esbrinar els mecanismes genètics subjacents que causen aquestes malalties és clau per tal de poder abordar una possible teràpia.

Les còpies òptiques de retina derivades de hiPSCs d’un pacient portador de la mutació de *CERKL* p.R283* en homozigosi i de la seva germana sana han estat una eina essencial per generar un model de retina humana que permeti l’estudi de la funció de *CERKL*. La generació d’aquest model és costós a nivell econòmic i a nivell de

recursos, diàriament se'ls ha de canviar el medi i únicament uns pocs organoides arriben als estadis de desenvolupament finals, ja sigui perquè no s'organitzen com el teixit esperat, perquè moren, es contaminen o bé perquè al diferenciar-se, s'acumulen mutacions no desitjades que el pacient no presenta.

Durant el desenvolupament d'aquests organoides es van realitzar proves de genotipatge, cariotipatge i anàlisis per PCR a temps real per tal de comprovar quina era l'expressió de certs gens marcadors de diversos estadis de desenvolupament de la retina [272]. De les copes òptiques analitzades, hem realitzat immunohistoquímiques per comprovar i determinar l'expressió de CERKL durant el desenvolupament dels organoides, i des d'estadis inicials del desenvolupament es detecta l'expressió de CERKL a les rosetes de proliferació cel·lular. Amb el pas de les setmanes, a mida que l'organoide s'estratifica en capes i les cèl·lules que conformaran la retina migren cap a la perifèria i es diferencien, s'observa expressió de CERKL, sobretot a la capa dels fotoreceptors, el que és un clar indicador que, en aquestes cèl·lules fotoreceptores la funció de CERKL serà important, almenys en teixit humà, el que té sentit, ja que mutacions en aquest gen causen malalties retinals que afecten principalment a aquest tipus cel·lular.

La comparativa de l'expressió de CERKL entre les copes òptiques del pacient i el control demostren que l'individu homozigot per la mutació p.R283* presenta una reducció notable en l'expressió de CERKL a causa de la mutació de codó d'aturada que presenta a l'exó 5. Aquesta mutació causa que no es puguin sintetitzar les proteïnes codificades per les isoformes que contenen l'exó afectat. De fet, s'espera que els transcrits que contenen aquest exó siguin degradats pel mecanisme de control d'RNA *non-sense mediated decay* (NMD), i per tant, resulti en una disminució dels nivells d'expressió de la proteïna. Sense condicions d'estrès oxidatiu, hi ha una elevada formació de grànuls d'estrès a les copes òptiques del pacient, el que indica que probablement les retines d'aquest individu de forma basal presenten nivells

elevats d'estrès, segurament amb dany cel·lular, el que concorda amb el nou model murí de *Cerkl* que hem generat.

Davant un estímul d'estès oxidatiu, no solament observem un increment en l'expressió de CERKL sinó també un increment en la formació d'SGs i la presència de CERKL en aquests SGs, essent aquest efecte molt més notable en el pacient que en control. Aquests resultats són totalment concordants amb els obtinguts amb el model murí i, conjuntament, reforcen el concepte que CERKL és una proteïna de resposta a l'estrès oxidatiu. Hipotetitzem que CERKL no seria només una proteïna sensora d'estrès, sinó que seria un node de protecció i resiliència cel·lular front a aquest tipus de dany, ja que davant la manca de CERKL, la resposta a aquest dany és molt més intensa i les cèl·lules de la retina presenten una mort prematura.

Mutacions a *CERKL* causen RP i CRD, independentment del tipus de mutació o de la seva zigositat, fins al moment no s'han trobat evidències d'un patró que defineixi en quin cas serà RP o CRD. En el cas d'ambdues malalties tot i ser de caire totalment genètic i mendelià, hi ha factors que afavoreixen la seva progressió. Els nostres resultats, i estudis d'altres grups d'investigació, demostren que les retines d'aquest tipus de pacients es troben afectades per elevats nivells d'estrès, en el nostre cas estrès lumínic/oxidatiu, pel que, el simple fet d'estar exposat a la llum solar natural podria afavorir l'avenç de la malaltia, ja que mentre un individu sa presenta la totalitat de l'expressió de *CERKL* i per tant, el seu mecanisme de resposta i defensa es troben intactes, el pacient que hem estudiat presenta una elevada taxa d'estrès, pel que una perllongació d'aquest estat d'estrès, com ara es dona sota il·luminació elevada, afavoreix que les cèl·lules fotoreceptores tinguin respostes exacerbades que, molt probablement, conduiran a l'apoptosi.

El fet que el model murí que hem generat presenti resultats similars a les còpies retinals humanes a nivell de resposta de CERKL front l'estrès oxidatiu i a més que mostri una degeneració progressiva de retina el fa un bon candidat per estudiar la funció de CERKL i poder realitzar proves de teràpia, ja sigui gènica com mitjançant

la ingesta d'antioxidants. De fet, actualment disposem de dos models diferents i complementaris per a poder comprovar una possible prova de concepte per a teràpia, el model de ratolí i els organoides retinals derivats de pacients. Segons els nostres resultats, els antioxidants són un element de les nostres dietes que podria ser clau per tal d'intentar alentir la progressió de la pèrdua de la visió abans no es troba un sistema de teràpia gènica que tingui efectes a llarg termini o permanents.

Nanopartícules d'or, una via a explorar per a una possible teràpia gènica en distròfies de retina hereditàries

L'ús de nanopartícules com a vector d'entrega de DNA a les cèl·lules o als teixits ha estat un nou sistema en els darrers anys per intentar optimitzar i diversificar les metodologies de teràpia gènica.

La via d'internalització de les nanopartícules és important a l'hora de poder estudiar la rapidesa d'alliberament de la càrrega gènica, si seran degradades o si la seva acumulació provocarà citotoxicitat cel·lular. La via d'internalització majoritària a les cèl·lules és la fagocitosi cel·lular, que implica la formació de grans vesícules, però en el cas de partícules de mida petita, la via d'internalització és la pinocitosi que involucra rutes d'entrada regulades per diferents interaccions entre proteïnes i lípids, com les que estan regulades per clatrina, caveolina i les que en són independents de totes dues proteïnes [298], [299]. Els nostres experiments demostren que les nanopartícules d'or utilitzades no són citotòxiques, ja que a les 48h post-transfecció les cèl·lules ARPE-19 no mostren nuclis picnòtics, i que l'eficiència de transfecció és similar a les transfeccions convencionals utilitzant liposomes. D'altra banda, cal remarcar que les nanopartícules requereixen la meitat de quantitat de DNA que els liposomes i a les 16h i 48h post-transfecció presenten el mateix nombre de cèl·lules que expressen el gen reporter GFP el que suggereix que les nanopartícules emprades utilitzen una via d'internalització més ràpida que els lipoplexes convencionals que, normalment, entren a la cèl·lula via vesícules de clatrina i requereixen al voltant de

20-24 hores per a detectar la producció d'un gen reporter, com ara GFP [299]–[302]. Així mateix, els nostres experiments també determinen que les cèl·lules ARPE-19 responen diferent si les nanopartícules estan unides a DNA o no, ja que l'àrea de vesícules de clatrina és menor en presència de nanopartícules amb DNA.

Pel que fa a la via d'internalització, el 50% de les nanopartícules de 40 nm d'or, tant si es troben lliures de DNA com si estan unides a DNA, s'internalitzen dins les cèl·lules a través d'endocitosi dependent de clatrina. D'altra banda, el 50% restant s'internalitza per altres vies alternatives, ja que es troben en altres compartiments cel·lulars. Almenys el 30% de les nanopartícules nues són internalitzades per rutes no vesiculars ja que no es localitzen en endosomes primerencs o tardans. Donat que després del tractament amb *dynasore*, l'inhibidor de la via de clatrina, totes les nanopartícules es detecten a la via endosomal suggereix que una part important del conjunt de nanopartícules nues s'internalitzen per *lipid-rafts* o per difusió ja que desestabilitzen la membrana de la cèl·lula [303], [304].

Pel contrari, les nanopartícules unides a DNA que es detecten a compartiments no-endosomals és menor, al voltant del 20%, el que explicaria una preferència d'entrada per la via endosomal ja que la mida dels complexos és major. A més, les nanopartícules unides a DNA es distribueixen de manera homogènia entre endosomes primerencs i tardans, independentment del tractament amb *dynasore*, el que indica que no tots els endosomes primerencs acaben madurant a endosomes tardans. Aquests resultats estan en concordança amb la ràpida expressió del gen reporter a les 16h post-transfecció, que apunten a que les nanopartícules unides a DNA s'internalitzen mitjançant una via independent de clatrina, com podria ser la via d'internalització de caveolina [298], [299] i, d'aquesta manera, la seva càrrega (DNA) escaparia de la fusió i degradació via lisosomal. De totes maneres, no es poden descartar altres vies alternatives d'entrada [305].

L'èxit de transfecció a les cèl·lules ens va portar a provar de transfectar les mateixes nanopartícules unides al DNA per a l'expressió del gen reporter GFP a explants de

retina, que són un teixit completament diferenciat i madur que presenta una gran dificultat a l'hora de ser transfectat ja que totes les cèl·lules neuronals són post-mitòtiques diferenciades. Els mètodes convencionals de transfecció amb nanopartícules poden causar dany físic al teixit per la seva agressivitat de penetració i els sistemes amb adenovirus o lipídics presenten diferències en l'eficiència d'entrega dins del teixit [306]. Els nostres resultats demostren que les nanopartícules unides a DNA tenen la capacitat de penetrar dins del teixit i expressar el gen reporter, a més els cultius primaris de retina presenten la mateixa supervivència que els controls, ja que no vam detectar que els cultius nanotransfectats morissin abans o presentessin algun tipus de dany a ull nu, el que indica que en el teixit no provoca *a priori* citotoxicitat. A les 16h, ja s'aprecia expressió del gen reporter i a les 24h post-transfecció hi ha el pic màxim d'expressió, com hem comentat, molt abans que amb lipofecció.

