



**FACULTAD DE CIENCIAS**  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

# IMPLEMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA PARA LA ELABORACIÓN DE NUEVOS ALGORITMOS DIAGNÓSTICOS E IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS GENES EN DISTROFIAS DE RETINA

---

**TESIS DOCTORAL**  
Raquel Pérez Carro

MADRID 2017





**FACULTAD DE CIENCIAS**  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

# IMPLEMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA PARA LA ELABORACIÓN DE NUEVOS ALGORITMOS DIAGNÓSTICOS E IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS GENES EN DISTROFIAS DE RETINA

---

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA  
MOLECULAR, BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA**

Raquel Pérez Carro

TRABAJO DIRIGIDO POR

Dra. Carmen Ayuso y Dra. Almudena Ávila

REALIZADO EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

MADRID 2017







Dña. CARMEN AYUSO, jefa del Departamento de Genética del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz y Directora Científica del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz,

Dña. ALMUDENA ÁVILA FERNÁNDEZ, adjunto Departamento de Genética del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “Implementación de las técnicas de secuenciación masiva para la elaboración de nuevos algoritmos diagnósticos e identificación de nuevos genes en Distrofias de Retina”, que presenta Dña. Raquel Pérez Carro para obtener el Grado de Doctor, ha sido realizada bajo nuestra dirección, autorizándola para su presentación al Tribunal Calificador.

Madrid, 03 de marzo de 2017

Fdo. Dra. Carmen Ayuso García

Directora de la Tesis Doctoral

Fdo. Dña. Almudena Ávila Fernández

Directora de la Tesis Doctoral

Fdo. Dña. Lourdes Ruíz Desviat

Tutora de la Tesis Doctoral



# Índice

---

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>Introducción</b>	<b>5</b>
1.1 Estructura del globo ocular . . . . .	5
1.2 La retina . . . . .	5
1.2.1 Anatomía y fisiología . . . . .	5
1.2.2 Ciclo visual . . . . .	8
1.2.3 Fototransducción . . . . .	9
1.3 Distrofias de retina . . . . .	10
1.3.1 Retinosis pigmentaria . . . . .	11
1.4 Diagnóstico molecular de la retinosis pigmentaria . . . . .	15
1.5 Aproximaciones terapéuticas . . . . .	18
<b>Objetivos</b>	<b>21</b>
<b>Resultados</b>	<b>23</b>
3.1 Nueva asociación del gen <i>ABHD12</i> a RP no sindrómica . . . . .	23
3.2 Identificación de un nuevo gen, <i>ZNF408</i> , como causa de arRP . . . . .	33
3.3 Estudio molecular de pacientes afectados de retinosis pigmentaria autosómica recesiva o esporádica mediante un panel de genes . . . . .	49
<b>Discusión</b>	<b>65</b>
4.1 Datos globales obtenidos mediante WES . . . . .	65
4.1.1 Nueva asociación del gen <i>ABHD12</i> a RP no sindrómica . . . . .	66
4.1.2 Identificación de un nuevo gen, <i>ZNF408</i> como causa de arRP . . . . .	69
4.2 Datos globales obtenidos mediante secuenciación dirigida . . . . .	72
4.3 Perspectivas futuras . . . . .	77
<b>Conclusiones</b>	<b>81</b>
<b>Conclusions</b>	<b>83</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>83</b>
<b>Clave de abreviaturas</b>	<b>97</b>
<b>Anexo I</b>	<b>99</b>
<b>Anexo II</b>	<b>103</b>





## Índice de figuras

---

1.1	Estructura del globo ocular y sección transversal de la retina . . . . .	6
1.2	Fotorreceptores . . . . .	7
1.3	Ciclo visual . . . . .	9
1.4	Cascada de fototransducción . . . . .	10
1.5	Diagrama de genes asociados a distrofias de retina . . . . .	11
1.6	Pruebas oftalmológicas utilizadas en el diagnóstico de RP . . . . .	13
1.7	Algoritmo clásico de análisis utilizado en NGS . . . . .	17
4.8	Mutaciones descritas en el gen ZNF408 . . . . .	69
4.9	Nuevo algoritmo de estudio propuesto en distrofias de retina . . . . .	78





## Resumen

---

Las distrofias hereditarias de la retina son un conjunto de enfermedades degenerativas y generalmente progresivas, causadas por la afectación de los fotorreceptores y del epitelio pigmentario de la retina. Debido a su baja prevalencia en la población, las distrofias de retina pertenecen a las definidas como enfermedades raras. La retinosis pigmentaria es la distrofia de retina más común, cuya prevalencia aproximada es de 1 en 4000 individuos. Se caracteriza por una afectación primaria de los bastones siendo la ceguera nocturna el primer síntoma, seguido de una pérdida progresiva del campo visual periférico y una disminución progresiva de la visión central debida a la afectación secundaria de los conos.

La retinosis pigmentaria presenta una elevada heterogeneidad tanto clínica como genética. En los últimos años se han descrito más de 90 genes como causa de RP no sindrómica y, a pesar de que las funciones de algunos de estos genes han sido estudiadas de forma exhaustiva es difícil establecer una precisa correlación genotipo-fenotipo.

Esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio de familias de nuestra cohorte española afectadas de retinosis pigmentaria con un patrón de herencia autosómico recesivo o esporádico mediante la utilización y combinación de distintas técnicas de secuenciación masiva. Los estudios de secuenciación de exoma completo han permitido establecer una nueva asociación del gen *ABHD12* a retinosis pigmentaria no sindrómica, previamente reportado en síndrome de PHARC ampliando así el espectro fenotípico del mismo. Además se ha identificado un nuevo gen, *ZNF408* como causa de retinosis pigmentaria autosómica recesiva en dos familias, demostrando su implicación tanto en el mantenimiento de la retina así como en el desarrollo vascular. Asimismo, se ha desarrollado una aproximación de secuenciación masiva dirigida basada en un panel de 75 genes previamente asociados a distrofias de retina, con la cual se han caracterizado 27 de las 47 familias estudiadas, obteniendo una tasa diagnóstica del 57%. Se han identificado 33 mutaciones patogénicas, 20 de las cuales (61%) eran nuevas y estaban localizadas en los genes *ABCA4*, *CERKL*, *CNGA1*, *EYS*, *PDE6A*, *PRCD*, *RDH12*, *RP1*, *RP2* y *USH2A*. Adicionalmente, se han identificado tres grandes deleciones en los genes *EYS* y *USH2A*, demostrando el enorme potencial de estas tecnologías, no sólo en la detección de mutaciones puntuales sino también de grandes reordenamientos.

Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto que la capacidad diagnóstica de enfermedades tan heterogéneas tanto clínica como genéticamente como son las distrofias de retina, se ha incrementado considerablemente con el desarrollo de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva habiendo demostrado ser una aproximación eficiente y fiable. Esto facilita la caracterización genética de las familias afectadas lo que resulta de gran importancia a la hora de proporcionar un diagnóstico preciso y un adecuado asesoramiento genético. Adicionalmente, estos estudios de NGS ayudarán al desarrollo de la medicina personalizada y permitirán la inclusión de estos pacientes afectados en futuras aproximaciones terapéuticas.





# Abstract

---

Inherited retinal dystrophies are a group of degenerative and usually progressive diseases, caused by degeneration of photoreceptors and retinal pigment epithelium. Because of their low prevalence among population, they are considered within the rare diseases group. Retinitis pigmentosa is the most common inherited retinal dystrophy, with a prevalence of approximately 1 in 4000 individuals. It is characterized by primary degeneration of the rods, the night blindness being the first symptom, followed by a progressive loss of the peripheral vision field and a progressive decrease of central vision due to the secondary degeneration of the cones.

Retinitis pigmentosa is heterogeneous both genetically and clinically. In recent years more than 90 genes have been described as cause of non-syndromic retinitis pigmentosa and, although the functions of some of these genes have been extensively studied, it remains difficult to establish a precise genotype-phenotype correlation.

This thesis has been focused on the study, using a combination of next-generation sequencing technologies, of families from our Spanish cohort affected by retinitis pigmentosa with an autosomal recessive or sporadic inheritance pattern. Whole exome sequencing studies have allowed us to establish a new phenotypic association of the *ABHD12* gene to non-syndromic retinitis pigmentosa, previously associated with PHARC syndrome, expanding the phenotypic spectrum of this gene. On the other hand, WES studies have allowed the identification of *ZNF408*, a new candidate gene as a cause of autosomal recessive retinitis pigmentosa in two Spanish families, demonstrating its involvement in both retinal maintenance and vascular development. Additionally, a targeted NGS approach based on a panel of 75 genes previously associated with retinal dystrophies was developed. Twenty seven out of the 47 families studied have been characterized reaching a diagnostic rate of 57% and 33 pathogenic mutations were identified. Twenty of which (61%), localized in the *ABCA4*, *CERKL*, *CNGA1*, *EYS*, *PDE6A*, *PRCD*, *RDH12*, *RP1*, *RP2* and *USH2A* genes, were novel. Furthermore, three large deletions have been identified in the *EYS* and *USH2A* genes, demonstrating the potential of these technologies, in the detection not only of point mutations but also of large rearrangements.

This work demonstrates that the diagnosis rate of retinal dystrophies, a clinically and genetically heterogeneous group of diseases, has considerably increased with the development of next-generation sequencing technologies, which become more efficient and reliable for genetic characterization. Such approach facilitates the genetic characterization of affected families, which is crucial for providing precise diagnosis and proper genetic counseling. Additionally NGS will help in the development of personalized medicine and will allow affected patients for their inclusion in future therapeutic approaches.



# Introducción

---

La visión es uno de los sistemas de neuropercepción más sofisticados que existen, siendo una actividad muy compleja que se inicia en el globo ocular. La luz atraviesa los distintos componentes del segmento anterior del ojo produciéndose aquí las primeras refracciones. Finalmente, llega a la retina donde se transforma en potencial de acción neuronal y éste es transmitido a través del nervio óptico hasta la corteza visual del cerebro para allí ser interpretado.

## 1.1 Estructura del globo ocular

Anatómicamente, el globo ocular (*Figura 1.1*) está formado por tres capas que se disponen concéntricamente (Caviedes et al., 1991; Pulido, 2002; Kanski and Bowling, 2011):

- a) La capa externa o túnica fibrosa que se compone de tejido fibroso denso y tiene una función protectora y estructural. La parte posterior se denomina esclera o esclerótica, mientras que una pequeña porción de la parte anterior, es la denominada córnea. Histológicamente, la córnea presenta una mayor transparencia y ausencia de vascularización. Es la capa donde se produce la primera refracción, y se encuentra recubriendo el iris y la pupila que regulan la entrada de luz en el ojo.
- b) La capa intermedia o túnica vascular que está constituida por la coroides y proporciona oxígeno y nutrientes a la retina.
- c) La capa interna o túnica neurosensorial que se compone de la retina y se extiende desde los músculos ciliares hasta la parte posterior. Es un tejido muy especializado, donde se encuentran los fotorreceptores y se lleva a cabo el proceso de la fototransducción (*véase Apartado 1.2*).

En el interior del globo ocular se encuentran dos componentes esenciales. El cristalino, una lente biconvexa que se sitúa entre el iris y los músculos ciliares, y nos permite definir la profundidad de campo, y el humor vítreo que se encuentra ocupando toda la cámara interior y está constituido principalmente por agua y una pequeña proporción de proteínas y mucopolisacáridos que le proporcionan elasticidad y viscosidad.

## 1.2 La retina

### 1.2.1 Anatomía y fisiología

La retina es un órgano muy complejo perteneciente al sistema nervioso central, con una estructura estratificada que se compone de epitelio pigmentario de la retina (EPR), capas neuronales y membranas limitantes externa e interna (*Figura 1.1*) (Ramón y Cajal, 1893).

El EPR, localizado en la capa más externa de la retina, corresponde a un epitelio monoestratificado que se encuentra separado de la coroides por la membrana de Bruch. Estas células epiteliales se encuentran también en contacto directo con el segmento externo de los fotorreceptores a través de sus microvellosidades. Entre sus funciones principales se encuentran el aporte de nutrientes, reciclaje de los discos de los segmentos externos por fagocitosis y digestión lisosomal, secreción de factores de crecimiento necesarios para la

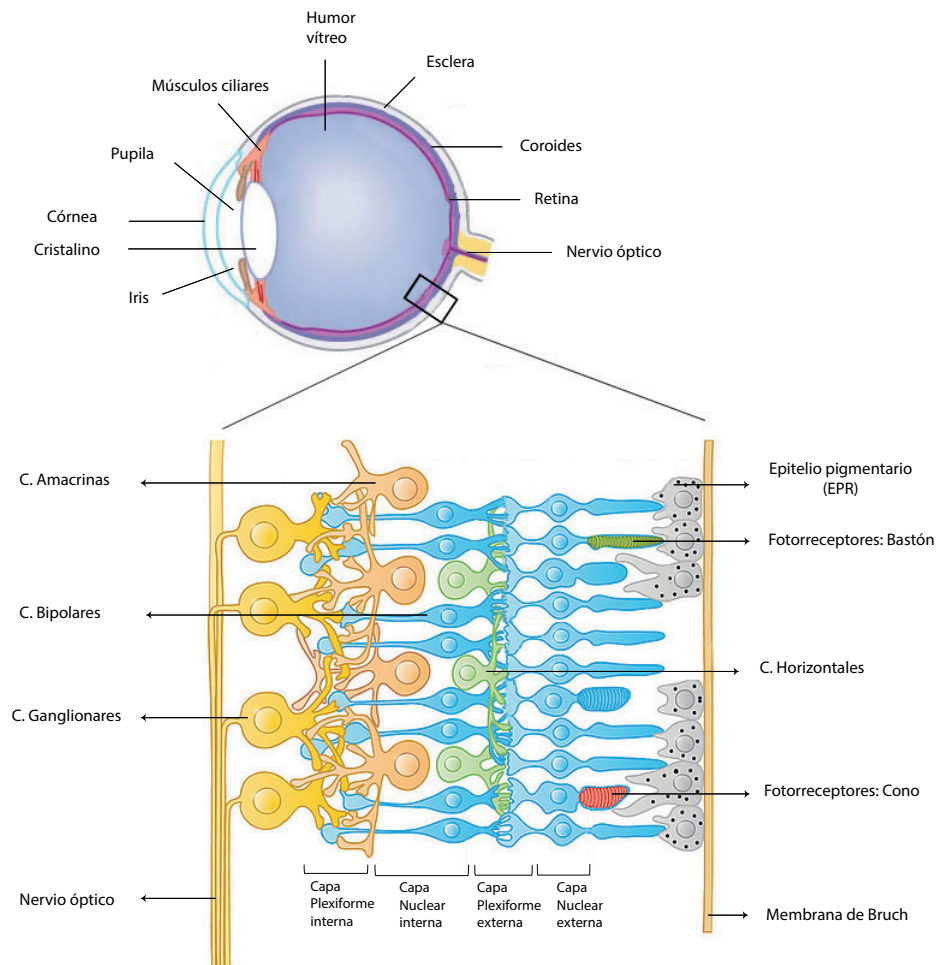


Figure 1.1: Estructura del globo ocular y sección transversal de la retina. Se muestran detalladamente todas las capas que componen la retina: epitelio pigmentario (EPR), capas neuronales y membranas limitantes externa e interna. Modificada del libro Markl Biologie, Ernst Klett Verlag, 2011.

integridad de la retina o la participación en el ciclo de la vitamina A (Young and Bok, 1969; Nicoletti et al., 1995).

Dentro de la capa neuronal se pueden distinguir distintos subtipos celulares que se distribuyen a su vez en distintas capas perfectamente delimitadas (Müller and Peichl, 1989). Existen dos capas nucleares, en primer lugar la capa nuclear externa formada por los núcleos de los fotorreceptores que son las células fotosensibles de la retina, y la capa nuclear interna formada por los núcleos de las células bipolares, células horizontales y células amacrinas. Adicionalmente, las capas nucleares se encuentran separadas por dos capas plexiformes: i) la externa donde tiene lugar la sinapsis entre fotorreceptores y células horizontales y bipolares. Las células bipolares son neuronas glutamatérgicas que establecen sinapsis con los fotorreceptores y células horizontales emitiendo sus axones hasta la capa plexiforme interna, y las células horizontales son neuronas gabaérgicas que forman sinapsis tripartitas o triadas entre conos, bastones y células bipolares, y ii) la interna donde se produce la sinapsis entre células amacrinas, que son interneuronas anaxónicas y moduladoras, células bipolares y ganglionares. Por último se encuentra la capa de células

ganglionares cuyos axones conforman el nervio óptico (*Figura 1.1*) (Urtubia Vicario, 1999).

Como se ha mencionado anteriormente, una de las células principales de la retina son los fotorreceptores que son las células que se van a encargar de transformar la energía lumínica en potencial eléctrico mediante el proceso de la fototransducción. Se han descrito uniones entre ellos que podrían resultar de gran importancia en los procesos de adaptación a la luz y oscuridad (Sterling et al., 1987). Éstos se subdividen en bastones y conos (*Figura 1.2*) y se diferencian entre sí tanto estructural como funcionalmente, aunque ambos tienen una estructura básica común: i) segmento externo, donde se localizan los pigmentos y comienza el proceso de fototransducción, ii) segmento interno, tiene funciones metabólicas y de síntesis de proteínas. Presenta un gran número de mitocondrias que generan la energía necesaria para la fototransducción, iii) cilio conector que sirve de transporte entre ambos segmentos y iv) terminación sináptica a través de la cual se realiza la sinapsis con las células horizontales o bipolares (Masland, 2001).

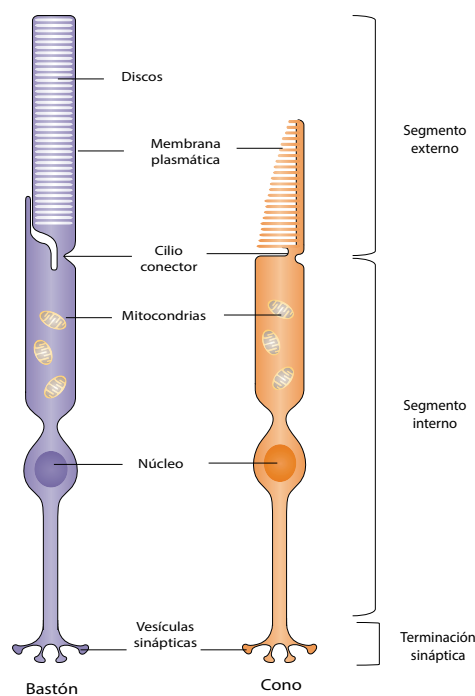


Figure 1.2: Fotorreceptores. Estructura de bastones y conos. Modificada de Wright et al, 2010.

Los bastones se encuentran a lo largo de toda la retina periférica, representando el 95% del total de los fotorreceptores. Son los encargados de la visión nocturna y en blanco y negro, y presentan un único fotorreceptor (escotopsina), la rodopsina, localizada en los discos membranosos aislados del segmento externo. Los conos se localizan principalmente en la región central de la retina, denominada mácula, representando sólo el 5% y se encargan de la visión diurna y en color y dependiendo del tipo de fotorreceptor (fotopsinas) presente en sus invaginaciones del segmento externo, se pueden subdividir en azules, verdes y rojos. En función de la longitud de onda en la que tienen su máximo de absorción estas opsinas (azul 437nm, verde 533nm y rojo 564nm) cada tipo de cono se excitará de manera independiente. Defectos en los bastones se traducen en problemas de ceguera nocturna o pérdida de campo visual periférico mientras que

defectos en los conos se traducen en disminución de agudeza visual, discromatopsias o fotopsias (Masland, 2001; Wright et al., 2010).

Otras células que son componente esencial de la retina, son las células de Müller. Éstas son células gliales que se extienden desde la capa de fotorreceptores hasta las capas más internas y son responsables de la homeostasis retiniana (Newman and Reichenbach, 1996).

Tanto neuroanatómica como fisiológicamente se puede distinguir entre retina periférica y retina central o mácula. Además de las diferencias en cuanto al tipo de fotorreceptores predominante en cada una de ellas, la mácula es ligeramente distinta anatómicamente presentando una pequeña depresión o fovea debida a que las capas más internas de la retina están proyectadas excéntricamente, cuya finalidad es permitir que la luz llegue directamente a la capa de fotorreceptores (Urtubia Vicario, 1999).

La retina tiene un sistema propio de vascularización independiente del sistema de control simpático sistémico, que tiene su propia regulación en función de las necesidades metabólicas del tejido. La arteria oftálmica, procede directamente de la carótida y de ella emergen las arterias ciliares y la arteria central bifurcándose ésta última a su vez en cuatro ramas principales: superior, inferior, temporal y nasal. También existe un sistema venoso que se encarga del drenaje de los capilares de los cuatro cuadrantes de la retina (Pulido, 2002).

### 1.2.2 Ciclo visual

Los fotopigmentos se componen de una opsina (proteína transmembrana) y un cromóforo, el 11-*cis*-retinal cuya síntesis se realiza en el EPR siendo ésta una de sus funciones principales.

Este proceso de síntesis comienza con una esterificación del *all-trans*-retinol, derivado de la vitamina A, en *all-trans*-retinol esterificado por la proteína lecitin retinol aciltransferasa (LRAT). Más tarde es transformado en 11-*cis*-retinol por otra enzima clave en este proceso llamada isomerohidrolasa retinoide (RPE65) y tras la acción de la enzima retinol deshidrogenasa, el producto final 11-*cis*-retinal se transporta desde el EPR hasta los discos del segmento externo del fotorreceptor. Una vez allí, el cromóforo 11-*cis*-retinal, mediante enlace covalente, se une con la opsina (escotopsina) formando un complejo muy estable, la rodopsina (*Figura 1.3*).

Cuando llega un fotón, el cromóforo 11-*cis*-retinal sufre un proceso de fotoisomerización, en el cual se transforma a *all-trans*-retinal, que estructuralmente es incompatible con la opsina, produciendo en ella un cambio conformacional. La rodopsina (RHO) se transforma rápidamente en unos intermediarios altamente inestables (batorrodopsina, lumirrodopsina y metarrodopsina I) que darán lugar a la metarrodopsina II (rodopsina activada), la encargada de activar la cascada de fototransducción. Una vez activada la cascada, la metarrodopsina II tiene que ser desactivada. Esta inactivación se produce por una fosforilación en el extremo carboxilo por la rodopsina quinasa, y la rodopsina inactiva se une a la arrestina (SAG). En este proceso de inactivación el *all-trans*-retinal se disocia y se transforma en *all-trans*-retinol por la acción de la retinol deshidrogenasa 12 (RDH12) y es transportado hasta el EPR para entrar de nuevo en el ciclo (*Figura 1.3*). Por otra parte, la rodopsina inactiva vuelve a ser desfosforilada para poderse unir de nuevo al cromóforo 11-*cis*-retinal (Kiser et al., 2013; Zhao et al., 1995).

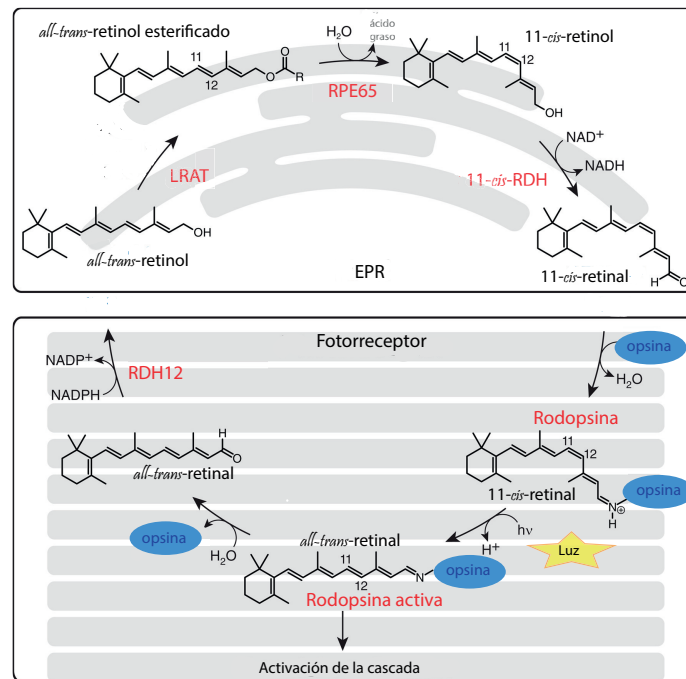


Figure 1.3: Ciclo visual. Enzimas y/o proteínas implicadas en el proceso (rojo). Todas las transformaciones metabólicas en el EPR tienen lugar en el retículo endoplasmático mientras que en los fotorreceptores ocurre en los discos del segmento externo. Modificada de Kiser et al 2014.

### 1.2.3 Fototransducción

Cuando la rodopsina (metarrodopsina II) es activada, activa a su vez a su proteína G asociada, la transducina que está formada por tres subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  en estado basal se encuentra asociada a una molécula de GDP (guanosin difosfato), sin embargo cuando la transducina es activada intercambia la molécula de GDP por otra de GTP (guanosin trifosfato) haciendo que se disocie la subunidad  $\alpha$  de las otras dos ( $\beta$  y  $\gamma$ ) (Figura 1.4).

La subunidad  $\alpha$  unida a GTP interacciona con la siguiente proteína de la cascada, la GMPc-fosfodiesterasa 6 (PDE6), proteína heterotetramérica formada por dos subunidades catalíticas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y dos inhibitorias ( $\gamma$ ). La unión de la transducina (subunidad  $\alpha$ -GTP) a las subunidades  $\gamma$  de la fosfodiesterasa elimina la inhibición que éstas ejercen sobre las subunidades catalíticas haciendo que estas comiencen a hidrolizar el GMPc del medio a 5'-GMP (5'-guanosin monofosfato). Esta reducción de los niveles de GMPc del medio resulta en el cierre de los canales catiónicos localizados en la membrana plasmática que en condiciones de oscuridad permite el flujo de cationes de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Figura 1.4). Cuando este flujo cesa tras una estimulación lumínica se produce una disminución del potencial de membrana causando una hiperpolarización del bastón (Wert et al., 2014).