Finalment, gràcies a la immunohistoquímica dels explants s'observa que a l'hora de transfectar les nanopartícules en condicions de llum normal i de foscor l'eficiència d'entrada és menor que quan s'aplica un pols de llum que activa la ressonància plasmònica, igual que succeeix amb les cèl·lules. A més, aquests resultats suggereixen que les nanopartícules presenten una preferència a l'hora d'entrar i expressar-se en cons en comparació amb els bastons. La composició lipídica de la membrana dels cons i dels bastons és diferent [293], pel que podria ser un factor clau que facilités la seva entrada depenent de les propietats físico-químiques de la membrana. Per evitar aquests biaix entre cèl·lules es podria afegir un marcador a la superfície de les nanopartícules perquè tinguessin un destí predeterminat. Altres investigadors estan duent a terme estudis de teràpia mitjançant l'optogenètica amb *nanorods* d'or, que són un tipus de nanopartícula que també s'activa amb la ressonància plasmònica i va dirigida mitjançant la unió d'un anticòs als cons. Aquests *nanorods* actuen com a antena per als rajos infrarojos transformant la llum en calor gràcies a la ressonància plasmònica, a la vegada també injecten canals TRP

(canals de potencial transitori sensibles a la calor) d'aquesta manera aconseguixen estimular els cons [307], [308].

Per tant, tot i ser molt preliminars aquests experiments amb nanopartícules, aparentment, no presenten citotoxicitat cel·lular i són capaces de ser internalitzades, tant dins cèl·lules en cultiu com en teixits madurs com la retina. Malgrat que queda molt camí per endavant per tal d'optimitzar el sistema i entendre els mecanismes d'interacció nanopartícula-cèl·lula estem davant d'un potencial sistema d'entrega d'àcids nucleics terapèutics dins la retina que, en el futur, podria ser una eficient i eficaç teràpia gènica.

En resum, en aquesta Tesi s'ha utilitzat el sistema CRISPR/Cas9 D10A per a deletar el locus de *Cerkl* (97 kb), per tal de generar un model murí *knockout* per a *Cerkl*. Aquest al·lel ha resultat ser letal en homozigosi. La combinatòria d'un model murí de *Cerkl knockdown* prèviament generat juntament amb el model *knockout* ens han permès obtenir una colònia de ratolins dobles heterozigots viables amb menys d'un 10% d'expressió de *Cerkl* a la retina. Aquest nou model, *Cerkl^{KD/KO}*, presenta una degeneració lenta i progressiva de la retina, amb una pèrdua inicial dels cons seguit d'una afectació completa dels fotoreceptors, el que s'assimila a una distròfia de cons i bastons en humans. A més, tant l'estudi de les retines d'aquest model com del model humà de còpies òptiques de retina derivades de hiPSCs d'un pacient amb Retinosi Pigmentària ens han permès determinar que CERKL té un paper clau en la resposta a l'estrès i la supervivència dels fotoreceptors i que la seva manca provoca una resposta davant aquest estímul exagerada que, a llarg termini, condueix a la mort cel·lular. Per tant, ens permet concloure que CERKL és una proteïna amb un paper essencial per abordar l'estrès quotidià de la llum solar, entre altres, i que mutacions en aquest gen que causen distròfies de retina hereditàries podrien, entre altres, veure's agreujades per mutacions en gens modificadors a més de l'impacte de l'estrès oxidatiu.

Finalment, hem explorat una prova de concepte, emprant nanopartícules d'or com a vectors d'entrega d'àcids nucleics a cèl·lules de retina i a teixit retinal per, en un futur, poder realitzar proves de teràpia gènica.

Conclusions

- La deleció en homozigosi del locus del gen *Cerkl* en ratolins és letal.
- Els ratolins doble heterozigots *Cerkl*^{KD/KO} expressen menys d'un 10% de *Cerkl* i són viables i fèrtils.
- El gen *CERKL* conté regions reguladores del tipus *super-enhancer* conservades evolutivament, que regulen l'expressió de *CERKL* i *NEUROD1*.
- La disminució d'expressió de *Cerkl* correlaciona amb una davallada en els nivells d'expressió de *NeuroD1*, suggerint que en el ratolí *Cerkl*^{KD/KO}, a més de l'efecte d'una possible deleció en hemizigosi de seqüències reguladores, hi hagi un efecte regulador de l'expressió de *Cerkl* sobre *NeuroD1*.
- Els ratolins *Cerkl*^{KD/KO} presenten les següents alteracions fenotípiques de la retina:
 - Reducció en el nombre de cons (des d'edats joves).
 - Elongació dels OS dels fotoreceptors en gradient dorso-ventral.
 - Mal empaquetament dels discs dels fotoreceptors en ratolins adults.
 - Pèrdua progressiva dels fotoreceptors amb l'edat.
 - Alteracions en la fagocitosis de l'RPE.
 - Degeneració lenta i progressiva de la funció visual, similar a la que presenten els pacients humans amb distròfia de cons i bastons causada per mutacions a *CERKL*.
- *In vitro*, *CERKL* presenta un elevat dinamisme entre nucli-citoplasma incrementant la seva presència al nucli davant una situació d'estrès oxidatiu.

- Els estudis de proteòmica i de transfecció en cèl·lules suggereixen que les isoformes de CERKL provinents del promotor de *NeuroD1* presenten un inici de traducció alternatiu a l'exó 2, probablement constituït per dues leucines.
- Les retines del model *Cerkl^{KD/KO}* mostren una acumulació de grànuls d'estrès en condicions basals.
- CERKL colocalitza amb els grànuls d'estrès.
- Sota condicions d'estrès oxidatiu CERKL es desplaça cap als grànuls d'estrès.
- Els anticossos α CERKL2 i α CERKL5 (dirigits, respectivament, contra pèptids codificats a l'exó 2 i al 5) detecten isoformes diferents de CERKL:
 - α CERKL2 detecta isoformes preferentment localitzades a cons.
 - α CERKL5 detecta isoformes preferentment localitzades a bastons.
- Davant un estímul d'estrès oxidatiu les isoformes de CERKL detectades amb α CERKL2 es desplacen majoritàriament cap als grànuls d'estrès, mentre que aquelles que són detectades amb α CERKL5 es desplacen, majoritàriament, cap a altres compartiments cel·lulars.
- Les copes òptiques de retina derivades d'hiPSCs del pacient portador de la mutació p. R283* afectat amb RP, presenten un fenotip similar al presentat en el model murí:
 - Les copes òptiques del pacient en comparació amb el control presenten uns nivells elevats de grànuls d'estrès en condicions basals.

- Sota condicions d'estrès oxidatiu les còpies òptiques del pacient mostren una resposta molt exacerbada davant d'aquest estímul presentant un increment exagerat de grànuls d'estrès i un augment en l'expressió de CERKL que es localitza als grànuls d'estrès.
- L'elevada correspondència entre els dos models, l'humà i el murí, suggereix que CERKL podria tenir un paper clau en la resposta a l'estrès oxidatiu actuant com a sensor i sent essencial per a la supervivència cel·lular dels fotoreceptors.
- Les nanopartícules de 40 nm d'or no són citotòxiques en cèl·lules ARPE-19 ni en cultius organotípics de ratolí, almenys a les 48-72 hores post-tractament.
- Les nanopartícules (NPs) de 40 nm d'or unides a DNA s'internalitzen dins les cèl·lules per una ruta més ràpida que els lipoplexes convencionals i permeten assolir majors nivells d'expressió de gens reporters en menor temps i quantitat de DNA.
- Les NPs d'or unides a DNA són capaces de penetrar dins del teixit diferenciat de la retina i expressar el gen reporter, preferentment als cons, pel que poden ser un bon vector per a teràpia gènica dirigida a fotoreceptors.

Bibliografia

- [1] C. Cepko. Seeing the light of day. *NeuroScience*, **2010**, 329, 5990, 403–404.
- [2] D. E. Nilsson and M. J. Bok. Low-resolution vision at the hub of eye evolution. *Integr. Comp. Biol.*, **2017**, 57, 5, 1066–1070.
- [3] C. Shea. Anatomy and Physiology of the Eye - Stereoscopic Vision, *Certified Patient Service Specialist, Learning distance course*, **2012**.
- [4] U. Welsch and J. Sobotta, *Histología. Ed. Médica Panamericana*, **2008**.
- [5] M. H. Ross and W. Pawlina. *Histología -Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular- 6a EDICIÓN Ed. Médica Panamericana*, **2012**. .
- [6] G. Feng, R.H. Mellor, *et al.*, Neurotechnique Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP variants with altered spectral properties and improved translational efficiency, thermostability, and quantum yield. As a result of these favorable pro. *Neuron*, **2000**, 28, 41–51.
- [7] D. Purves, G.J. Augustine, *et al.*, *Neuroscience Third Edition* **2004**, *Sinauer Associates, Inc. Sunderland Massachusetts*.
- [8] C. H. Sung and J. Z. Chuang. The cell biology of vision. *J. Cell Biol.*, **2010**, 190, 6, 953–963.
- [9] E. R. Kandel, J. H. Schwartz, *et al.*, *Principles of Neural Science, Fifth Edit* **2013** McGraw-Hill Education.
- [10] N. Mahabadi and Y. Al Khalili. Retina. *Neuroanatomy StatPearl [Internet]*, **2019**.
- [11] T. Euler, S. Haverkamp, *et al.*, Retinal bipolar cells: Elementary building blocks of vision. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2014**, 15, 8, 507–519.
- [12] M. Hoon, H. Okawa, *et al.*, Functional architecture of the retina: Development and disease. *Prog. Retin. Eye Res.*, **2014**, 42, 44–84.
- [13] J. Hannibal, P. Hindersson, *et al.*, The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J. Neurosci.*, **2002**, 22, 1, 1–7.
- [14] D. M. Berson. Phototransduction in ganglion-cell photoreceptors. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, **2007**, 454, 5, 849–855.
- [15] R. Simó, M. Villarroel, *et al.*, The retinal pigment epithelium: Something more than a constituent of the blood-retinal barrier-implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, 2010, 190724.
- [16] R.H.Steinberg, Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural

- retina. *Doc. Ophthalmol.*, **1985**, 60, 327-346.
- [17] O. Strauss, The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.*, **2005**, 85, 3, 845–881.
- [18] S. Zhao, X. Lan, *et al.*, Protocol of global incidence and progression of age-related macular degeneration: A systematic review. *Medicine*, **2019**, 98, 10, e14645.
- [19] S. Veleri, C. H. Lazar, *et al.*, Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: Insights from mouse models. *Dis. Model. Mech.*, **2015**, 8, 2, 109–129.
- [20] S. Ferrari, E. Di Iorio, *et al.*, Retinitis Pigmentosa : Genes and Disease Mechanisms. *Curr. Genomics*, **2011**, 12, 238–249.
- [21] D. T. Hartong, E. L. Berson, *et al.*, Retinitis pigmentosa Prevalence and inheritance patterns. *Lancet*, **2006**, 368, 1795–1809.
- [22] C. Hamel. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J. Rare Dis.*, **2006**, 1,40.
- [23] P. Flores-Rodríguez, E. Loma, *et al.*, Retinitis pigmentosa. Revisión bibliográfica. *Gac. Optom. y Óptica Oftálmica*, **2013**, 481, 2173–9366, 34–40.
- [24] R. K. Koenekoop, I. Lopez, *et al.*, Genetic testing for retinal dystrophies and dysfunctions: Benefits, dilemmas and solutions. *Clin. Exp. Ophthalmol.*, **2007**, 35, 5, 473–485.
- [25] N. Bravo-Gil, M. González-del Pozo, *et al.*, Unravelling the genetic basis of simplex Retinitis Pigmentosa cases. *Sci. Rep.*, **2017**, 7, 41937.
- [26] T. P. Dryja and E. L. Berson. Retinitis pigmentosa and allied diseases: Implications of genetic heterogeneity. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **1995**, 36, 7, 1197–1200.
- [27] F. C. Mansergh, S. Millington-Ward, *et al.*, Retinitis pigmentosa and progressive sensorineural hearing loss caused by a C12258A mutation in the mitochondrial MTTS2 gene. *Am. J. Hum. Genet.*, **1999**, 64, 4, 971–985.
- [28] K. Kajiwara, E. L. Berson, *et al.*, Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science*, **1994**, 264, 5165, 1604–1608.
- [29] D. A. Thompson, C.L. McHenry, *et al.*, Retinal dystrophy due to paternal isodisomy for chromosome 1 or chromosome 2, with homoallelism for mutations in RPE65 or MERTK, respectively. *Am. J. Hum. Genet.*, **2002**, 70, 1, 24–229.
- [30] D. Yan and X. Z. Liu, Genetics and pathological mechanisms of Usher syndrome. *J. Hum. Genet.*, **2010**, 55, 6, 327–335.
- [31] V. C. Sheffield, The blind leading the obese: the molecular pathophysiology of a

- human obesity syndrome. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.*, **2010**, 121, 172–182.
- [32] M. Bayés, B. Goldaracena, *et al.*, A new autosomal recessive retinitis pigmentosa locus maps on chromosome 2q31-q33. *J. Med. Genet.*, **1998**, 35, 2, 141–145.
- [33] M. Tuson, G. Marfany, *et al.*, Mutation of CERKL, a Novel Human Ceramide Kinase Gene, Causes Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa (RP26). *Am. J. Hum. Genet.*, **2004**, 74, 128–138.
- [34] M. Sugiura, K. Kono, *et al.*, Ceramide kinase, a novel lipid kinase: Molecular cloning and functional characterization. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 26, 23294–23300.
- [35] Y. Inagaki, S. Mitsutake, *et al.*, Identification of a nuclear localization signal in the retinitis pigmentosa-mutated RP26 protein, ceramide kinase-like protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2006**, 343, 3, 982–987.
- [36] A. Gómez-Muñoz, P. Gangoiti, *et al.* Ceramide-1-Phosphate in Cell Survival and Inflammatory Signaling. *Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules*, C. Chalfant and M. Del Poeta, Eds. New York, NY: Springer New York, **2010**, 118–130.
- [37] A. Gomez-Muñoz, P. Gangoiti, *et al.*, New insights on the role of ceramide 1-phosphate in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta*, **2013**, 1831, 6, 1060–1066.
- [38] N. Auslender, D. Sharon, *et al.*, A common founder mutation of CERKL underlies autosomal recessive retinal degeneration with early macular involvement among Yemenite Jews. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2007**, 48, 12, 5431–5438.
- [39] A. Garanto, M. Riera, *et al.*, High transcriptional complexity of the retinitis pigmentosa CERKL gene in human and mouse. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2011**, 52, 8, 5202–5214.
- [40] M. Tuson, A. Garanto, *et al.*, Overexpression of CERKL, a gene responsible for retinitis pigmentosa in humans, protects cells from apoptosis induced by oxidative stress. *Mol. Vis.*, **2009**, 15, 168–180.
- [41] A. Fathinajafabadi, E. Pérez-Jiménez, *et al.*, CERKL, a retinal disease gene, encodes an mRNA-binding protein that localizes in compact and untranslated mRNPs associated with microtubules. *PLoS One*, **2014**, 9, 2, e87898.
- [42] C. Li, L. Wang, *et al.*, CERKL interacts with mitochondrial TRX2 and protects retinal cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, 1842, 7, 1121–1129.
- [43] F. Bornancin, D. Mechtcheriakova, *et al.*, Characterization of a ceramide kinase-like

- protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **2005**, 1687, 1–3, 31–43.
- [44] P. Rovina, A. Schanzer, *et al.*, Subcellular localization of ceramide kinase and ceramide kinase-like protein requires interplay of their Pleckstrin Homology domain-containing N-terminal regions together with C-terminal domains. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, 1791, 10, 1023–1030.
- [45] A. G. Iglesias. CERKL, Generació d'un model knockout de Retinosi Pigmentària i estudis funcionals. Tesi Doctoral **2011** Universitat de Barcelona.
- [46] K. Avela, E. M. Sankila, *et al.*, A founder mutation in CERKL is a major cause of retinal dystrophy in Finland, *Acta Ophthalmol.*, **2018**, 96, 2, 183–191.
- [47] J. M. Ellingford, S. Barton, *et al.*, Molecular findings from 537 individuals with inherited retinal disease. *J. Med. Genet.*, **2016**, 53, 11, 761–767.
- [48] M. Ali, V. L. Ramprasad, *et al.*, A missense mutation in the nuclear localization signal sequence of CERKL (p . R106S) causes autosomal recessive retinal degeneration. *Mol. Vis.*, **2008**, 14, 1960–1964.
- [49] M. Ezquerro-Inchausti, A. Anasagasti, *et al.*, A new approach based on targeted pooled DNA sequencing identifies novel mutations in patients with Inherited Retinal Dystrophies. *Sci. Rep.*, **2018**, 8, 1, 1–12.
- [50] L. Roberts, R. Ratnapriya, *et al.*, Molecular Diagnosis of Inherited Retinal Diseases in Indigenous African Populations by Whole-Exome Sequencing. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2016**, 57, 14, 6374–6381.
- [51] K. W. Littink, R. K. Koenekoop, *et al.*, Homozygosity mapping in patients with cone-rod dystrophy: Novel mutations and clinical characterizations. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2010**, 51, 11, 5943–5951.
- [52] Y. Xu, L. Guan, *et al.*, Mutations of 60 known causative genes in 157 families with retinitis pigmentosa based on exome sequencing. *Hum. Genet.*, **2014**, 133, 10, 1255–1271.
- [53] X. F. Huang, F. Huang, *et al.*, Genotype-phenotype correlation and mutation spectrum in a large cohort of patients with inherited retinal dystrophy revealed by next-generation sequencing. *Genet. Med.*, **2015**, 17, 4, 271–278.
- [54] P. Wang, S. Li, *et al.*, An ophthalmic targeted exome sequencing panel as a powerful tool to identify causative mutations in patients suspected of hereditary eye diseases. *Transl. Vis. Sci. Technol.*, **2019**, 8, 2, 21.
- [55] K. M. Nishiguchi, R. G. Tearle, *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.*, **2013**, vol. 110, 40, 16139–16144.
- [56] R. Perez-Carro, M. Corton, *et al.*, Panel-based NGS Reveals Novel Pathogenic Mutations in Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa. *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 19531.
- [57] H. Lee, J. L. Deignan, *et al.*, Clinical Exome Sequencing for Genetic Identification of Rare Mendelian Disorders. *JAMA Ophthalmol.*, **2014**, 312, 18, 1880–1887.
- [58] C. Jespersgaard, M. Fang, *et al.*, Molecular genetic analysis using targeted NGS analysis of 677 individuals with retinal dystrophy. *Sci. Rep.*, **2019**, 9, 1, 1–7.
- [59] J. Wang, V. W. Zhang, *et al.*, Dependable and efficient clinical utility of target capture-based deep sequencing in molecular diagnosis of retinitis pigmentosa. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2014**, 55, 10, 6213–6223.
- [60] N. Patel, M. A. Aldahmesh, *et al.*, Expanding the clinical, allelic, and locus heterogeneity of retinal dystrophies. *Genet. Med.*, **2016**, 18, 6, 554–562.
- [61] A. O. Khan and L. Abu-Safieh. Rod-Cone Dystrophy with Initially Preserved Visual Acuity Despite Early Macular Involvement Suggests Recessive CERKL Mutations. *Ophthalmic Genet.*, **2015**, 36, 4, 369–372.
- [62] E. Boulanger-Scemama, S. El Shamieh, *et al.*, Next-generation sequencing applied to a large French cone and cone-rod dystrophy cohort: Mutation spectrum and new genotype-phenotype correlation. *Orphanet J. Rare Dis.*, **2015**, 10, 85.
- [63] R. Matsui, A. V. Cideciyan, *et al.*, Molecular heterogeneity within the clinical diagnosis of pericentral retinal degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2015**, 56, 10, 6007–6018.
- [64] N. Glöckle, S. Kohl, *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.*, **2014**, 22, 1, 99–104.
- [65] E. M. Stone, J. L. Andorf, *et al.*, Clinically Focused Molecular Investigation of 1000 Consecutive Families with Inherited Retinal Disease, *Ophthalmology*, **2017**, 124, 9, 1314–1331.
- [66] J. Birtel, T. Eisenberger, *et al.*, Clinical and genetic characteristics of 251 consecutive patients with macular and cone/cone-rod dystrophy. *Sci. Rep.*, **2018**, 8, 1, 1–11.
- [67] J. Birtel, M. Gliem, *et al.*, Next-generation sequencing identifies unexpected genotype-phenotype correlations in patients with retinitis pigmentosa. *PLoS One*, **2018**, 13, 12, 1–18.