En oscuridad, el bastón se encuentra despolarizado (-40mV) lo que se traduce en una liberación de su neurotransmisor el glutamato a través de sus vesículas sinápticas, inhibiendo a las células bipolares. Sin embargo, cuando el bastón se hiperpolariza con la llegada de los fotones (-70mV) la liberación de glutamato cesa, activando así a las células bipolares. Este potencial de acción es modulado por las células

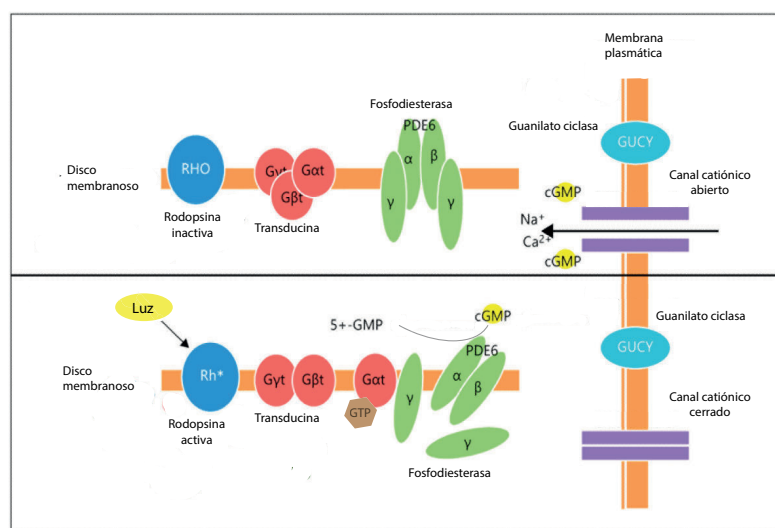


Figure 1.4: Cascada de fototransducción. Proteínas implicadas en el proceso durante la oscuridad donde el mantenimiento de los niveles de GMPc permite la entrada de iones de sodio y calcio al interior del disco a través del canal catiónico (arriba). Activación de la cascada de fototransducción con la llegada de la luz y la consiguiente disminución de GMPc en el medio y cierre del canal catiónico (abajo). Modificada de Wert et al, 2014.

horizontales y amacrinas en la capa plexiforme externa y finalmente, llegará a la capa de células ganglionares que transmitirán la señal a través de sus axones hasta la corteza visual del cerebro (Deterre et al., 1987; Grossniklaus et al., 2015).

Tras este proceso, tienen lugar mecanismos de adaptación o recuperación. La concentración de calcio juega un papel fundamental. Cuando ésta disminuye, las proteínas activadoras de la guanilato ciclasa (GCAPs) pierden sus iones  $\text{Ca}^{2+}$  uniéndose así a la guanilato ciclasa (GC) y activándola. Esto favorece la síntesis de GMPc restableciendo los niveles en el segmento externo del fotorreceptor y favoreciendo la apertura de canales dependientes de GMPc. Además la recoverina que en condiciones de oscuridad está unida a la rodopsina quinasa inhibiendo su actividad, cuando disminuyen los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , se separa de ésta dejando que fosforile a la rodopsina dando lugar a su inactivación. Por otro lado, existe un mecanismo de adaptación independiente de calcio, en el que se produce la inactivación de la fosfodiesterasa 6 (PDE6), mediante la inactivación previa de la subunidad  $\alpha$  de la transducina por la hidrólisis de su molécula de GTP a GDP gracias a la propiedad GTPasa intrínseca que tiene ésta, permitiendo la reasociación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de PDE6 a sus dos subunidades inhibitorias  $\gamma$  (Wert et al., 2014).

### 1.3 Distrofias de retina

Las distrofias hereditarias de la retina (DR) son un conjunto de enfermedades degenerativas y generalmente progresivas, causadas por la afectación primaria de los fotorreceptores, cuya prevalencia es de 1 en 3000 individuos (Wright et al., 2010; Rivolta et al., 2002). Debido a su baja prevalencia en la población, este grupo de patologías pertenecen a las definidas como enfermedades raras.

Las DR se dividen clínicamente en formas periféricas, en las que se ven afectados de forma inicial los



bastones de la retina, tal y como ocurre en la retinosis pigmentaria (RP), y formas centrales, presentando una degeneración primaria de los conos, como es el caso de las distrofias maculares (DM), siendo una forma mixta las distrofias de conos-bastones (DCB). Además todas estas patologías pueden presentarse asociadas a otras alteraciones sistémicas (formas sindrómicas), como el síndrome de Bardet-Biedl o síndrome de Alström, o de forma aislada (formas no sindrómicas). Existen algunas patologías en las que la evolución excepcionalmente no es progresiva, sino estacionaria como ocurre en la acromatopsia (ACHM) o la ceguera nocturna estacionaria congénita (CSNB).

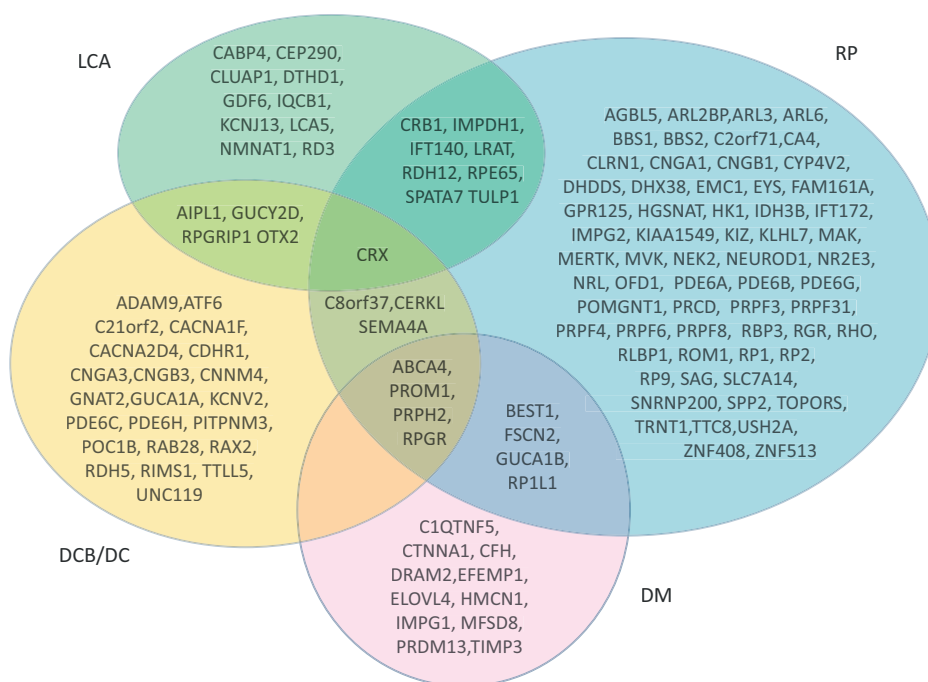


Figure 1.5: Diagrama de genes asociados a las distrofias de retina más frecuentes en el que se muestra la elevada heterogeneidad genética. DCB: distrofia conos-bastones/DC: distrofia de conos. DM: distrofia macular. LCA: amaurosis congénita de Leber. RP: retinosis pigmentaria. Modificada de Berger et al, 2010.

En los últimos años se han asociado más de 140 genes a DR no sindrómicas y más de 70 a formas sindrómicas (*RetNet, the Retinal Information Network, rev. Marzo 2017*), y a pesar de que las funciones de algunos de estos genes han sido estudiadas de forma exhaustiva, es difícil establecer una precisa correlación genotipo-fenotipo. Algunos subtipos de DR como la retinosis pigmentaria, amaurosis congénita de Leber o la distrofia de conos-bastones presentan una elevada heterogeneidad genética (*Figura 1.5*) mientras que otros subtipos de DR están causados por mutaciones en un solo gen como son la retinosquiasis (mutaciones en *RS1*) o la coroideremia (mutaciones en *CHM*).

### 1.3.1 Retinosis pigmentaria

La Retinosis pigmentaria (RP; MIM #268000) es la distrofia de retina más común, presenta una prevalencia aproximada de 1 en 4000 individuos (den Hollander et al., 2010). Se caracteriza por una afectación primaria de los bastones siendo la ceguera nocturna el primer síntoma, seguido de una pérdida

progresiva del campo visual periférico (visión en túnel). En estados más avanzados de la enfermedad se puede producir una disminución progresiva de la visión central debida a la afectación secundaria de los conos (Ayuso and Millan, 2010).

La RP es una enfermedad que presenta una gran heterogeneidad clínica. La edad de aparición, la progresión, o la afectación de la retina son parámetros que pueden variar de manera significativa entre pacientes, incluso procedentes de la misma familia. Normalmente, se presenta como única patología (forma no sindrómica), sin embargo en el 20-30% de los casos está asociada a otras alteraciones sistémicas dando lugar a formas sindrómicas, como el más frecuente, Síndrome de Usher (Millán et al., 2011). La caracterización clínica es de gran relevancia a la hora de clasificar a los pacientes de RP, ya que en muchos casos va a permitir determinar un algoritmo diagnóstico determinado (Nash et al., 2015). Para llegar a un correcto diagnóstico oftalmológico de esta enfermedad existen diferentes pruebas (Duncan et al., 2016; Stephen et al., 2014; Marmor et al., 1983):

- Electrofisiología: proporciona principalmente información del estado funcional de los fotorreceptores. En pacientes con RP, permite detectar los primeros signos de la patología observándose pérdida progresiva de la respuesta correspondiente a los fotorreceptores: en etapas más precoces se ven afectados sólo bastones aunque en estados más avanzados se ven afectados también los conos (*Figura 1.6a*).
- Campimetría: permite el estudio del campo visual periférico. En pacientes de RP se observa una pérdida de visión periférica en forma de anillo que pone de manifiesto la alteración de los bastones cuya mayor densidad se encuentra en la retina periférica (*Figura 1.6b*).
- Oftalmoscopia: permite analizar el fondo de ojo. Los hallazgos típicos de la patología suelen ser papila óptica de aspecto pálido, disminución del calibre vascular o aparición de depósitos de pigmento en forma de osteoclastos o espículas distribuidos predominantemente en la periferia. Estos hallazgos son indicativos de estadios avanzados de degeneración de los fotorreceptores y del EPR (*Figura 1.6c*).
- Autofluorescencia: permite la visualización de los cambios a nivel del epitelio pigmentario de la retina y ayuda a identificar las áreas que pueden correr un mayor riesgo de desarrollo de atrofia coroidea (*Figura 1.6d*).
- Angiografía: permite estudiar el estado del sistema vascular del ojo (coroides y retina). Con esta prueba se puede identificar la formación de nuevos vasos patológicos (neovasos) o bien, la obstrucción o rotura de venas o arterias (*Figura 1.6e*).
- Tomografía óptica: permite obtener imágenes de alta resolución de las distintas capas de la retina. Se observan alteraciones no sólo en la capa correspondiente a los fotorreceptores sino también a nivel del epitelio pigmentario (EPR) (*Figura 1.6f*).

La RP es una enfermedad monogénica que puede ser transmitida mediante diferentes patrones de herencia: autosómico recesivo (arRP; entre el 30-50% de los casos), autosómico dominante (adRP; representando el 20-40%) o ligado al cromosoma X (xlRP; 5-15%). Los casos esporádicos (sRP) representan en torno a un 40% de los casos totales de RP, siendo una pequeña proporción, casos *de novo* en genes de herencia autosómica dominante o ligada al cromosoma X. Si bien es cierto que estos porcentajes pueden variar entre las distintas poblaciones (Neveling et al., 2012; Ayuso et al., 1995). En

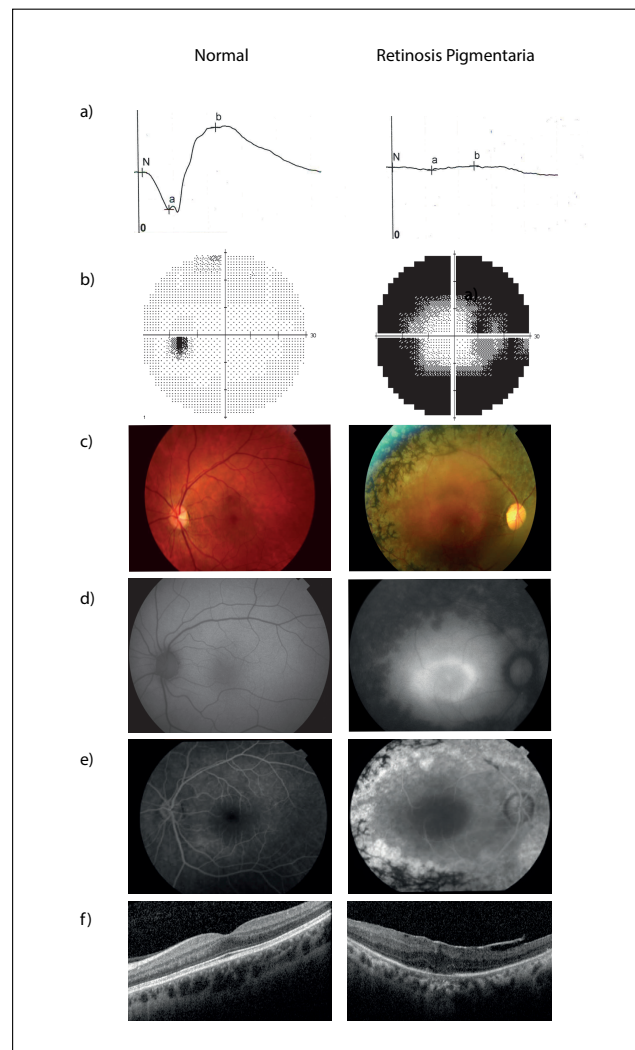


Figure 1.6: Pruebas oftalmológicas utilizadas en el diagnóstico de RP. Se muestran ejemplos de distintos pacientes de RP en comparación con un individuo normal sin hallazgos oftalmológicos. a) Electrofisiología (electrorretinograma difuso ERG), b) Campimetría, c) Oftalmoscopia, d) Autofluorescencia, e) Angiografía (AFG) y f) Tomografía óptica (OCT).

algunos casos minoritarios, también se han descrito otros tipos de herencia no mendeliana como herencia mitocondrial, digenismo, trialelismo y disomía uniparental (Berger et al., 2010; Ferrari et al., 2011).

A día de hoy, se han descrito más de 80 genes como causa de RP no sindrómica (*RetNet, the Retinal Information Network, rev. Marzo 2017*) (**Anexo I**). Respecto al tejido donde pueden expresarse, hay genes que sólo se expresan en la retina, más concretamente en los fotorreceptores o en el EPR, como es el caso de *ABCA4* y *RPE65*, respectivamente, mientras que otros se expresan en varios tejidos (*USH2A*) o ubicuamente (*NMNAT1*). A pesar de expresarse ubicuamente, mutaciones en estos genes pueden presentar únicamente manifestaciones a nivel ocular como es el caso de los factores de *splicing* (*PRPF31*, o *PRPF3*), afectación sistémica como ocurre con los genes ciliares (*CEP41* o *IFT27*) o diferentes fenotipos con afectación sistémica y/o retinosis pigmentaria aislada dependiendo de la mutación (*BBS1*). Todos estos genes asociados a RP codifican para proteínas que desempeñan diferentes funciones dentro

de la retina (**Anexo I**): i) proteínas estructurales de fotorreceptores como la periferina-2 (*PRPH2*), ii) proteínas directamente relacionadas con el ciclo visual y cascada de fototransducción como la rodopsina (*RHO*), iii) proteínas relacionadas con la estructura, función y transporte ciliar como la proteína centrosomal 290kDa (*CEP290*) o el regulador de GTPasa de retinosis pigmentaria (*RPGR*) o iv) factores de transcripción que regulan la expresión génica (*NR2E3*), entre otras. Sin embargo aún existen numerosas proteínas que a pesar de conocerse su implicación en el desarrollo de la RP se desconoce aún su función como es el caso de la proteína de degeneración progresiva de bastones-conos (*PRCD*) o el receptor acoplado a proteína G 125 (*GPR125*) (Nash et al., 2015).

Los genes más frecuentemente mutados en población española según estudios previos de nuestro grupo son: el gen *RHO* que representa el 21% de los casos de adRP (Fernandez-San Jose et al., 2015a), el gen *CRB1* responsable del 14% de las formas congénitas (LCA) y el 9% de RP recesivas de inicio precoz (Corton et al., 2013b), el gen *USH2A* que representa por un lado el 80% de formas sindrómicas (Síndrome de Usher tipo II) y por otro un 10% de formas recesivas (Blanco-Kelly et al., 2015), el gen *RP1* que causa el 6-7% de formas dominantes (Fernandez-San Jose et al., 2015a) y 4-5% de formas recesivas de inicio precoz (Ávila-Fernández et al., 2010) y el gen *RPGR* que causa en torno al 70% de las formas ligadas al cromosoma X (García-Hoyos et al., 2006).

El presente trabajo se centra en el estudio de la retinosis pigmentaria en sus formas autosómica recesiva y esporádica. Hasta la fecha, se han descrito en torno a 60 genes asociados a este subtipo de RP recesiva (arRP) siendo por tanto el grupo más heterogéneo. De entre todos estos genes cabe destacar por su mayor prevalencia (**Anexo I**):

- Gen *USH2A*. Este gen se expresa en fotorreceptores de retina y en células cocleares y codifica para la usherina, una proteína de matriz extracelular implicada en el mantenimiento y estructura celular aunque se desconoce su función específica. Se han identificado alrededor de 700 mutaciones distintas asociadas tanto a RP no sindrómica como a síndrome de Usher que se caracteriza por presentar RP y sordera neurosensorial (García-García et al., 2014; van Wijk et al., 2004).
- Gen *EYS*. Es el gen más grande identificado en la retina (2Mb) y además, se ha visto expresión en páncreas y cervix. Codifica para la proteína homóloga *eyes shut* (*Drosophila melanogaster*) y su función está aún por descifrar, sin embargo, algunos estudios sitúan a esta proteína en el mantenimiento del cilio conector. Hay descritas en torno a 190 mutaciones, muchas de ellas grandes deleciones e inserciones, de momento asociadas únicamente a RP (El-Aziz et al., 2008; Alfano et al., 2016) .
- Gen *CRB1*. Se expresa en el cerebro y en el segmento interno de los fotorreceptores. Codifica para la proteína homóloga humana de *crumbs* (*crb*) (*Drosophila melanogaster*) implicada en el mantenimiento y desarrollo tisular destacando su importancia en el desarrollo de la retina y la morfogénesis de los fotorreceptores en humanos. Hasta la fecha hay identificadas en torno a 270 mutaciones asociadas tanto a RP de inicio precoz y LCA como a otras retinopatías (Corton et al., 2013b).
- Gen *CERKL*. Se ha detectado expresión de este gen en distintos tejidos incluyendo la retina y codifica para una proteína que comparte un 30% de identidad con la familia de las ceramida quinasas. Su función está relacionada con la señalización celular más concretamente con la regulación de la

apoptosis en la retina. Se han publicado cerca de 25 mutaciones distintas asociadas a distrofias de retina como RP o DM (Avila-Fernandez et al., 2008).

- Gen *RP1*. Este gen se expresa mayoritariamente en retina, aunque se ha observado también expresión en páncreas. Codifica para la proteína retinitis pigmentosa 1, encargada de la reorganización de los microtúbulos en los discos de los segmentos externos de los bastones. Mutaciones en este gen se han asociado tanto a formas recesivas como a formas dominantes de RP (Avila-Fernandez et al., 2012; Siemiatkowska et al., 2012).
- Gen *CNGB1*. Este gen se expresa en retina, cerebro y epitelio nasal. Codifica para la subunidad  $\beta$ , una de las subunidades homólogas (subunidad  $\alpha$  *CNGA1*) del canal catiónico CNG presente en la membrana plasmática de los bastones participando activamente en la cascada de fototransducción. Hasta ahora sólo se han identificado alrededor de 20 mutaciones asociadas a RP (Chen et al., 1993).
- Genes *PDE6A* y *PDE6B*. Estos genes codifican para las subunidades catalíticas  $\alpha$  y  $\beta$  de la GMPc-fosfodiesterasa 6 (PDE6). Se localiza en la membrana de los discos de los bastones y está implicada directamente en el proceso de fototransducción. Mutaciones en *PDE6A* (35) se han asociado como causa de RP, mientras que mutaciones en *PDE6B* (90) se han descrito tanto en casos de RP como en casos de ceguera nocturna estacionaria congénita (McLaughlin et al., 1993; Huang et al., 1995).

## 1.4 Diagnóstico molecular de la retinosis pigmentaria

Como se ha mencionado anteriormente, y a pesar de la elevada heterogeneidad genética en RP no sindrómica, mutaciones en los genes descritos son capaces de explicar sólo entre el 30-70% de todos los casos (Neveling et al., 2012; Wright et al., 2010), quedando por lo tanto, un porcentaje alto de pacientes sin caracterizar. Hasta años recientes, el diagnóstico de la retinosis pigmentaria estaba basado en la realización de una combinación de estudios genéticos que incluían:

- a) Estudios indirectos: Permiten establecer si un gen concreto o región del genoma está implicado en la patología de la familia a estudiar mediante estudios de marcadores polimórficos o regiones de pérdida de heterocigosidad (*Loss of Heterozygosity*; LOH) como es el caso de los análisis de ligamiento o mapeo de homocigosidad respectivamente. Estas técnicas permitían la identificación de nuevos *loci* y/o genes implicados en la patología (Humphries et al., 1990; Ruiz et al., 1998).
- b) Estudios directos: Mediante el uso de distintas técnicas se pueden detectar cambios puntuales sin determinar en la secuencia de ADN del paciente como ocurre en las técnicas de SSCP (*Single Stranded Conformational Polymorphism*), DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) y HRM (*High Resolution Melting*) o por el contrario se pueden utilizar ciertas técnicas que permiten detectar e identificar una mutación o cambio concreto a excepción de grandes reordenamientos siendo el caso de los análisis de restricción, *microarrays* de genotipado o la secuenciación automática de Sanger (Dryja and Li, 1995; Paloma et al., 2000).
- c) Estudios de variación en el número de copia: Para la identificación de este tipo de variaciones (*Copy Number Variations* CNVs) se aplicaba mayoritariamente la técnica de MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*) que nos permite identificar deleciones o duplicaciones dentro de un gen y/o

región concreta, sin permitirnos detectar grandes reordenamientos a nivel genómico, ni identificar los puntos de rotura (*breakpoints*) de éstos (García-García et al., 2014).

Todas estas técnicas clásicas hacían el diagnóstico genético complejo y suponían un elevado gasto de tiempo y dinero. Sin embargo, en pocos años se han producido importantes avances en el estudio molecular de estas patologías.

El desarrollo de las técnicas de alto rendimiento como la secuenciación masiva (del inglés *Next-Generation Sequencing*; NGS), que permiten hacer un cribado parcial o completo del genoma de un individuo con una gran eficiencia, se están imponiendo como primer abordaje para el diagnóstico genético y la identificación de nuevos genes y/o mutaciones causantes de patologías tan heterogéneas como son las distrofias de retina (Voelkerding et al., 2009; Mardis, 2008).

A diferencia de los sistemas de secuenciación tradicionales, estas plataformas de NGS son capaces de generar paralelamente, y de forma masiva, millones de fragmentos de ADN en un único proceso de secuenciación reduciendo así costes y tiempo (Goodwin et al., 2016; van Dijk et al., 2014). Dentro del campo de la genómica, y en función de la región del genoma que se quiera estudiar, podremos elegir entre distintas aproximaciones:

- Secuenciación dirigida (*Targeted Sequencing*, TS): Selección o captura de un gran número de genes y/o regiones concretas del genoma y secuenciación de éstos de manera simultánea. El enriquecimiento de esa región concreta del genoma o ADN capturado se puede llevar a cabo mediante amplicones (PCR) o captura (sondas de hibridación), entre otras (Kozarewa et al., 2015; Mamanova et al., 2010).
- Secuenciación de exoma completo (*Whole Exome Sequencing*; WES): Secuenciación exónica de todos los genes conocidos. Con esta tecnología se captura en torno a un 2% del genoma (Bao et al., 2014; Choi et al., 2009; Hodges et al., 2007).
- Secuenciación de genoma completo (*Whole Genome Sequencing*; WGS): Secuenciación de todo el genoma de un individuo, no sólo la parte exónica sino también todas las regiones intrónicas y reguladoras (Petersen et al., 2017; Cirulli and Goldstein, 2010).

Además existen otros campos, como pueden ser la transcriptómica, proteómica, epigenómica o farmacogenómica, en las que la secuenciación masiva se ha implementado en los últimos años, especialmente en proyectos de investigación. Con estas nuevas aproximaciones podemos estudiar la expresión de ARN mensajero (ARNm) en una célula o tejido (*RNA-Sequencing*) (Hrdlickova et al., 2017; Wang et al., 2009), las regiones de interacción del ADN con factores de transcripción y otras proteínas (*ChIP-Sequencing*) (Nakato and Shirahige, 2016; Park, 2009) o las modificaciones epigenéticas que sufre la cromatina viéndose alterada así la expresión de numerosos genes (*Methyl-Sequencing*) (Soto et al., 2016; Laird, 2010).

Aunque la NGS presenta grandes ventajas para su aplicación en la genética clínica, existen algunos inconvenientes derivados principalmente de la complejidad del procesamiento y análisis de la gran cantidad de datos generados. Para su procesamiento se requiere el uso de distintos programas bioinformáticos que

nos permitan realizar un control de calidad de la secuenciación, alineamiento y ensamblaje de las secuencias o la anotación de las variantes. Así como para procesos derivados de la priorización e interpretación de las variantes encontradas (mutaciones puntuales, *indels* o CNVs) (Figura 1.7).

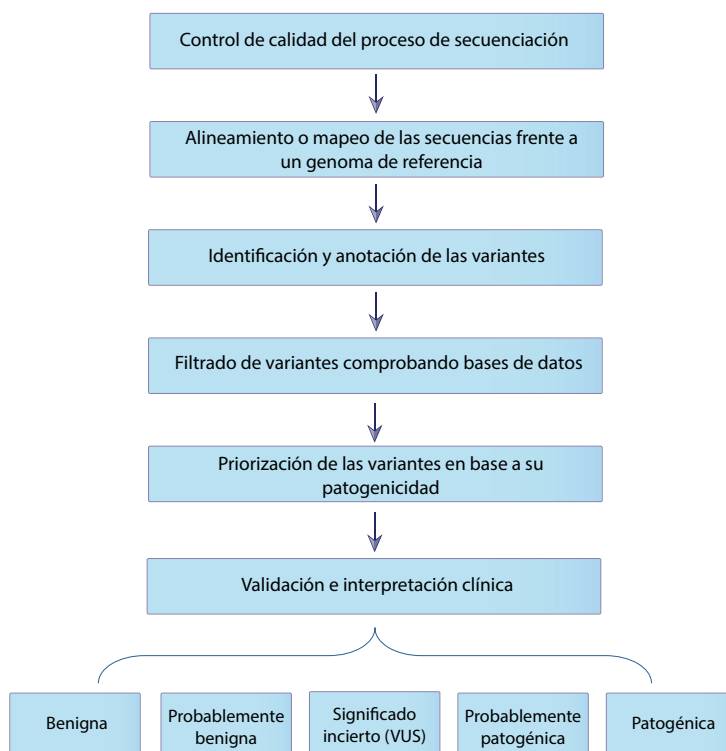


Figure 1.7: Algoritmo clásico de análisis bioinformático y priorización de las variantes utilizado en las distintas aproximaciones genómicas de NGS. Finalmente, y tras su interpretación y validación, las variantes quedan clasificadas, según las guías internacionales, en 5 grupos: benigna, probablemente benigna, variantes de significado incierto (VUS: Variants of Unknown Significance), probablemente patogénica, y patogénica.