- [68] K. J. Carss, G. Arno, *et al.*, Comprehensive Rare Variant Analysis via Whole-Genome Sequencing to Determine the Molecular Pathology of Inherited Retinal Disease. *Am. J. Hum. Genet.*, **2017**, 100, 1, 75–90.
- [69] J. M. Ellingford, B. Horn, *et al.*, Assessment of the incorporation of CNV surveillance into gene panel next-generation sequencing testing for inherited retinal diseases. *J. Med. Genet.*, **2018**, 55, 2, 114–121.
- [70] B. Azab, R. Barham, *et al.*, Novel CERKL variant in consanguineous Jordanian pedigrees with inherited retinal dystrophies. *Cananian J. Ophthalmol.*, **2019**, 54, no. 1, 51–59.
- [71] M. De Castro-Miró, R. Tonda, *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**, 11, 12, 1–19.
- [72] Z. Tang, Z. Wang, *et al.*, Novel Compound Heterozygous Mutations in CERKL Cause Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa in a Nonconsanguineous Chinese Family. *Arch Ophthalmol*, **2009**, 127, 8, 1077.
- [73] P. Biswas, J. L. Duncan, *et al.*, Genetic analysis of 10 pedigrees with inherited retinal degeneration by exome sequencing and phenotype-genotype association. *Physiol Genomics*, **2017**, 49, 216–229.
- [74] T. S. Aleman, N. Soumitra, *et al.*, CERKL mutations cause an autosomal recessive cone-rod dystrophy with inner retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2009**, 50, 12, 5944–5954.
- [75] Q. Fu, F. Wang, *et al.*, Next-Generation sequencing-based molecular diagnosis of a Chinese patient cohort with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2013**, 54, 6, 4158–4166.
- [76] L. Wang, J. Zhang, *et al.*, Application of whole exome and targeted panel sequencing in the clinical molecular diagnosis of 319 Chinese families with inherited retinal dystrophy and comparison study. *Genes*, **2018**, 9, 7, 1–11.
- [77] J. M. Ellingford, C. Campbell, *et al.*, Validation of copy number variation analysis for next-generation sequencing diagnostics. *Eur. J. Hum. Genet.*, **2017**, 25, 6, 719–724.
- [78] A. Avila-Fernandez, R. Riveiro-Alvarez, *et al.*, CERKL mutations and associated phenotypes in seven Spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2008**, 49, 6, 2709–2713.
- [79] Cone-rod dystrophy. Genetics Home Reference, **2020**, Lister Hill National Center for Biomedical Communications U.S.

- [80] C. P. Hamel. Cone rod dystrophies. *Orphanet J. Rare Dis.*, **2007**, 2, 1, 1–7.
- [81] S. H. Tsang and T. Sharma, Progressive Cone Dystrophy and Cone-Rod Dystrophy (XL, AD, and AR). *Atlas of Inherited Retinal Diseases*, Eds. Cham: Springer International **2018**, 53–60.
- [82] R. A. Lockshin and Z. Zakeri. Cell death in health and disease: Angiogenesis Review Series. *J. Cell. Mol. Med.*, **2007**, 11, 6, 1214–1224.
- [83] S. Fulda, A. M. Gorman, O. Hori, and A. Samali, *et al.*, Cellular stress responses: Cell survival and cell death. *Int. J. Cell Biol.*, **2010**, 2010.
- [84] B. Poljšak and I. Milisav, Clinical implications of cellular stress responses. *Bosn. J. Basic Med. Sci.*, **2012**, 12, 2, 122–126.
- [85] L. Galluzzi, I. Vitale, *et al.*, Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.*, **2018**, 25, 3, 486–541.
- [86] M. Genestra. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell. Signal.*, **2007**, 19, 9, 1807–1819.
- [87] L. A. Pham-Huy, H. He, *et al.*, Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.*, **2008**, 4, 2, 89–96.
- [88] B. Brüne. The intimate relation between nitric oxide and superoxide in apoptosis and cell survival. *Antioxidants Redox Signal.*, **2005**, 7, 3–4, 497–507.
- [89] D. Trachootham, W. Lu, *et al.*, Redox regulation of cell survival. *Antioxidants Redox Signal.*, **2008**, 10, 8, 1343–1374.
- [90] T. Masuda, M. Shimazawa, *et al.*, Retinal Diseases Associated with Oxidative Stress and the Effects of a Free Radical Scavenger (Edaravone). *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, 2017.
- [91] S. J. K. Jensen. Oxidative stress and free radicals. *J. Mol. Struct.*, **2003**, 666–667, 387–392.
- [92] M. Butnariu and I. Samfira. Free Radicals and Oxidative Stress. *J. Bioequiv. Availab.*, **2012**, 04, 03.
- [93] T. Finkel and N. J. Holbrook. Oxidants, Oxidative Stress and Biology of Ageing, *Insight Rev. Artic.*, **2000**, 408, 239–247.
- [94] O. A. Oduntan and K. P. Masige. A review of the role of oxidative stress in the pathogenesis of eye diseases. *African Vis. Eye Heal.*, **2011**, 70, 4, 191–199.

- [95] M. Pons and M. E. Marin-Castaño. Nicotine increases the VEGF/PEDF ratio in retinal pigment Epithelium: A possible mechanism for CNV in passive smokers with AMD. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2011**, 52, 6, 3842–3853.
- [96] N. K. Wills, V. M. Sadagopa Ramanujam, *et al.*, Cadmium accumulation in the human retina: Effects of age, gender, and cellular toxicity. *Exp. Eye Res.*, **2008**, 86, 1, 41–51.
- [97] K. M. Bertram, C. J. Baglolle, *et al.*, Molecular regulation of cigarette smoke induced-oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells: Implications for age-related macular degeneration. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, **2009**, 297, 5, 1200–1210.
- [98] V. E. Baksheeva, V. V. Tiulina, *et al.*, Suppression of light-induced oxidative stress in the retina by mitochondria-targeted antioxidant. *Antioxidants*, **2019**, 8, 1.
- [99] A. K. George, M. Singh, *et al.*, A hypothesis for treating inflammation and oxidative stress with hydrogen sulfide during age-related macular degeneration. *Int. J. Ophthalmol.*, **2018**, 11, 5, 881–887.
- [100] M. Samardzija, V. Todorova, *et al.*, Light stress affects cones and horizontal cells via rhodopsin-mediated mechanisms. *Exp. Eye Res.*, **2019**, 186, 107719.
- [101] L. J. Rohowetz, J. G. Kraus, *et al.*, Reactive oxygen species-mediated damage of retinal neurons: Drug development targets for therapies of chronic neurodegeneration of the retina. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, 19, 11.
- [102] M. M. Olchawa, A. M. Herrnreiter, *et al.*, Photosensitized oxidative stress to ARPE-19 cells decreases protein receptors that mediate photoreceptor outer segment phagocytosis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2013**, 54, 3, 2276–2287.
- [103] T. Hussain, B. Tan, *et al.*, Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 2016.
- [104] R. Sano and J. C. Reed. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, **2013**, 1833, 12, 3460–3470.
- [105] J. Li, J. J. Wang, *et al.*, Endoplasmic reticulum stress is implicated in retinal inflammation and diabetic retinopathy. *FEBS Lett.*, **2009**, 583, 9, 1521–1527.
- [106] R. K. Gupta, A. K. Patel, *et al.*, Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, **2014**, 15, 11, 4405–4409.
- [107] B. Poljsak, D. Šuput, *et al.*, Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2013**, 2013, 956792.
- [108] M. J. Morgan and Z. Liu. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling.

- Nat. Publ. Gr.*, **2010**, 21, 1, 103–115.
- [109] K. Lingappan. NF- κ B in Oxidative Stress. *Curr opin toxicol*, **2019**, 7, 81–86.
- [110] J. D. Wardyn, A. H. Ponsford, *et al.*, Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem. Soc. Trans.*, **2015**, 43, 4, 621–626.
- [111] P. Anderson and N. Kedersha. Stressful initiations. *J. Cell Sci.*, **2002**, 115, 16, 3227–3234.
- [112] N. Kedersha, S. Chen, *et al.*, Evidence That Ternary Complex (eIF2-GTP-tRNAⁱ Met)– Deficient Preinitiation Complexes Are Core Constituents. *Mol. Biol. Cell*, **2002**, 13, 195–210.
- [113] E. M. Courchaine, A. Lu, *et al.*, Droplet organelles?. *EMBO J.*, **2016**, 35, 15, 1603–1612.
- [114] W. van Leeuwen and C. Rabouille. Cellular stress leads to the formation of membraneless stress assemblies in eukaryotic cells. *Traffic*, **2019**, 20, 9, 623–638.
- [115] S. Namkoong, A. Ho, *et al.*, Systematic Characterization of Stress-Induced RNA Granulation. *Mol. Cell*, **2018**, 70, 1, 175–187.
- [116] E. G. Conlon and J. L. Manley. RNA-binding proteins in neurodegeneration : mechanisms in aggregate. *Genes Dev.*, **2017**, 31, 15, 1509–1528.
- [117] R. R. and P. I. Rajyaguru. Stress Granules and P-Bodies: An insight into mRNA translational control and decay. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.*, **2018**, 84, 2, 479–491.
- [118] S. Souquere, S. Mollet, *et al.*, Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells. *J. Cell Sci.*, **2009**, 122, 20, 3619–3626.
- [119] G. Stoecklin and N. Kedersha. Relationship of GW/P-Bodies with Stress Granules Georg. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2013**, 768, 197–211.
- [120] A. Bacsı, N. Dharajiya, *et al.*, Rhinitis , sinusitis , and ocular diseases Effect of pollen-mediated oxidative stress on immediate hypersensitivity reactions and late-phase inflammation in allergic conjunctivitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2005**, 116, 4, 836–843.
- [121] D. L. Williams. Oxidative Stress and the Eye. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.*, **2008**, 38, 1, 179–192.
- [122] J. L. Alio, M. J. Ayala, *et al.*, Antioxidant therapy in the treatment of experimental acute corneal inflammation. *Ophthalmic Res.*, **1995**, 27, 3, 136–143.
- [123] J. Čejková, T. Ardan, *et al.*, Nitric oxide synthase induction and cytotoxic nitrogen-

- related oxidant formation in conjunctival epithelium of dry eye (Sjögren's syndrome). *Nitric Oxide - Biol. Chem.*, **2007**, 17, 1, 10–17.
- [124] M. Dogru, T. Kojima, *et al.*, Potential role of oxidative stress in ocular surface inflammation and dry eye disease. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2018**, 59, 14 163–168.
- [125] E. Arnal, C. Peris-Martínez, *et al.*, Oxidative stress in keratoconus?. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2011**, 52, 12, 8592–8597.
- [126] R. Buddi, B. Lin, *et al.*, Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J. Histochem. Cytochem.*, **2002**, 50, 3, 341–351.
- [127] C. Cejka and J. Cejkova,. Oxidative stress to the cornea, changes in corneal optical properties, and advances in treatment of corneal oxidative injuries. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2015**, 2015.
- [128] I. M. Streete, J. F. Jamie, *et a.*, Lenticular levels of amino acids and free UV filters differ significantly between normals and cataract patients. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2004**, 45, 11, 4091–4098.
- [129] R. J. W. Truscott. Age-related nuclear cataract - Oxidation is the key. *Exp. Eye Res.*, **2005**, 80, 5, 709–725.
- [130] L. Huang, V. Grami, *et al.*, Human lens phospholipid changes with age and cataract. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2005**, 46, 5, 1682–1689.
- [131] I. Bellezza. Oxidative stress in age-related macular degeneration: NRF2 as therapeutic target. *Front. Pharmacol.*, **2018**, 9, 1–7.
- [132] K. Kaarniranta, E. Pawlowska, *Jet al.*, Role of mitochondrial dna damage in ros-mediated pathogenesis of age-related macular degeneration (Amd). *Int. J. Mol. Sci.*, **2019**, 20, 10.
- [133] S. M. Whitcup, R. B. Nussenblatt, *et al.*, Inflammation in retinal disease,” *Int. J. Inflam.*, **2013**, 2013, 4–7.
- [134] P. A. Campochiaro, R. W. Strauss, *et al.*, Is There Excess Oxidative Stress and Damage in Eyes of Patients with Retinitis Pigmentosa?, *Antioxidants Redox Signal.*, **2015**, 23, 7, 643–648.
- [135] L. Trachsel-Moncho, S. Benlloch-Navarro, *et al.*, Oxidative stress and autophagy-related changes during retinal degeneration and development. *Cell Death Dis.*, **2018**, 9, 8.
- [136] Y. Zhuo, H. Luo, *et al.*, Leber hereditary optic neuropathy and oxidative stress. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci.* **2012**, 109, 49, 19882–19883.
- [137] M. A. Rivas and E. Vecino. Animal models and different therapies for treatment of retinitis pigmentosa,” *Histol. Histopathol.*, **2009**, 24, 10, 1295–1322.
- [138] B. Chang, N. L. Hawes, *et al.*, Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res.*, **2002**, 42, 4, 517–525.
- [139] W. Baehr and J. M. Frederick,. Naturally Occurring Animal Models with Outer Retina Phenotypes. *Vision Res.* **2009**, 49, 22, 2636–2652.
- [140] R. B. Wheeler, J. D. Sharp, *et al.*, The Gene Mutated in Variant Late-Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (CLN6) and in *nclf* Mutant Mice Encodes a Novel Predicted Transmembrane Protein. *Am J Hum Genet.* **2002**, 70, 2 537–542.
- [141] R. T. Bronson, L. R. Donahue, *et al.*, Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (*nclf*), a New Disorder of the Mouse Linked to Chromosome 9. *Am J Med Genet.* **1998**, 77, 4, 289–297.
- [142] M. M. Messer, A., Plummer, *et al.*, Retinal Degeneration in motor neuron degeneration (*mnd*) mutant mice. *Exp. Eye Res.*, **1993**, 57, 637–641.
- [143] J. Pang, J. Alexander, *et al.*, Achromatopsia as a Potential Candidate for Gene Therapy. *Adv Exp Med Biol.* **2010**, 664, 639–646.
- [144] L Donahue, B. Chang, *et al.*, “A Missense Mutation in the Mouse *Col2a1* Gene Causes Spondyloepiphyseal Dysplasia Congenita, Hearing Loss, and Retinoschisis. *J Bone Miner Res.* **2003** 18, 9, 1612–1621.
- [145] M. J. Mattapallil, E. F. Wawrousek, *et al.*, The Rd8 Mutation of the *Crb1* Gene Is Present in Vendor Lines of C57BL / 6N Mice and Embryonic Stem Cells , and Confounds Ocular Induced Mutant Phenotypes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2012**, 53, 6, 2921–2927.
- [146] W. Deng, K. Sakurai, *et al.*, Functional interchangeability of rod and cone transducin α -subunits. *PNAS*, **2009**, 106, 42.
- [147] B. Chang, M. S. Dacey, *et al.*, Cone Photoreceptor Function Loss-3 , a Novel Mouse Model of Achromatopsia Due to a Mutation in *Gnat2*. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2006**, 47, 11, 1–5.
- [148] E. Kitamura, M. Danciger, *et al.*, “Disruption of the Gene Encoding the β 1-Subunit of Transducin in the Rd4/+ Mouse. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2006**, 47, 4, 1293–1301.
- [149] B. Cahng, J. Wang, *et al.*, A new mouse model of cone photoreceptor function loss

- (cpfl9) with cone photoreceptor degeneration. ARVO Annual Meeting Abstract in *IOVS*, **2016**, 57, 12.
- [150] B. Chang, N. L. Hawes, *et al.*, A New Mouse Model of Cone Photoreceptor Function Loss (cpfl6) Associated With the Targeted Hcn1 Gene Mutation. ARVO Annual Meeting Abstract in *IOVS*, **2006**, 47, 13.
- [151] H. Zhang, X. Li, *et al.*, The Degeneration and Apoptosis Patterns of Cone Photoreceptors in rd11 Mice. *J. Ophthalmol.* **2017**, 2017.
- [152] B. Chang, Md. Nawajes, *et al.*, Age-related retinal degeneration (arrd2) in a novel mouse model due to a nonsense mutation in the Mdm1 gene. *Hum. Mol. Genet.* **2008**, 17, 24, 3929–3941.
- [153] S. Kameya, N. L. Hawes, *et al.*, Mfrp , a gene encoding a frizzled related protein , is mutated in the mouse retinal degeneration 6. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, 11, 16, 1879–1886.
- [154] E. Steingrimsson, K. J. Moore, *et al.*, “Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences,” *Nat. Gen.*, **1994**, 8, 256-263.
- [155] J. Chen, A. Rattner, *et al.*, Effects of L1 retrotransposon insertion on transcript processing, localization and accumulation: Lessons from the retinal degeneration 7 mouse and implications for the genomic ecology of L1 elements. *Hum. Mol. Genet.*, **2006**, 15, 13, 2146–2156.
- [156] J. Favor, R. Sandalache, *et al.*, The mouse Pax 2 INeu mutation is identical to a human PAX 2 mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in developmental defects of the brain , ear , eye , and kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, 93, 24p. 13870–13875.
- [157] S. J. Pittler, C. E. Keeler, *Ret al.*, PCR analysis of DNA from 70-year-old sections of rodless retina demonstrates identity with the mouse rd defect. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, . 90, 20,. 9616–9619.
- [158] B. Chang, T. Grau, *et al.*, A homologous genetic basis of the murine cpfl1 mutant and human achromatopsia linked to mutations in the PDE6C gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, 106, 46, 19581–19586.
- [159] H. G. Jansen, S. Sanyal, *et al.*, Development and degeneration of retina in rds mutant mice: Ultraimmunohistochemical localization of opsin. *Exp. Eye Res.*, **1987**, 44, 3, 347–361.
- [160] J. S. Friedman, B. Chang, *et al.*, Premature Truncation of a Novel Protein , RD3 ,

- Exhibiting Subnuclear Localization Is Associated with Retinal Degeneration. *Am. J. Hum. Genet.* **2006**, 79, 6, 1059–1070.
- [161] J. Pang, B. Chang, *et al.*, Retinal Degeneration 12 (rd12): A new , spontaneously arising mouse model for human Leber congenital amaurosis (LCA). *Mol. Vis.* **2005**, 11, 152-162.
- [162] D. A. Thompson, N. W. Khan, *et al.*, Rd9 Is a Naturally Occurring Mouse Model of a Common Form of Retinitis Pigmentosa Caused by Mutations in RPGR-ORF15. *PLoS One*, **2012**, 7, 5, 11–13.
- [163] J. C. Ren, M. m. LaVail, *et al.*, Retinal Degeneration in the nervous Mutant Mouse . III . Electrophysiological Studies of the Visual Pathway. *Exp. Eye. Res.* **2000**, 70, 4, 467–473.
- [164] J. Li, Y. Ma, *et al.*, Purkinje neuron degeneration in nervous (nr) mutant mice is mediated by a metabolic pathway involving excess tissue plasminogen activator. *Proc. Natl. Sci.* **2006**, 103, 20, 7847–7852.
- [165] N. L. Hawes. R. E. Hurd. *et al.*, A New Mouse Model of Cone Photoreceptor Function Loss (Cpfl2). ARVO Annual Meeting Abstract in *IOVS*, **2003**, 44, 13, 4531.
- [166] N. L. Hawes. R. E. Hurd. *et al.*, A NEW MOUSE MODEL OF CONE PHOTORECEPTOR FUNCTION LOSS (Cpfl4). ARVO Annual Meeting Abstract in *IOVS*, **2004**, 45, 13, 3590.
- [167] N. L. Hawes, B. S. Harris, *et al.*, A New Mouse Model of Cone Photoreceptor Fuction Loss (cpfl7). ARVO Annual Meeting Abstract in *IOVS*, **2007**, 48, 13, 1350.
- [168] J. Won, L. Y. Shi, *et al.*, Mouse Model Resources for Vision Research. *J. Ophthalmol.* **2011**, 2011.
- [169] J. Weng, N. L. Mata, *et al.*, Insights into the Function of Rim Protein in Photoreceptors and Etiology of Stargardt's Disease from the Phenotype in abcr Knockout Mice. *Cell* **1999**, 98, 1, 13–23.
- [170] V. M. Sluch, A. Banks, *et al.*, ADIPOR1 is essential for vision and its RPE expression is lost in the Mfrp rd6 mouse. *Sci. Rep.*, **2018**, 8, 1, 1–17.
- [171] T. Giordano, S. Gadadhar, *et al.*, Loss of the deglutamylase CCP5 perturbs multiple steps of spermatogenesis and leads to male infertility. *J. Cell. Sci.* **2019**, 132, 23.
- [172] A. Chevallier, A. Mialot, *et al.*, Oculomotor Deficits in Aryl Hydrocarbon Receptor Null Mouse. *PLoS One*, **2013**, 8, 1.
- [173] A. R. Moye, R. Singh, *et al.*, ARL2BP , a protein linked to retinitis pigmentosa , is