Para asegurar la calidad y fidelidad de los datos obtenidos por NGS así como facilitar el filtrado y una adecuada priorización de las variantes encontradas hay que seguir las pautas propuestas en las guías internacionales en las que se recomienda evaluar los siguientes parámetros (MacArthur et al., 2014; Neveling et al., 2012):

- i) Calidad obtenida en la secuenciación de la variante a estudiar. De esta manera se reduce la aparición de errores de secuenciación (falsos positivos) como causa de baja cobertura o profundidad de lectura.
- ii) Frecuencia de la variante en bases de datos de poblaciones tanto nacionales como internacionales. Tratándose de una enfermedad rara, aquellas variantes que tengan una frecuencia alta en distintas poblaciones se descartan como causantes de la patología, considerándolas simplemente como polimorfismos.
- iii) Efecto en la proteína. Si la variante causa una mutación de parada (*nonsense*), de cambio de aminoácido (*missense*), de cambio en la pauta de lectura (*frameshift*) o altera el proceso de *splicing*.

- iv) Valoración de la patogenicidad. Las mutaciones de parada, de cambio en la pauta de lectura o que afectan a los sitios canónicos de *splicing* suelen ser consideradas como patogénicas. Para la clasificación de las mutaciones de cambio de aminoácido o de *splicing* fuera de los sitios canónicos, es necesario realizar un estudio de predicciones *in silico*, que permitirá predecir el efecto de estas variantes en la proteína y poder valorar así si podrían ser consideradas como patogénicas.
- v) Consulta de bases de datos revisadas y literatura en busca de evidencias que permitan confirmar o descartar la causalidad de las variantes identificadas.

Una vez seleccionada la variante causante del fenotipo del paciente estudiado, ésta es generalmente validada por secuenciación Sanger que actualmente, es considerada la técnica “*gold standard*” en secuenciación (Chiang et al., 2015) y en aquellos casos en los que sea posible se procede a realizar un estudio de co-segregación en la familia.

Estudios recientes en distintas poblaciones han demostrado el gran potencial de las tecnologías NGS como herramienta diagnóstica en el estudio de la RP (Chen et al., 2013b; Daiger et al., 2013). Se caracterizan en torno al 30-70% de los casos dependiendo del tipo de RP y de la tecnología utilizada (siendo del 20 al 50% en arRP) (Neveling et al., 2012; Glöckle et al., 2014; Fu et al., 2013; Fernandez-San Jose et al., 2015b), lo que supone una tasa diagnóstica mucho mayor que la obtenida mediante otras técnicas como el *microarray* de genotipado (11-15% en arRP) (van Huet et al., 2015; Ávila-Fernández et al., 2010). La elevada heterogeneidad genética de la RP (Sánchez-Alcudia et al., 2014) (**Anexo II**), convierte a esta patología en una excelente candidata para la aplicación de la NGS, que actualmente, es considerada el método más eficaz tanto a nivel de diagnóstico como en el campo de la investigación permitiendo la identificación de nuevos genes y/o nuevas asociaciones genotipo-fenotipo generando nuevos conocimientos sobre las bases genéticas de la RP (Corton et al., 2016) (**Anexo II**).

## 1.5 Aproximaciones terapéuticas

En la actualidad, la investigación está permitiendo alcanzar un mejor conocimiento de las alteraciones genéticas y los mecanismos que causan la RP, aunque hasta ahora no se ha encontrado ningún tratamiento que permita detener eficazmente la degeneración de la retina o restablecer la pérdida de visión.

Existen distintas aproximaciones terapéuticas enfocadas a combatir la degeneración retiniana en distintos estadios de la enfermedad, o incluso, basadas en el reemplazo de los fotorreceptores:

- Terapia farmacológica: se utilizan tratamientos muy diversos como la administración de vitaminas (vitamina A) o antioxidantes que hacen que la progresión sea más lenta, o la aplicación de factores neurotróficos que favorecen la proliferación y supervivencia de los fotorreceptores. Hasta la fecha no se conoce un tratamiento curativo y la mayoría de ellos están basados en estrategias anti-apoptóticas, sin embargo hallazgos recientes sugieren mecanismos de muerte celular alternativos a la apoptosis como causa de la degeneración retiniana, abriendo nuevas posibilidades a futuras terapias (Guadagni et al., 2015; Arango-Gonzalez et al., 2014).



- Terapia génica: su aplicación se limita a aquellos pacientes de RP en los que se conoce la causa genética de su enfermedad. Actualmente existen varios ensayos clínicos para pacientes con mutaciones en el gen *RPE65* causante de amaurosis congénita de Leber (LCA) (Bainbridge et al., 2008) o pacientes afectados de coroideremia con mutaciones en el gen *CHM* (MacLaren et al., 2014). También existen ensayos todavía en fases muy preliminares para pacientes con mutaciones en los genes *PDE6A* o *MERTK* (*Clinicaltrials*: NCT02759952/NCT01482195). La llegada de la secuenciación masiva, el aumento de familias caracterizadas y los grandes avances en las nuevas técnicas de edición génica como el sistema CRISPR/Cas9 (Bakondi et al., 2016; Suzuki et al., 2016), han incrementado las expectativas de los tratamientos gen-dependientes. Además el conocimiento de nuevos genes está permitiendo identificar nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos tratamientos.
- Terapia celular: existen algunos estudios en modelos animales basados en el trasplante a nivel retiniano de distintos tipos celulares, i) células madre embrionarias (ESCs), ii) células progenitoras de la retina (RPCs) ó iii) células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), demostrándose una regeneración de la retina (Ehmann et al., 2016). Actualmente hay varios ensayos clínicos en pacientes (*Clinicaltrials*: NCT02280135/NCT02464436) aunque todavía se encuentran en fases muy preliminares de evaluación de la seguridad y tolerancia de las células madre en los pacientes.
- Optogenética: Nueva aproximación, todavía no testada en humanos, que consiste en la expresión transgénica de proteínas fotosensibles modificadas que llevan a cabo el proceso de fototransducción de manera simultánea. Para su uso es necesaria una preservación de la respuesta neuronal en las capas más internas de la retina (Sahel and Roska, 2013; Henriksen et al., 2014).
- Implantes y prótesis de retina: Aplicable en aquellos pacientes en los que la degeneración se encuentra en un estado muy avanzado. Estos implantes aprovechan la actividad neuronal que todavía permanezca intacta para poder transmitir las señales a la corteza visual del cerebro. Estas tecnologías permiten una mejora de la detección lumínica y una recuperación de la percepción visual (Rizzo et al., 2014).



# Objetivos

---

## Objetivo General

Profundizar en el conocimiento de las bases moleculares y genéticas de la retinosis pigmentaria mediante la utilización y combinación de nuevas técnicas de secuenciación masiva en familias españolas afectadas de formas recesivas y esporádicas, con el fin de identificar nuevos genes y asociaciones fenotípicas, así como establecer un nuevo algoritmo que nos permita optimizar el diagnóstico genético de estas patologías.

## Objetivos específicos

- Caracterizar clínica y genéticamente las familias afectadas de arRP y sRP, mediante la utilización de las nuevas técnicas de secuenciación masiva en sus aplicaciones de secuenciación dirigida y secuenciación de exoma completo.
- Estudiar nuevas correlaciones genotipo-fenotipo.
- Identificar nuevos genes responsables de la patología en familias españolas arRP y sRP.
- Desarrollar y validar una nueva estrategia de secuenciación masiva dirigida basada en un panel de genes y realizar una comparación de los resultados obtenidos con los datos derivados de otras herramientas clásicas aplicadas en el diagnóstico molecular de arRP y sRP.
- Establecer un nuevo algoritmo de estudio en los pacientes afectados de distrofias de retina que permita agilizar y optimizar el estudio genético y proporcionar un adecuado asesoramiento genético a las familias.



## Resultados

---

### 3.1 Nueva asociación del gen *ABHD12* a RP no sindrómica

La retinosis pigmentaria (RP; MIM #268000) es una distrofia de retina que se caracteriza por una afectación primaria de los bastones. Normalmente se suele presentar de forma aislada (forma no sindrómica), sin embargo en el 20-30% de los casos está asociada a otras alteraciones sistémicas (formas sindrómicas) dando lugar a más de 30 síndromes descritos.

Se realizaron estudios de exoma completo (WES) en dos familias previamente diagnosticadas de RP no sindrómica de origen español y holandés respectivamente, encontrándose en ambas como gen candidato el gen *ABHD12* (*Abhydrolase domain-containing protein 12*). En el análisis de dicho gen se identificaron 4 mutaciones nuevas: una *frameshift* (p.Arg107Glufs\*8), una *nonsense* (p.Trp159\*), y dos *missense* (p.Thr202Ile y p.Arg186Pro). Posteriormente, se realizó un cribado mutacional del gen en el que se incluyeron 347 pacientes de RP no sindrómica y 33 pacientes de RP que, adicionalmente presentaban pérdida auditiva y/o ataxia, lo que permitió encontrar otra familia con una mutación *missense* nueva en homocigosis (p.His372Gln) en *ABHD12*.

Mutaciones en este gen ya estaban previamente descritas como causantes de una forma de RP sindrómica denominada síndrome de PHARC (*Polyneuropathy, Hearing loss, Ataxia, Retinitis pigmentosa, and Cataract*; MIM #612674), una enfermedad neurodegenerativa que cursa con polineuropatía, pérdida de audición, ataxia cerebelosa, retinosis pigmentaria y catarata precoz. Por ello, tras los hallazgos genéticos encontrados se llevó a cabo una detallada revisión clínica incluyendo pruebas neurológicas, otorrinolaringológicas y oftalmológicas. Finalmente, la reevaluación clínica de dos de las familias permitió redefinir el diagnóstico previo de RP no sindrómica, como síndrome de PHARC por presentar hipoacusia neurosensorial y problemas neurológicos como ataxia. Sin embargo, en la otra familia española sólo se observaron las alteraciones oftalmológicas típicas presentes en la RP, por lo que se pudo concluir que se trata de una nueva asociación fenotípica.

Este estudio de exoma completo permitió identificar 5 mutaciones nuevas en el gen *ABHD12*, siendo la primera vez que se describen mutaciones *missense* en el mismo. Además, establecer una nueva asociación ampliando así el espectro de fenotipos asociados a *ABHD12* facilita información sobre el pronóstico de la evolución clínica de la enfermedad y permite proporcionar el adecuado asesoramiento genético a las familias afectadas.



# Exome Sequencing Extends the Phenotypic Spectrum for ABHD12 Mutations

## *From Syndromic to Nonsyndromic Retinal Degeneration*

Koji M. Nishiguchi, PhD, MD,<sup>1,\*</sup> Almudena Avila-Fernandez, PhD,<sup>2,\*</sup> Ramon A. C. van Huet, MD,<sup>3,\*</sup> Marta Corton, PhD,<sup>2</sup> Raquel Pérez-Carro, MSc,<sup>2</sup> Esther Martín-Garrido, MSc,<sup>2</sup> María Isabel López-Molina, MD,<sup>4</sup> Fiona Blanco-Kelly, MD, PhD,<sup>2</sup> Lies H. Hoefsloot, PhD,<sup>5</sup> Wendy A. van Zelst-Stams, MD, PhD,<sup>5</sup> Pedro J. García-Ruiz, MD,<sup>6</sup> Javier del Val, MD,<sup>6</sup> Silvio Alessandro Di Gioia, PhD,<sup>1</sup> B. Jeroen Klevering, MD, PhD,<sup>3,7</sup> Bart P. C. van de Warrenburg, MD, PhD,<sup>8,9</sup> Carlos Vazquez, MD,<sup>10</sup> Frans P. M. Cremers, PhD,<sup>5,11</sup> Blanca García-Sandoval, MD, PhD,<sup>4</sup> Carel B. Hoyng, MD, PhD,<sup>3</sup> Rob W. J. Collin, PhD,<sup>5,7,11,\*</sup> Carlo Rivolta, PhD,<sup>1,\*</sup> Carmen Ayuso, MD, PhD<sup>2,\*</sup>

**Objective:** To identify the genetic causes underlying autosomal recessive retinitis pigmentosa (arRP) and to describe the associated phenotype.

**Design:** Case series.

**Participants:** Three hundred forty-seven unrelated families affected by arRP and 33 unrelated families affected by retinitis pigmentosa (RP) plus noncongenital and progressive hearing loss, ataxia, or both, respectively.

**Methods:** A whole exome sequencing (WES) analysis was performed in 2 families segregating arRP. A mutational screening was performed in 378 additional unrelated families for the exon–intron boundaries of the *ABHD12* gene. To establish a genotype–phenotype correlation, individuals who were homozygous or compound heterozygotes of mutations in *ABHD12* underwent exhaustive clinical examinations by ophthalmologists, neurologists, and otologists.

**Main Outcome Measures:** DNA sequence variants, best-corrected visual acuity, visual field assessments, electroretinogram responses, magnetic resonance imaging, and audiography.