- needed for normal photoreceptor cilia doublets and outer segment structure. *Mol. Biol. Cell.*, **2017**, 23, 13, 1590-1598.
- [174] Z. C. Wright, R. K. Singh, *et al.*, ARL3 regulates trafficking of prenylated phototransduction proteins to the rod outer segment. *Hum. Mol. Genet.*, **2016**, 25, 10, 2031–2044.
- [175] Q. Zhang, D. Nishimura, *et al.*, Bardet-Biedl syndrome 3 (Bbs3) knockout mouse model reveals common BBS-associated phenotypes and Bbs3 unique phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2011**, 108, 51, 20678-20683.
- [176] M. Kawasaki, Y. Izu, *et al.*, Bardet-Biedl Syndrome 3 regulates development of cranial base midline structures. *Bone*, **2017** 101, 179–190.
- [177] D. Y. Nishimura, M. Fath, *et al.*, Bbs2-null mice have neurosensory deficits , a defect in social dominance , and retinopathy associated with mislocalization of rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2004**, 101, 47, 2–7.
- [178] Y. Zhang, J. B. Stanton, *et al.*, Suppression of Ca²⁺ signaling in a mouse model of Best disease. *Hum. Mol. Genet.*, **2010**, 19, 6, 1108-1118.
- [179] G. N. Shah, B. Ulmasov, *et al.*, Carbonic anhydrase IV and XIV knockout mice : Roles of the respective carbonic anhydrases in buffering the extracellular space in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2005**, 102, 46, 16771, 16776.
- [180] C. Graf, S. Niwa, *et al.*, Wild-type levels of ceramide and ceramide-1-phosphate in the retina of ceramide kinase-like-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2008**, 373, 1, 159–163.
- [181] A. Garanto, J. Vicente-Tejedor, *et al.*, Targeted knockdown of Cerkl , a retinal dystrophy gene , causes mild affectation of the retinal ganglion cell layer. *Biochim. Biophys. Acta*, **2012**, 1822, 8, 1258–1269.
- [182] S. F. Geller, K. I. Meike, *et al.*, CLRN1 is nonessential in the mouse retina but is required for cochlear hair cell development. *PLoS Genet.*, **2009**, 5, 8, 17–19.
- [183] B. M. Kevany, N. Zhang, *et al.*, Animals deficient in C2Orf71, an autosomal recessive retinitis pigmentosa-associated locus, develop severe early-onset retinal degeneration. *Hum. Mol. Genet.*, **2015**, 24, 9, 2627–2640.
- [184] S. Hüttl, S. Michalakis, *et al.*, Impaired channel targeting and retinal degeneration in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel subunit CNGB1. *J. Neurosci.*, **2005**, 25, 1, 130–138.
- [185] S. A. Van De Pavert, J. Meuleman, *et al.*, A single amino acid substitution

- (Cys249Trp) in *Crb1* causes retinal degeneration and deregulates expression of pituitary tumor transforming gene *Pttg1*. *J. Neurosci.*, **2007**, 27, 3, 564–573.
- [186] N. M. Tran, A. Zhang, *et al.*, Mechanistically Distinct Mouse Models for CRX-Associated Retinopathy. *PLoS Genet.*, **2014**, 10, 2.
- [187] T. Furukawa, E. M. Morrow, *et al.*, Retinopathy and attenuated circadian entrainment in *Crx*-deficient mice. *Nat. Genet.*, **1999**, 23, 4, 466–470.
- [188] Y. Li, B. L. Lam, *et al.*, Photoreceptor degeneration in the DHDDSK42E/K42E mouse. ARVO Annual Meeting Abstract in *IOVS*, **2014**, 55, 13, 4371.
- [189] Y. Li, Z. Wang, *et al.*, Genetic Ablation of DHDDS in Photoreceptors in Mouse. ARVO Annual Meeting Abstract in *IOVS*, **2012**, 53, 14, 2582.
- [190] M. Karlstetter, N. Soroush, *et al.*, Disruption of the retinitis pigmentosa 28 gene *Fam161a* in mice affects photoreceptor ciliary structure and leads to progressive retinal degeneration. *Hum. Mol. Genet.*, **2014**, 23, 19, 5197–5210.
- [191] X. Liu, M. Zhao, *et al.*, Null mutation of the *Fascin2* Gene by TALEN leading to progressive hearing loss and retinal degeneration in C57BL/6J mice. *G3 Genes, Genomes, Genet.*, **2018**, 8, 10, 3221–3230.
- [192] C. L. Makino, I. V. Peshenko, *et al.*, A role for GCAP2 in regulating the photoresponse: Guanylyl cyclase activation and rod electrophysiology in *GUCA1B* knock-out mice. *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283, 43, 29135–29143.
- [193] A. V. Pshzhetsky, Lysosomal storage of heparan sulfate causes mitochondrial defects, altered autophagy, and neuronal death in the mouse model of mucopolysaccharidosis III type C. *Autophagy*, **2016**, 12, 6, 1059–1060.
- [194] A. S. Findlay, R. N. Carter, *et al.*, Mouse *Idh3a* mutations cause retinal degeneration and reduced mitochondrial function. *Dis. Model. Mech.*, **2018**, 11, 12.
- [195] P. R. Gupta, N. Pendse, *et al.*, *Ift172* conditional knock-out mice exhibit rapid retinal degeneration and protein trafficking defects. *Hum. Mol. Genet.*, **2018**, 27, 11, 2012–2024.
- [196] A. Aherne, A. Kennan, *et al.*, On the molecular pathology of neurodegeneration in IMPDH1-based retinitis pigmentosa. *Hum. Mol. Genet.*, **2004**, 13, 6, 641–650.
- [197] E. M. Salido and V. Ramamurthy. Proteoglycan IMPG2 shapes the interphotoreceptor matrix and modulates vision. *J. Neurosci.*, **2020**, 40, 20, 4059–4072.
- [198] P. K. Batten M.L, Imanishi *et al.*, Lecithin-retinol Acyltransferase Is Essential for

- Accumulation of All-trans-Retinyl Esters in the Eye and in the Liver. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 11, 10422–10432.
- [199] J. L. Duncan, M. M. LaVail, *et al.*, An RCS-like retinal dystrophy phenotype in Mer knockout mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2003**, 44, 2, 826–838.
- [200] M. J. Ochocinska, E. M. Muñoz, *et al.*, NeuroD1 is required for survival of photoreceptors but not pinealocytes: Results from targeted gene deletion studies. *J Neurochem*, **2012**, 123, 1, 44-59.
- [201] A. L. Webber, P. Hodor, *et al.*, Dual role of Nr2e3 in photoreceptor development and maintenance. *Exp. Eye Res.*, **2008**, 87, 1, 35–48.
- [202] L. L. Daniele, C. Lillo, *et al.*, Cone-like Morphological, Molecular, and Electrophysiological Features of the Photoreceptors of the Nrl Knockout Mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, **2005**, 46, 6, 2156-2167.
- [203] M. I. Ferrante, A. Zullo, *et al.*, Oral-facial-digital type I protein is required for primary cilia formation and left-right axis specification. *Nat. Genet.*, **2006**, 38, 1, 112–117.
- [204] K. Sakamoto, M. McCluskey, *et al.*, New mouse models for recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the Pde6a gene. *Hum. Mol. Genet.*, **2009**, 18, 1, 178–192.
- [205] J. H. Yeo, B. K. Jung, *et al.*, Development of a Pde6b gene knockout rat model for studies of degenerative retinal diseases. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2019**, 60, 5, 1519–1526.
- [206] D. J. Salchow, P. Gouras, *et al.*, A Point Mutation (W70A) in the Rod PDE γ Gene Desensitizing and Delaying Murine Rod Photoreceptors. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2009**, 40, 13, 3262–3267.
- [207] T. Wang, S. H. Tsang, *et al.*, Two pathways of rod photoreceptor cell death induced by elevated cGMP. *Hum. Mol. Genet.*, **2017**, 26, 12, 2299–2306.
- [208] J. Liu, S. L. Ball, *et al.*, A genetic model for muscle-eye-brain disease in mice lacking protein O-mannose 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase (POMGnT1). *Mech. Dev.*, **2006**, 123, 3, 228–240.
- [209] T. Ben-Ypsesf, G. Allon, *et al.*, Retinal Degeneration and Impaired Phagocytosis of Photoreceptor Outer Segment Discs in Procr-Knockout Mice. ARVO Annual Meeting Abstract in *IOVS*, **2019**, 60, 9, 2380.
- [210] J. J. Graziotto, M. H. Farkas, *et al.*, Three gene-targeted mouse models of RNA splicing factor RP show late-onset RPE and retinal degeneration. *Investig. Ophthalmol.*