**Results:** After a WES analysis, we identified 4 new mutations (p.Arg107Glufs\*8, p.Trp159\*, p.Arg186Pro, and p.Thr202Ile) in *ABHD12* in 2 families (RP-1292 and W08-1833) previously diagnosed with nonsyndromic arRP, which cosegregated with the disease among the family members. Another homozygous mutation (p.His372Gln) was detected in 1 affected individual (RP-1487) from a cohort of 378 unrelated arRP and syndromic RP patients. After exhaustive clinical examinations by neurologists and otologists, the 4 affected members of the RP-1292 had no polyneuropathy or ataxia, and the sensorineural hearing loss and cataract were attributed to age or the normal course of the RP, whereas the affected members of the families W08-1833 and RP-1487 showed clearly symptoms associated with polyneuropathy, hearing loss, cerebellar ataxia, RP, and early-onset cataract (PHARC) syndrome.

**Conclusions:** Null mutations in the *ABHD12* gene lead to PHARC syndrome, a neurodegenerative disease including polyneuropathy, hearing loss, cerebellar ataxia, RP, and early-onset cataract. Our study allowed us to report 5 new mutations in *ABHD12*. This is the first time missense mutations have been described for this gene. Furthermore, these findings are expanding the spectrum of phenotypes associated with *ABHD12* mutations ranging from PHARC syndrome to a nonsyndromic form of retinal degeneration. *Ophthalmology* 2014;121:1620-1627 © 2014 by the American Academy of Ophthalmology.



Supplemental material is available at [www.aaojournal.org](http://www.aaojournal.org)

Retinitis pigmentosa (RP; Mendelian Inheritance in Man, 268000) is the most common form of inherited retinal dystrophies affecting 1 in 4000 persons.<sup>1</sup> Symptoms include night blindness in the early phase of the disease, the development of tunnel vision, and a slowly progressive decrease in central vision.<sup>2</sup> On examination, patients have decreased visual acuity and constricted visual fields accompanied by the classic fundus appearance with dark pigmentary clumps in

the midperiphery and perivenous areas, attenuated retinal vessels, and waxy optic disc pallor. However, the disease onset, progression, retinal appearance, and visual function may vary significantly among patients and even within a family.

Retinitis pigmentosa usually is restricted to the eye; however, in 20% to 30% of cases, it is associated with nonocular signs leading to more than 30 different

syndromes.<sup>3</sup> The most frequent syndromic RP form is Usher syndrome, in which retinal degeneration is associated with hearing impairment, accounting for approximately 10% to 20% of all RP cases.

Retinitis pigmentosa is also a very heterogeneous genetic disorder; the disease can be inherited as an autosomal dominant trait (approximately 20% of cases), as an autosomal recessive trait (30% of cases), or as an X-linked trait (10% of cases). Approximately 40% of patients with RP are isolated cases, although this percentage varies when considering different populations.<sup>1,4</sup> Non-Mendelian inheritance patterns such as digenic, mitochondrial, or de novo mutations have been reported, accounting for a small proportion of cases.<sup>3</sup> To date, mutations in 41 genes have been described as causing nonsyndromic autosomal recessive RP (arRP), and mutations in 56 genes have been identified as being responsible for autosomal recessive syndromic retinal dystrophy, including Bardet-Biedl and Usher syndromes.<sup>5</sup> However, mutations in these genes account for the disease in little more than half of all patients.<sup>1,6</sup> Although the functions of some of these genes have been studied extensively, it is difficult to establish a precise genotype–phenotype correlation because mutations in different RP genes can cause overlapping clinical phenotypes.<sup>7</sup>

Recently, a novel form of syndromic RP, a neurodegenerative disease including polyneuropathy, hearing loss, cerebellar ataxia, retinitis pigmentosa, and early-onset cataract (PHARC; Mendelian Inheritance in Man, 612674), has been described.<sup>8</sup> Manifesting typically in the late teens, PHARC syndrome is an autosomal recessive progressive and degenerative disease. Although the phenotype is quite variable, even within a family, it is observed that the hearing loss, the cataract, and the RP are presented in all adult patients described so far.<sup>8–10</sup> Null mutations in the *ABHD12* gene, encoding  $\alpha$ - $\beta$  hydrolase 12 protein, have been associated with this syndrome in a total of 12 unrelated families,<sup>9,10</sup> as well as with a less aggressive phenotype without polyneuropathy that was considered to be a variant of PHARC syndrome in a single family.<sup>11</sup> In this study, after a whole exome sequencing (WES) analysis, we identified 5 new mutations in *ABHD12* in 3 families affected with arRP, one of which did not present any systematic abnormalities, after careful evaluation of neurologic and auditory function. In addition, this is the first report of missense mutations in *ABHD12*, thereby expanding the spectrum of mutations and phenotypes that range from PHARC syndrome to a nonsyndromic form of retinal degeneration.

## Methods

### Patient Recruitment

Patients diagnosed with RP were recruited from the Biobank of the Fundación Jiménez Díaz Hospital, Madrid, Spain, and from the department of Ophthalmology, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands. Diagnostic criteria of RP included night blindness, peripheral visual loss, or both, with visual field loss and poor visual acuity in advanced stages of the disease.

A total of 347 unrelated families with arRP or sporadic RP (346 Spanish families and 1 Dutch family) and 33 unrelated families affected with RP plus noncongenital and progressive hearing loss,

ataxia, or both were selected. Informed consent was obtained from all patients and family members or their legal guardians involved in the study. All procedures were reviewed and approved by the ethics committees of our institutions and adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki.

One hundred seventy-six unrelated individuals of Spanish origin without RP family history were screened as controls to evaluate the frequency of the missense mutations p.Thr202Ile and p.His372Gln found in these studied Spanish families. The occurrence of the missense variant that was identified in a Dutch family (p.Arg186Pro) was assessed in an in-house exome database consisting of more than 500 unrelated individuals.

Peripheral blood samples of index cases and their family members were collected in EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) tubes. DNA was extracted from peripheral blood leukocytes with an automated DNA extractor (model BioRobotEZ1; Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions, or with a standard salting out procedure.

### Genetic Analysis

**Next Generation Sequencing.** Whole exome sequencing was performed in the index cases of the RP-1292 and the W08-1833 families as previously described.<sup>12,13</sup>

**Sanger Sequencing Analysis.** Bidirectional automatic sequencing was performed to confirm and segregate the obtained results by WES in the RP-1292 and W08-1833 families, to screen the *ABHD12* gene for mutations in a total of 378 additional arRP families, and to determine the frequency of one of the missense variations in the control population. Exons and exon–intron boundaries of the *ABHD12* gene (RefSeq NM\_001042472) were analyzed using 14 oligonucleotide primer pairs designed using Primer3 software (available at: [www.cgi.com](http://www.cgi.com); accessed July 13, 2012). Sequences and annealing temperatures are available from the authors on request.

Sequencing results were analyzed by using Staden Package software version 1.7.0 (available at: [staden.sourceforge.net](http://staden.sourceforge.net); accessed February 4, 2014) by assembling the sequenced contigs and then visualizing the aligned sequences of the exons.

**High-Resolution Melting Analysis.** High-resolution melting analysis was developed specifically and optimized for the mutational scanning of one of the new missense mutations to evaluate the frequency of the missense variation in the control population. The methodologic optimization was performed as described previously.<sup>14</sup> Polymerase chain reaction conditions are available from the authors by request. The high-resolution melting (HRM) curve analysis was performed using the LightCycler 480 Gene Scanning Software (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland). Melting curves were normalized and temperature adjusted, and finally, a difference plot was generated.

**Prediction of the Pathogenic Effect of the Missense Variations.** The pathogenicity of the new variants found in this study was established by the following criteria:

1. Cosegregation in the family.
2. Absence in 176 Spanish healthy control individuals.
3. Amino acid conservation for the missense mutations, which was determined using 31 orthologs of the *ABHD12* protein belonging to different evolutionary branches. The BLINK tool (available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/blink/>; accessed February 4, 2014) and the Jalview Alignment Editor program (available at: <http://www.jalview.org>; accessed February 4, 2014) were used to analyze the multiple sequence alignments. If a residue did not change throughout the species, it was considered highly conserved; if the variant residue was present in fewer than



3 species, the change was considered moderately conserved; if it was present in 3 to 5 ortholog proteins, it was considered to be weakly conserved; otherwise, it was classified as nonconserved.

4. Pathogenicity prediction with in silico tools, including PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping version 2; available at: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; accessed February 4, 2014), SIFT (available at: <http://sift.jcvi.org/>; accessed February 4, 2014), and Mutation Taster (available at: <http://www.mutationtaster.org/>; accessed February 4, 2014) bioinformatics programs.
5. Three-dimensional structure prediction to determine the possible structural changes in the mutant *ABHD12* protein. The structure prediction was performed using Project HOPE (available at: <http://www.cmbi.ru.nl/hope/home/>; accessed February 4, 2014) taking the protein sequencing Q8N2K0 providing by UniprotKB (Universal Protein Resource) database.<sup>15</sup>

### Clinical Examination

**Ophthalmic Evaluation.** Ophthalmic examinations were performed including visual acuity, intraocular pressure, ocular motility, pupillary reaction, biomicroscopic slit-lamp examination, and dilated fundus examination. Visual function was evaluated by static perimetry and Ganzfeld electroretinography according to the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision.<sup>16</sup>

**Hearing Evaluation.** Hearing assessment was performed by pure tone audiometry, speech-audiometry, and otoscopic examination.

**Neurologic Evaluation.** A complete neurologic examination was carried out including cranial nerves, mental status examination, sensory system, extrapyramidal and pyramidal system, cerebellum, peripheral nervous system, individual muscle testing, and evaluation of speech and language. To determine if the patients had cerebellar atrophy, magnetic resonance imaging was performed.

## Results

### Genetic Analysis

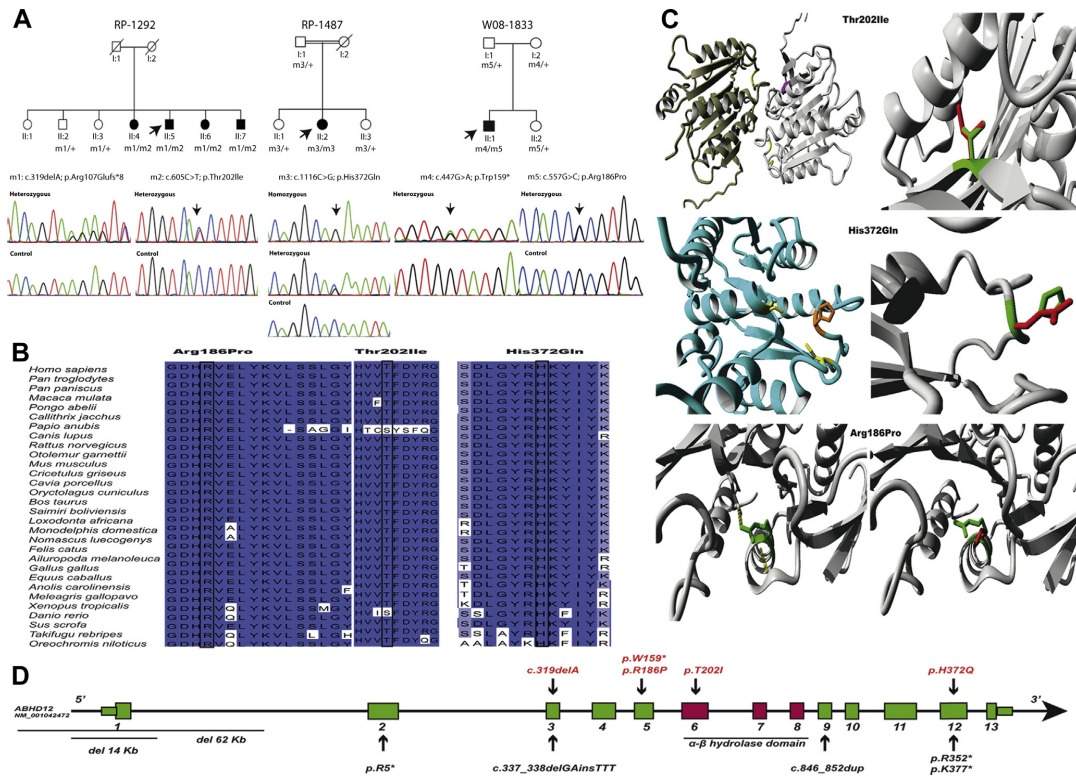
A Spanish family with 4 affected siblings (Fig 1A) with arRP was recruited. Previously, known mutations associated with arRP were discarded using a commercial genotyping microarray (AsperBiotech AS; Tartu, Estonia). In addition, whole genome homozygosity mapping using a 6.0 Affymetrix SNP array (Affymetrix AS; Santa Clara, CA) excluded the presence of IBD regions. To identify the genetic defect underlying the arRP in this family, a WES analysis was performed. The WES analysis, after sequencing on a HiSeq2000 platform (Illumina Inc., San Diego, CA) for the index case of the RP-1292 family (Fig 1A) yielded total of approximately 7254 Mb (raw data), among which approximately 4298 Mb were mapped to the target region with a mean depth of  $\times 114.4$ . As a result, 98.7% of the target regions were covered at least  $\times 4$ , with 92.0% covered at least  $\times 20$ . After the WES analysis, 65,444 variants were identified after mapping the reads to the human genome reference sequence (National Center for Biotechnology Information build 36.1). Prioritization of possibly pathogenic changes was performed as follows. We first selected 138 nonsynonymous variants comprised within the coding sequence of 160 known genes associated with hereditary retinal degenerations and then excluded DNA variants that had more than 2% frequency within the general population (dbSNP version 130; database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) resulting in 30

variants. Notably, among the variants identified in the known retinal degeneration genes, a missense change (p.Leu1970Phe; c.5908C→T) in the *ABCA4* gene previously associated with both Stargardt's disease<sup>17</sup> and age-related macular degeneration<sup>18</sup> was identified as heterozygous. However, no other mutation in this gene that could account for the autosomal recessive mode of inheritance was found. Then, we considered only 15 variants in genes carrying 2 such changes within their sequence (1 homozygous variant or 2 compound heterozygous variants) and cross-checked our results manually with the literature, newest single nucleotide polymorphism databases, and so forth. After applying these filters, we were left 1 novel homozygous mutation (p.Val349Asp) in the *NPHP4* gene, previously associated with Senior-Loken syndrome,<sup>19</sup> and 1 novel homozygous mutation (p.Glu224\*) in the *GPR98* gene, underlying Usher syndrome type 2.<sup>20</sup> Both homozygous variants in the *NPHP4* and *GRP98* genes were false positives after their confirmation by Sanger sequencing. For the *ABHD12* gene, one of them was a 1-base pair deletion (c.319delA) in exon 3, resulting in a frameshift and a stop codon after 8 residues (p.Arg107Glufs\*8). The other one was a C-to-T substitution at nucleotide 605 in exon 6 (c.605C→T) causing an amino acid change at codon 202 (p.Thr202Ile).

In parallel, a sporadic Dutch case of the family W08-1833 (Fig 1A), which initially was considered to have nonsyndromic retinal degeneration, was analyzed by WES in a molecular diagnostic setting.<sup>13</sup> Only variants in genes in which mutations previously were described to be causative for inherited retinal dystrophies were analyzed. In the index case, this prefiltering step yielded 724 variants. After the removal of variants present in more than 1% of our in-house exome sequencing database and including only those variants that affect exons or canonical splice sites, only 12 variants were left. Two compound heterozygous variants in *ABHD12* (p.Trp159\* and p.Arg186Pro) were the only 2 variations that were in line with an autosomal recessive mode of inheritance, and thus were considered to be the prime candidates underlying retinal dystrophy in this family. One of them was a G-to-A substitution at nucleotide 447 in exon 4 (c.447G→A) resulting in a stop codon (p.Trp159\*), and the other one was a G-to-A substitution at nucleotide 557 (c.557G→A) causing an amino acid change at codon 186 (p.Arg186Pro).

Sanger sequencing of the specific regions confirmed the presence of the variants identified by WES in both index cases and affected members, which cosegregated with the disease in the families according to a recessive pattern of inheritance (Fig 1A). After this finding, a mutation analysis of the *ABHD12* gene was performed by Sanger sequencing in 345 additional Spanish patients affected with nonsyndromic arRP. The study of all the exons and intron-exon boundaries (RefSeq NM\_001042472) was performed in the index cases. Family RP-1487 carried a novel homozygous missense mutation (c.1116C→G) in exon 12, leading to an amino acid change at codon 372 (p.His372Gln). Sanger sequencing in all family members of pedigree RP-1487 confirmed that inheritance of this mutation was compatible with that of a pathogenic recessive allele (Fig 1B).

Throughout this study, we identified 3 novel missense variants. Pathogenicity of these variants first was assessed by cosegregation with the disease in the families and by their absence in a total of more than 500 Dutch individuals for c.557G→A and in 352 healthy control Spanish chromosomes in the case of the c.605C→T and c.1116C→G variations. We also considered amino acid conservation in 31 different *ABHD12* proteins across evolution in combination with a functional prediction in silico analysis. The 3 variants, p.Arg186Pro, p.Thr202Ile, and p.His372Gln, accordingly were classified as most likely damaging by 3 bioinformatic prediction tools (Table 1).



**Figure 1.** A, Pedigrees of the 3 studied families with ABHD12 mutations. The index case is indicated with an arrow. Sanger sequencing confirmed the mutations identified by whole exome sequencing (WES) and revealed their complete cosegregation with the disease. The chromatograms of a mutant and a control individual are depicted for each variant (arrows). B, Cross-species comparison of 3 regions of ABHD12 indicates that the 3 identified missense mutations affect highly conserved residues. C, Three-dimensional structural model of ABHD12. The Ile amino acid residue at position 202 (purple) may lead to distortion of the active site (yellow) of the other monomer. For variant p.His372Gln, the Gln amino acid residue at position 372 (red) does not seem to impair the predicted structure of the protein. The His residue is shown in orange. For variant p.Arg186Pro, the change, Arg (green) to Pro (red), seems to disturb the predicted structure of the protein. The hydrogen bonds and hydrophobic interactions are shown in yellow. D, Intron–exon structure of ABHD12 and location of all mutations identified so far. Mutations previously associated with polyneuropathy, hearing loss, cerebellar ataxia, retinitis pigmentosa, and early-onset cataract (PHARC) syndrome or PHARC-like syndrome are shown in black. Red exons indicate the  $\alpha$ - $\beta$  hydrolyze domain of the protein. The mutations identified in this study and associated with PHARC syndrome or nonsyndromic retinitis pigmentosa are shown in red.

The mutation p.Arg186Pro changes a highly conserved and positively charged amino acid (arginine) into a neutral residue (proline; Fig 1B). As shown in Figure 1C, the R168 is located in one of the central helices in the protein. The 3-dimensional structure analyses showed that when the arginine residue changes to a proline, the hydrogen bonds and the hydrophobic interactions are

lost. Besides that, the proline disturbs the helix, which may affect other residues. This means that the mutation severely affects the structure.

The mutation p.Thr202Ile changes a small, hydrophilic, and highly conserved residue (threonine; Fig 1C) into a bigger and hydrophobic one (isoleucine). A 3-dimensional structure analysis

Table 1. In Silico Predictions of Novel Missense Variants

Exon No.	Nucleotide Change	AA Change	Conservation	Polyphen Prediction	SIFT Prediction	Mutation Taster Prediction
5	c.557G→A	p.Arg186Pro	HC	Probably damaging	Deleterious	Disease causing
6	c.605C→T	p.Thr202Ile	HC	Probably damaging	Affects protein function	Disease causing
12	c.1116C→G	p.His372Gln	HC	Probably damaging	Affects protein function	Disease causing

AA = amino acid; HC = highly conserved, considering 31 orthologs of the ABHD12 protein belonging to different evolutionary branches; SIFT = sorting tolerant from intolerant.

Novel variants described in this study. Nucleotide numbering is based on RefSeq DNA accession number NM\_001042472.

by Project HOPE showed, after analyzing multiple different models, that the best model seems to be in a dimer conformation. As shown in Figure 1C, the mutation is located far away from the putative active site in its own monomer. However, it is located close to the active site in the other monomer, and therefore it could prevent dimerization or interactions with other proteins.

The variant p.His372Gln changes a highly conserved and positively charged amino acid (histidine) into a neutral residue (glutamine; Fig 1C). However, possibly in virtue of the similar sizes of histidine and glutamine, the change did not seem to impair the predicted structure of the protein (Fig 1D). Nevertheless, the p.His372 involves 1 of the 3 charge-relay residues in ABHD12 supporting the hypothesis that p.His372Gln is functionally deleterious. Moreover, a recent study has shown that site-directed mutagenesis of residues of the catalytic triad abolished the enzymatic activity of ABHD12.<sup>21</sup>

### Clinical Examination

Three of the 4 affected individuals of family RP-1292 (II:4, II:5, and II:7) and the index cases of the families RP-1487 (II:2) and W08-1833 (II:1) were examined comprehensively by ophthalmologists, otologists, and neurologists. The clinical features of the patients are summarized in Table 2 (available at [www.aaojournal.org](http://www.aaojournal.org)). All of the affected individuals presented with an RP phenotype characterized by a symptom-free period in the first 2 decades of life. Night blindness was the first symptom, followed by central visual field loss and reduction of visual acuity.

At the time of the last ophthalmologic examination, in all mutated cases, visual fields were reduced symmetrically from 10° to absolute scotoma and the visual acuity varied depending on the different stages of macular involvement. Posterior subcapsular cataract was found in all the affected individuals carrying *ABHD12* mutations. Fundi showed changes typical of RP with pale disc, narrowed vessels, and bone spicule pigmentation, although the latter were absent in individual II:1 of family W08-1833. In addition, some patients had macular retinal pigment epithelium degeneration of various degrees (Fig 2A). Full-field electroretinography was nonrecordable or substantially reduced in all cases.

For family RP-1292, patient II:4 reported recent hypoacusis (a 78-year-old woman), whereas siblings II:6 (a 72-year-old woman) and II:7 (a 66-year-old man) did not report hearing loss. The II:5 individual (a 75-year-old man) had severe hearing loss in the left ear because of the presence of a cholesteatoma. Audiograms of the patients II:4 and II:7 showed sensorineural hearing loss of both ears for higher frequencies (>2000 Hz), whereas patient II:5 had hearing loss only in the right ear (Fig 2B). After clinical examination, the diagnosis for the 4 patients was an age-related hearing loss or presbycusis.

Neurologic examination of the 4 affected individuals of the RP-1292 family revealed no signs of peripheral polyneuropathy or ataxia. None of the patients showed pes cavus or hammertoes. The strength and sensitivity were preserved in every case. All the reflexes were present and the gait was normal, except for individual II:5. None of them reported balance problems. Magnetic resonance imaging scans did not show an indication of cerebellar atrophy in any case, except for individual II:5, who showed a localized abnormality in the left cerebellum interpreted to be caused by a previous ischemic event (Fig 2C). No patient showed evidence of polyneuropathy or ataxia.

After an exhaustive clinical examination at 38 years of age, the index case of the RP-1487 family was found to have bilateral hearing loss. An audiogram of the patient showed slight hearing loss for low frequencies (<1000 Hz) and moderate hearing loss for median and higher frequencies (>2000 Hz) for the right ear and moderate hearing loss in all frequencies for the left ear. Currently, she is wearing a

hearing aid. Bilateral cataract surgery was performed at 21 years of age. She also demonstrated some features of motor and sensory peripheral neuropathy. The electroneurographic study was consistent with a moderate demyelinating sensorimotor polyneuropathy in the upper and lower limbs. Cerebral and cerebellar atrophy were observed on magnetic resonance imaging (image not available).

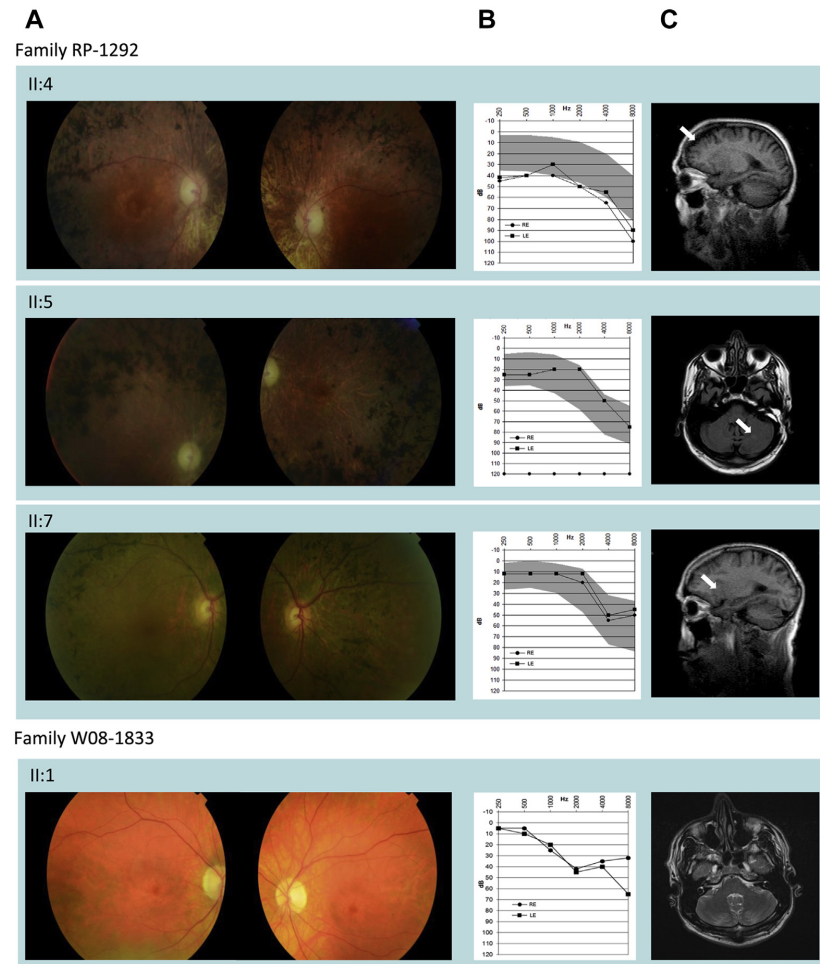
Patient II:1 from family W08-1833 did not report any neurologic symptoms, but a detailed neurologic examination revealed a wide-based gait, peripheral sensitivity loss at the lower extremities, and low tendon reflexes. Signs of ataxia were observed in stuttering speech, an ataxic heel-knee sign, and intentional tremor at the finger-to-nose test, although no structural abnormalities of the cerebellum were observed on magnetic resonance imaging examination (Fig 2C). Audiography revealed significantly decreased sensitivity of frequencies higher than 1500 Hz to levels of 40 dB or lower in both ears (Fig 2B).