- Vis. Sci.*, **2011**, 52, 1, 190–198.
- [211] J. J. Graziotto, C. F. Inglehearn, *et al.*, Decreased levels of the RNA splicing factor Prpf3 in mice and zebrafish do not cause photoreceptor degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2008**, 49, 9, 3830–3838.
- [212] C. Chen, L. Adler, *et al.*, Interphotoreceptor retinoid-binding protein removes all-trans-retinol and retinal from rod outer segments, preventing lipofuscin precursor formation. *J. Biol. Chem.*, **2017**, 292, 47, 19356–19365.
- [213] I. Kurth, D. A. Thompson, *et al.*, Targeted Disruption of the Murine Retinal Dehydrogenase Gene Rdh12 Does Not Limit Visual Cycle Function. *Mol. Cell. Biol.*, **2007**, 27, 4, 1370–1379.
- [214] S. A. Agrawal, T. Burgoyne, *et al.*, REEP6 deficiency leads to retinal degeneration through disruption of ER homeostasis and protein trafficking. *Hum. Mol. Genet.*, **2017**, 26, 14, 2667–2677.
- [215] T. Maeda, J.P. Van Hooser, *et al.*, Evaluation of the role of the retinal G protein-coupled receptor (RGR) in the vertebrate retina in vivo. *J Neurochem*, **2003**, 85, 4, 944–956.
- [216] S. Sakami, A. V. Kolesnikov, *et al.*, P23H opsin knock-in mice reveal a novel step in retinal rod disc morphogenesis,” *Hum. Mol. Genet.*, **2014**, 23, 7, 1723–1741.
- [217] D. L. Greenwald, S. M. Cashman, *et al.*, Mutation-independent rescue of a novel mouse model of Retinitis Pigmentosa. *Gene Ther.*, **2013**, 20, 4, 425–434.
- [218] A. K. Gross, G. Decker, *et al.*, Defective development of photoreceptor membranes in a mouse model of recessive retinal degeneration. *Vision Res.*, **2006**, 46, 27, 4510–4518.
- [219] I. M. Sandoval, B. A. Price, *et al.*, Abrupt onset of mutations in a developmentally regulated gene during terminal differentiation of post-mitotic photoreceptor neurons in mice. *PLoS One*, **2014**, 9, 9.
- [220] G. B. Jaissle, C. A. May, *et al.*, Evaluation of file rhodopsin knockout mouse as a model of pure cone function. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2001**, 42, 2, 506–513.
- [221] J. C. Saari, M. Nawrot, *et al.*, Visual cycle impairment in cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) knockout mice results in delayed dark adaptation. *Neuron*, **2001**, 29, 3, 739–748.
- [222] G. Clarke, A. F. X. Goldberg, *et al.*, Rom-1 is required for rod photoreceptor viability and the regulation of disk morphogenesis. *Nat. Genet.*, **2000**, 25, 1, 67–73.

- [223] Q. Liu, R. W. J. Collin, *et al.*, Expression of wild-type Rp1 protein in Rp1 knock-in mice rescues the retinal degeneration phenotype. *PLoS One*, **2012**, 7, 8.
- [224] J. Liu, Q. Huang, *et al.*, Distinct gene expression profiles and reduced JNK signaling in retinitis pigmentosa caused by RP1 mutations. *Hum. Mol. Genet.*, **2005**, 14, 19, 2945–2958.
- [225] J. Zuo, J. Liu, *et al.*, RP1L1 Is Required for Appropriate Outer Segment Formation. ARVO Annual Meeting Abstract in *IOVS*, **2006**, 47, 13, 4749.
- [226] L. Li, N. Khan, *et al.*, Ablation of the X-linked retinitis pigmentosa 2 (Rp2) gene in mice results in opsin mislocalization and photoreceptor degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2013**, 54, 7, 4503–4511.
- [227] M. Samardzija, J. von Lintig, *et al.*, R91W mutation in Rpe65 leads to milder early-onset retinal dystrophy due to the generation of low levels of 11-cis-retinal. *Hum. Mol. Genet.*, **2008**, 17, 2, 281–292.
- [228] B. Rohrer, H. R. Lohr, *et al.*, Cone opsin mislocalization in Rpe65^{-/-} mice: A defect that can be corrected by 11-cis retinal. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2005**, 46, 10, 3876–3882.
- [229] D. H. Hong, B. S. Pawlyk, *et al.*, A retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-deficient mouse model for X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2000**, 97, 7, 3649–3654.
- [230] J. Krishnan, J. Chen, *et al.*, Gene expression profiling of light-induced retinal degeneration in phototransduction gene knockout mice. *Exp. Mol. Med.*, **2008**, 40, 5, 495–504.
- [231] D. S. Rice, W. Huang, *et al.*, Severe retinal degeneration associated with disruption of semaphorin 4A. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2004**, 45, 8, 2767–2777.
- [232] Z. B. Jin, X. F. Huang, *et al.*, SLC7A14 linked to autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat. Commun.*, **2014**, 5, 3517.
- [233] A. Pascarella, G. Ferrandino, *et al.*, DNAJC17 is localized in nuclear speckles and interacts with splicing machinery components. *Sci. Rep.*, **2018**, 8, 1, 1–13.
- [234] H. Zhong, A. Eblimit, *et al.*, AAV8(Y733F)-mediated gene therapy in a Spata7 knockout mouse model of Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa. *Gene Ther.*, **2015**, 22, 8, 619–627.
- [235] V. Kretschmer, S. R. Patnaik, *et al.*, Progressive characterization of visual phenotype in bardet-biedl syndrome mutant mice,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2019**, 60, 4,

- 1132–1143.
- [236] H. Marshall, M. Bhaumik, *et al.*, Deficiency of the dual ubiquitin/SUMO ligase Topors results in genetic instability and an increased rate of malignancy in mice. *BMC Mol. Biol.*, **2010**, 11, 31.
- [237] S. A. Hagstrom, M. Duyao, *et al.*, Retinal Degeneration in *tulp1*^{-/-} Mice: Vesicular Accumulation in the Interphotoreceptor Matrix. *Invest. Ophthalmol.*, **1999**, 40, 12, 2795–2802.
- [238] X. Liu, O. V. Bulgakov, *et al.*, Usherin is required for maintenance of retinal photoreceptors and normal development of cochlear hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2007**, 104, 11, 4413–4418.
- [239] M. Riera, D. Burguera, *et al.*, CERKL Knockdown Causes Retinal Degeneration in Zebrafish. *PLoS One*, **2013**, 8, 5, 1–12.
- [240] S. Yu, C. Li, *et al.*, “CERKL gene knockout disturbs photoreceptor outer segment phagocytosis and causes rod-cone dystrophy in zebrafish. *Hum. Mol. Genet.*, **2017**, 26, 12, 2335–2345.
- [241] X. Hu, Z. Lu, *et al.*, CERKL regulates autophagy via the NAD-dependent deacetylase SIRT1. *Autophagy*, **2019**, 15, 3, 453–465.
- [242] D. A. Parfitt, A. Lane, *et al.*, Identification and Correction of Mechanisms Underlying Inherited Blindness in Human iPSC-Derived Optic Cups. *Cell Stem Cell*, **2016**, 18, no. 6, 769–781.
- [243] L. P. Foltz and D. O. Clegg, Patient-derived induced pluripotent stem cells for modelling genetic retinal dystrophies. *Prog. Retin. Eye Res.*, **2019**, 68, 54–66.
- [244] A. Artero Castro, D. Lukovic, *et al.*, Concise Review: Human Induced Pluripotent Stem Cell Models of Retinitis Pigmentosa. *Stem Cells*, **2018**, 36, 4, 474–481.
- [245] K. J. Wahlin, J. Maroutti, *et al.*, Modeling Retinal Dystrophies Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2014**, 801, 157–164.
- [246] B. A. Tucker, R. F. Mullins, *et al.*, Patient-specific iPSC-derived photoreceptor precursor cells as a means to investigate retinitis pigmentosa. *Elife*, **2013**, 2, 1–18.
- [247] L. A. Wiley, E. R. Burnight, *et al.*, Patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) for the study and treatment of retinal degenerative diseases. *Prog. Retin. Eye Res.*, **2014**, 44, 15-35.
- [248] S.Reichman, A. Slembrouck, *et al.*, Generation of Storable Retinal Organoids and Retinal Pigmented Epithelium from Adherent Human iPS Cells in Xeno-Free and

- Feeder-Free Conditions. *Stem Cells*, **2017**, 35, 5, 1176-1188.
- [249] J. Lakowski, A. Gonzalez-Cordero, *et al.*, Transplantation of Photoreceptor Precursors Isolated via a Cell Surface Biomarker Panel From Embryonic Stem Cell-Derived Self-Forming Retina. *Stem Cells*, **2015**, 33, 8, 2469-2482
- [250] A. V. Garafalo, A. V. Cideciyan, *et al.*, Progress in treating inherited retinal diseases: Early subretinal gene therapy clinical trials and candidates for future initiatives. *Prog. Retin. Eye Res.*, **2019**, 100827.
- [251] I. Vázquez-Domínguez, A. Garanto, *et al.*, Molecular Therapies for Inherited Retinal Diseases—Current Standing, Opportunities and Challenges. *Genes.*, **2019**, 10, 9, 654.
- [252] A. Arbabi, A. Liu, *et al.*, Gene Therapy for Inherited Retinal Degeneration. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **2019**, 35, 2, 79–97.
- [253] V. Miraldi Utz, R. G. Coussa, *et al.*, Gene therapy for RPE65-related retinal disease. *Ophthalmic Genet.*, **2018**, 39, 6, 671–677.
- [254] D. Benati, C. Patrizi, *et al.*, Gene editing prospects for treating inherited retinal diseases. *J. Med. Genet.*, **2019**, 1–8.
- [255] M. L. Maeder, M. Stefanidakis, *et al.*, Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat. Med.*, **2019**, 25, 2, 229–233.
- [256] M. Diakatou, G. Manes, *et al.*, Genome editing as a treatment for the most prevalent causative genes of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Int. J. Mol. Sci.*, **2019**, 20, 10, 1–22.
- [257] M. P. Simunovic, W. Shen, *et al.*, Optogenetic approaches to vision restoration,” *Exp. Eye Res.*, **2019**, 178, 15–26.
- [258] A. Garanto, RNA-Based Therapeutic Strategies for Inherited Retinal Dystrophies. *Retinal Degenerative Diseases*, **2019**, pp. 71–77.
- [259] G. Tanner, E. Glaus, *et al.*, Therapeutic strategy to rescue mutation-induced exon skipping in rhodopsin by adaptation of U1 snRNA. *Hum. Mutat.*, **2009**, 30, 2, 255–263.
- [260] A. Berger, S. Lorain, *et al.*, Repair of rhodopsin mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing: A new approach for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol. Ther.*, **2015**, 23, 5, 918–930.
- [261] M. O'Reilly, A. Palfi, *et al.*, RNA interference-mediated suppression and replacement of human rhodopsin in vivo. *Am. J. Hum. Genet.*, **2007**, 81, 1, 127–135.

- [262] S. Naessens, L. Ruyschaert, *et al.*, Antisense Oligonucleotide-Based Downregulation of the G56R Pathogenic Variant Causing NR2E3-Associated Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Genes*, **2019**, 10, 5, 363.
- [263] Y. Peng, L. Tang, *et al.*, Subretinal Injection: A Review on the Novel Route of Therapeutic Delivery for Vitreoretinal Diseases. *Ophthalmic Res.*, **2017**, 58, 4, 217–226.
- [264] M. F. Naso, B. Tomkowicz, *et al.*, Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy,” *BioDrugs*, **2017**, 31, 4, 317–334.
- [265] Y. K. Sung and S. W. Kim. Recent advances in the development of gene delivery systems. *Biomater. Res.*, **2019**, 23, 1, 1–7.
- [266] M. G. Kearse and J. E. Wilusz. Non-AUG translation: A new start for protein synthesis in eukaryotes. *Genes Dev.*, **2017**, 31, 17, 1717–1731.
- [267] N. A. Mandal, J. T. A. Tran, *et al.*, Expression and Localization of CERKL in the Mammalian Retina, its Response to Light-Stress, and Relationship with NeuroD1 Gene. *Exp. Eye Res.*, **2013**, 106, 24–33.
- [268] C. DeVera and G. Tosini. Circadian analysis of the mouse retinal pigment epithelium transcriptome. *Exp. Eye Res.*, **2020**, 193, 107988.
- [269] L. Han, Y. Yuan, *et al.*, The Pan-Cancer analysis of pseudogene expression reveals biologically and clinically relevant tumour subtypes. *Nat. Commun.*, **2014**, 5, 1–9.
- [270] W. P. Schreiner, D. C. Pagliuso, *et al.*, Remodeling of the *Caenorhabditis elegans* non-coding RNA transcriptome by heat shock. *Nucleic Acids Res.*, **2019**, 47, 18, pp. 9829–9841.
- [271] S. Kalyana-Sundaram, C. Kumar-Shina, *et al.*, Expressed Pseudogenes in the Transcriptional Landscape of Human Cancers. *Cell*, **2012**, 127, 7, 358–366.
- [272] A. Bolinches-Amorós, M. León, *et al.*, Generation of an iPSC line from a retinitis pigmentosa patient carrying a homozygous mutation in CERKL and a healthy sibling. *Stem Cell Res.*, **2019**, 38, 101455.
- [273] V. Toulis, A. Garanto, *et al.*, Combining Zebrafish and Mouse Models to Test the Function of Deubiquitinating Enzyme (Dubs) Genes in Development: Role of USP45 in the Retina. *Proteostasis: Methods and Protocols*, R. Matthiesen, Ed. New York, NY: Springer New York, **2016**, pp. 85–101.
- [274] M. D. Robinson, D. J. McCarthy, *et al.*, edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, **2010**,

- 26, 1, 139–140.
- [275] M. I. Love, W. Huber, *et al.*, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.*, **2014**, 15, 12, 1–21.
- [276] D. W. Huang, B. T. Sherman, *et al.*, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.*, **2009**, 4, 1, 44–57.
- [277] K. Fujinami, R. W. Strauss, *et al.*, Detailed genetic characteristics of an international large cohort of patients with Stargardt disease: ProgStar study report 8. *Br. J. Ophthalmol.*, **2019**, 103, 3, 390–397.
- [278] A. Rodríguez-Muñoz, E. Aller, *et al.*, Expanding the Clinical and Molecular Heterogeneity of Nonsyndromic Inherited Retinal Dystrophies. *J. Mol. Diagnostics*, **2020**, 22, 4, 532–543.
- [279] J. R. Dixon, S. Selvaraj, *et al.*, Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, **2012**, 485, 7398, 376–380.
- [280] N. Pan, I. Jahan, *et al.*, Defects in the cerebella of conditional Neurod1 null mice correlate with effective Tg(Atoh1-cre) recombination and granule cell requirements for Neurod1 for differentiation. *Cell Tissue Res.*, **2009**, 337, 3, 407–428.
- [281] F. J. Naya, H. P. Hunag, *et al.*, Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/NeuroD-deficient mice. *Genes Dev.*, **1997**, 11, 18, 2323–2334.
- [282] R. Kaewkhaw, K. D. Kaya, *et al.*, Transcriptome Dynamics of Developing Photoreceptors in Three-Dimensional Retina Cultures Recapitulates Temporal Sequence of Human Cone and Rod Differentiation Revealing Cell Surface Markers and Gene Networks. *Stem Cells*, **2015**, 33, 12, 3504–3518.
- [283] T. Kuwabara, J. Hsieh, *et al.*, Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci*, **2009**, 12, 9, 1097–1105.
- [284] S. Zahid, K. Branham, *et al.*, CERKL in *Retinal Dystrophy Gene Atlas*, Cham: Springer International Publishing, **2018**, pp. 51–53.
- [285] K. H. C. Wu, M. C. Madigan, *et al.*, Differential expression of GFAP in early v late AMD: A quantitative analysis. *Br. J. Ophthalmol.*, **2003**, 87, 9, 1159–1166.
- [286] S. M. Conley and M. I. Naash. Gene therapy for PRPH2-Associated ocular disease: Challenges and prospects. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **2014**, 4, 11, 1–15.
- [287] A. Churbanov, S. Winters-Hilt, *et al.*, Accumulation of GC donor splice signals in mammals. *Biol. Direct*, **2008**, 3, 9–12.

- [288] I. Nijholt, N. Farchi, *et al.*, Stress-induced alternative splicing of acetylcholinesterase results in enhanced fear memory and long-term potentiation. *Mol. Psychiatry*, **2004**, 9, 2, 174–183.
- [289] N. Whiffin, K. J. Karczewski, *et al.*, Characterising the loss-of-function impact of 5' untranslated region variants in 15,708 individuals. *BioRxiv*, **2020**, 1–12.
- [290] J. E. Vance. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond. *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, 1841 4, 595–609.
- [291] S. Marchi, S. Patergnani, *et al.*, The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: One touch, multiple functions. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2014**, 1837, 4, 461–469.
- [292] L. Donato, C. Scimone, *et al.*, Stargardt phenotype associated with two ELOVL4 promoter variants and ELOVL4 downregulation: New possible perspective to etiopathogenesis?. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2018, 59, 2, 843–857.
- [293] M. P. Agbaga, D. K. Merriman, *et al.*, Differential composition of DHA and very-long-chain PUFAs in rod and cone photoreceptors. *J. Lipid Res.*, **2018**, 59, 9, 1586–1596.
- [294] Y. Arribat, D. Grepper, *et al.*, Spastin mutations impair coordination between lipid droplet dispersion and reticulum. *PLOS Genet.*, **2020**, 16, 4, e1008665.
- [295] M. Cai, J. He, *et al.*, Phospholipase D1-regulated autophagy supplies free fatty acids to counter nutrient stress in cancer cells. *Cell Death Dis.*, **2016**, 7, 11, 1–10.
- [296] V. Bermúdez, P. E. Tenconi, *et al.*, Lipopolysaccharide-induced autophagy mediates retinal pigment epithelium cells survival. Modulation by the phospholipase d pathway. *Front. Cell. Neurosci.*, **2019**, 13, 1–15.
- [297] D. M. G. Anderson , Z. Ablonczy, *et al.*, High resolution MALDI imaging mass spectrometry of retinal tissue lipids. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2014**, 25, 8, 1394–1403.
- [298] P. Foroozandeh and A. A. Aziz. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett.*, **2018**, 13, 1, 339.
- [299] B. Yameen; W. I. Choi; *et al.*, Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *J Control Release.*, **2014**, 190, 485-499.
- [300] J. Rejman, M. Conese, *et al.*, Gene Transfer by Means of Lipo- and Polyplexes : Role of Clathrin and Caveolae-Mediated Endocytosis Gene Transfer by Means of Lipo- and Polyplexes : Role of Clathrin and Caveolae-Mediated. *J. Liposome Res.*, **2008**,

2104.

- [301] M. Agirre, E. Ojeda, *et al.*, New Insights into Gene Delivery to Human Neuronal Precursor NT2 Cells: A Comparative Study between Lipoplexes, Nioplexes, and Polyplexes. *Mol. Pharm.*, **2015**, 12, 11, 4056–4066.
- [302] J. Soriano, A. Villanueva, *et al.*, Vehiculization determines the endocytic internalization mechanism of Zn(II)-phthalocyanine. *Histochem. Cell Biol.*, **2013**, 139, 1, 149–160.
- [303] E. Girard, J. L. Paul, *et al.*, The Dynamin Chemical Inhibitor Dynasore Impairs Cholesterol Trafficking and Sterol-Sensitive Genes Transcription in Human HeLa Cells and Macrophages. *PLoSOne*, **2011**, 6, 12.
- [304] G. Preta, J. G. Cronin, *et al.*, Dynasore - not just a dynamin inhibitor. *Cell Commun. Signal.*, **2015**, 13, 24, 1–7.
- [305] J. Zhang, D. Chang, *et al.*, Systematic investigation on the intracellular trafficking network of polymeric nanoparticles, *Nanoscale*, **2017**, 9, 9, 3269–3282.
- [306] M. G. Christianson and D. C. Lo. Development of a low-pressure microtargeting biolistic device for transfection of retinal explants. *Mol. Vis.*, **2011**, 17, pp. 2947–2955.
- [307] B. K. Franke and A. Vlasits. Unblinding with infrared nanosensors. *Science.*, **2020** 368, 6495.
- [308] D. Nelidova, R. K. Morikawa, *et al.*, Restoring light sensitivity using tunable near-infrared sensors.,” *Science*, **2020**, 368, 6495, 1108–1113.