### Discussion

The *ABHD12* gene is located on chromosome 20p11.21 and contains 13 exons, encoding a protein of 398 amino acids. The protein includes 1  $\alpha$ - $\beta$  hydrolase domain that spans amino acids 171 to 335 and contains 3 active sites located in residues 246, 333, and 372. In vitro, the ABHD12 enzyme hydrolyzes 2-arachidonoyl glycerol, the main endocannabinoid, by converting it into metabolites arachidonate and glycerol.<sup>21,22</sup> However, in vivo it is only responsible for a small fraction of the 2-arachidonoyl glycerol hydrolase activity in mouse brain, showing that in the mouse brain, ABHD12 is a major lysophosphatidylserine lipase.

In *Abhd12* knockout mice, auditory and motor defects and neuroinflammatory responses develop. These results suggested that the accumulation of the lysophosphatidylserine could contribute to the PHARC phenotype.<sup>23</sup> ABHD12 is differentially expressed in various cell types and cellular compartments,<sup>23–25</sup> being highly expressed in microglia. Endocannabinoids are implicated in microglia-mediated neuroinflammation, and the dysregulated lysophosphatidylserine metabolism produces microglial and neurobehavioral abnormalities.<sup>25</sup> Moreover, microglia dysfunction is known to be involved in neurodegenerative diseases<sup>26</sup> and in retinal dystrophies,<sup>27</sup> although further studies are mandatory to elucidate how the loss of the ABHD12 function results in the wide spectrum of phenotypes we are describing here.

After an exhaustive review of the literature (PubMed: *abhd12*; accessed January 17, 2014; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=abhd12>) and consultation of the databases (HGMD Professional 2013.4 and Eye Diseases-LOVD version 2.0; both accessed January 17, 2014) available for mutations in the *ABHD12* gene, it has been observed that a total of 7 different mutations in the *ABHD12* gene have been identified so far as causes of PHARC syndrome.<sup>9,10,11</sup> All of them are interpreted as null mutations leading to an abolished or a severely reduced activity of the encoded enzyme. In our study, we identified 5 new mutations in the *ABHD12* gene. Two of them were null mutations (p.Arg107Glufs\*8 and p.Trp159\*). As is the case with the previously described mutations, these changes also may result in a null allele, whereas the 3 novel missense changes, p.Arg186Pro, p.Thr202Ile, and p.His372Gln, may result in a



**Figure 2.** Phenotype of patients from the RP-1292 and W08-1833 families with mutations in the *ABHD12* gene. **A**, Spectrum of fundus findings in different individuals. Funduscopy of 3 patients of the RP-1292 family (II:4, II:5, and II:7) shows pale optic discs, attenuation of retinal vessels, and bone spicule pigmentation. Funduscopy of patient II:1 of the W08-1833 family shows pallor of the optic disc, attenuation of the arterioles, and parafoveal atrophy with bull's-eye appearance. **B**, Pure-tone air conduction audiograms of the patients. The grey areas are the hearing ranges for normal individual at 70 to 79 years of age (women), 70 to 79 years of age (men), and 60 to 69 years of age (men), respectively, as reported by Cruickshanks et al.<sup>32</sup> Family RP-1292: for patients II:4 (female) and II:7 (male), the audiogram shows age-related hearing loss. Audiogram of the patient II:5 (male) shows hearing loss of the right ear. Family W08-1833: audiogram of the patient II:1 shows sensorineural hearing loss of both eyes. **C**, Magnetic resonance imaging (MRI) scans. Family RP-1292: for patient II:4, MRI scan shows minimal cerebral atrophy (white arrow), whereas in patient II:5, some injuries in the left cerebellum hemisphere consistent with the consequence of an ischemic event (white arrow) are present. Patient II:7 has a minimal abnormality probably resulting from an ischemic injury (white arrow). Family W08-1833: for patient II:1, no structural abnormalities of the cerebellum are observed.

reduced, although not completely abolished, activity of the *ABHD* protein. Taking this hypothesis into account and considering what is known about other retinal dystrophies, it is reasonable to expect that mutations in the *ABHD12* gene may result in a range of disease, from lethal multisystem disorders associated with null alleles to a milder spectrum of manifestations from mutations with a hypomorphic

character.<sup>28,29</sup> However, after a thorough clinical examination of the patients with mutations in the *ABHD12* gene identified in this study, we could not establish a clear genotype–phenotype correlation.

Although the affected members of the RP-1487 and W08-1388 families showed a moderate form of PHARC syndrome including sensorineural hearing loss, cataract, RP,



and polyneuropathy, none of the patients from the RP-1292 family demonstrated symptoms that are distinctive of PHARC, and all of them indeed maintained the initial diagnosis of nonsyndromic RP even at later stages of life.

All the modest nonocular abnormalities, such as cataract, hearing loss, and ischemic injury, detected in the patients of the RP-1292 family were not debilitating and could be attributed to other age-related complications. It is well known that the development of the cataract, most prevalent being the posterior subcapsular cataract, in the RP population is more frequent than in the general population and also that the age of onset is earlier. However, this is usually present at mid stage in the progression of the disease.<sup>2,30,31</sup> The affected individuals from families RP-1487 and W08-1388 demonstrated a cataract at the same age or earlier than they demonstrated RP, whereas all affected members of the RP-1292 family demonstrated posterior subcapsular cataract at a very advanced age, an occurrence that is compatible with the natural course of RP or with the age of the patients.

Coinciding with the features described in PHARC syndrome, the patients II:2 (RP1487) and II:1 (W08-1388) showed a sensorineural hearing loss in the twenties and early thirties, respectively. However, in accordance with the report by Cruickshanks et al.<sup>32</sup> where it was demonstrated that hearing loss is a very common problem affecting older adults, 3 of 4 affected individuals for the RP-1292 family showed hearing loss that was diagnosed as age related (presbycusis) by the clinical specialists. However, the gait with a slightly wide base present in individual II:5 of the RP-1292 family is most likely the consequence of ischemic injuries in the left cerebellum.

Based on these results, it is not possible to establish a clear genotype–phenotype correlation for *ABHD12* mutations, and it is not clear if less detrimental mutations cause a less severe phenotype. Alternatively, the highly heterogeneous clinical differences observed in the patients with mutations in the *ABHD12* gene may suggest the involvement of genetic modifiers, as has been described previously in other cases for retinal dystrophies.<sup>33–36</sup> However, because one of the families presented in this study carries a missense mutation in the *ABHD12* gene and has members with nonsyndromic RP, we could not completely deny the possibility that hypomorphic mutations lead to milder disease. Overall, a larger number of patients with missense mutations in this gene need to be assessed clinically, which should be coupled further with functional analysis of the mutant proteins to draw definitive conclusions on the genotype–phenotype correlation.

In conclusion, this study allowed us to report 5 new variations in the *ABHD12* gene, representing the first time missense mutations have been described. We have determined, using a WES analysis followed by an exhaustive clinical examination, that mutations in the *ABHD12* gene can cause a wide spectrum of phenotypes ranging from PHARC syndrome to a nonsyndromic form of retinal degeneration.

**Acknowledgments.** The authors thank Anneke I. den Hollander for conceptual discussions and Dorien Lugtenberg for exome sequencing data interpretation.

## References

- Den Hollander AI, Black A, Bennett J, Cremers FP. Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. *J Clin Invest* 2010;120:3042–53.
- Hamel C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis* 2006;1:40.
- Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 2006;368:1795–809.
- Ayuso C, Garcia-Sandoval B, Najera C, et al. Retinitis pigmentosa in Spain. The Spanish Multicentric and Multidisciplinary Group for Research into Retinitis Pigmentosa. *Clin Genet* 1995;48:120–2.
- Retinal Information Network (RetNet). Number of Genes and Loci by Disease Category (One Disease per Gene/Locus). Available at: <https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm#A-genes>. Accessed February 4, 2014.
- Wright AP, Chakarova CF, Abd El-Aziz MM, Bhattacharya SS. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat Rev Genet* 2010;11:273–84.
- Berger W, Kloeckener-Gruissem B, Neidhardt J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res* 2012;29:335–75.
- Fiskerstrand T, Knappskog P, Majewski J, et al. A novel Refsum-like disorder that maps to chromosome 20. *Neurology* 2009;72:20–7.
- Fiskerstrand T, H'mida-Ben Brahim D, Johansson S, et al. Mutations in *ABHD12* cause the neurodegenerative disease PHARC: An inborn error of endocannabinoid metabolism. *Am J Hum Genet* 2010;87:410–7.
- Chen DH, Naydenov A, Blankman JL, et al. Two novel mutations in *ABHD12*: expansion of the mutation spectrum in PHARC and assessment of their functional effects. *Hum Mutat* 2013;7:410–7.
- Eisenberger T, Slim R, Mansour A, et al. Targeted next-generation sequencing identifies a homozygous nonsense mutation in *ABHD12*, the gene underlying PHARC, in a family clinically diagnosed with Usher syndrome type 3. *Orphanet J Rare Dis* 2012;7:59.
- Corton M, Nishiguchi KM, Avila-Fernández A, et al. Exome sequencing of index patients with retinal dystrophies as a tool for molecular diagnosis. *PLoS One* 2013;8:e65574.
- Neveling K, Feenstra I, Gilissen C, et al. A post-hoc comparison of the utility of Sanger sequencing and exome sequencing for the diagnosis of heterogeneous diseases. *Hum Mutat* 2013;34:1721–6.
- Corton M, Tatu SD, Avila-Fernandez A, et al. High frequency of *CRB1* mutations as cause of Early-Onset Retinal Dystrophies in the Spanish population. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:20.
- UniProtKB. Uniprot (Universal Protein Resource) database. Available at: <http://www.uniprot.org>. Accessed February 4, 2014.
- Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, et al. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography. *Doc Ophthalmol* 2009;118:69–77.
- Allikmets R, Singh N, Sun H, et al. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (*ABCR*) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* 1997;15:236–46.
- Allikmets R. Further evidence for an association of *ABCR* alleles with age-related macular degeneration. The International ABCR Screening Consortium. *Am J Hum Genet* 2000;67:487–91.

## Nishiguchi et al • ABHD12 Mutations in PHARC Syndrome and Nonsyndromic RP

19. Schuermann MJ, Otto E, Becker A, et al. Mapping of gene loci for nephronophthisis type 4 and Senior-Løken syndrome, to chromosome 1p36. *Am J Hum Genet* 2002;70:1240–6.
20. Hmani M, Ghorbel A, Boulila-Elgaied A, et al. A novel locus for Usher syndrome type II, USH2B, maps to chromosome 3 at p23-24.2. *Eur J Hum Genet* 1999;7:363–7.
21. Navia-Paldanius D, Savinainen JR, Laitinen JT. Biochemical and pharmacological characterization of human  $\alpha/\beta$  hydrolase domain containing 6 (ABHD6) and 12 (ABHD12). *J Lipid Res* 2013;53:2413–24.
22. Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol* 2007;14:1347–56.
23. Blankman JL, Long JZ, Trauger SA, et al. ABHD12 controls brain lysophosphatidylserine pathways that are deregulated in a murine model of the neurodegenerative disease PHARC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:1500–5.
24. Marrs W, Stella N. Measuring endocannabinoid hydrolysis: refining our tools and understanding. *AAPS J* 2009;11:307–11.
25. Muccioli GG, Xu C, Odah E, et al. Identification of a novel endocannabinoid-hydrolyzing enzyme expressed by microglial cells. *J Neurosci* 2007;27:2883–9.
26. Landreth GE. Microglia in central nervous system diseases. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009;4:369–70.
27. Ebert S, Weigelt K, Walczak Y, et al. Docosaehaenoic acid attenuates microglial activation and delays early retinal degeneration. *J Neurochem* 2009;110:1863–75.
28. Littink KW, Pott JW, Collin RW, et al. A novel nonsense mutation in CEP290 induces exon skipping and leads to a relatively mild retinal phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:3646–52.
29. Khan MI, Kersten FF, Azam M, et al. CLRN1 mutations cause nonsyndromic retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 2011;118:1444–8.
30. Pruett RC. Retinitis pigmentosa: clinical observations and correlations. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1983;81:693–735.
31. Lee SH, Yu HG, Seo JM, et al. Hereditary and clinical features of retinitis pigmentosa in Koreans. *J Korean Med Sci* 2010;25:918–23.
32. Cruickshanks KJ, Wiley TL, Tweed TS, et al. Prevalence of hearing loss in older adults in Beaver Dam, Wisconsin: The Epidemiology of Hearing Loss Study. *Am J Epidemiol* 1998;148:879–86.
33. Coppiaeters F, Casteels I, Meire F, et al. Genetic screening of LCA in Belgium: predominance of CEP290 and identification of potential modifier alleles in AHII of CEP290-related phenotypes. *Hum Mutat* 2010;31:E1709–66.
34. Khanna H, Davis EE, Murga-Zamalloa CA, et al. A common allele in RPGRIP1L is a modifier of retinal degeneration in ciliopathies. *Nat Genet* 2009;41:739–45.
35. Fahim AT, Bowne SJ, Sullivan LS, et al. Allelic heterogeneity and genetic modifier loci contribute to clinical variation in males with X-linked retinitis pigmentosa due to RPGR mutations. *PLoS One* 2011;6:e23021.
36. Estrada-Cuzcano A, Koenekoop RK, Senechal A, et al. BBS1 mutations in a wide spectrum of phenotypes ranging from nonsyndromic retinitis pigmentosa to Bardet-Biedl syndrome. *Arch Ophthalmol* 2012;130:1425–32.

## Footnotes and Financial Disclosures

Originally received: July 1, 2013.

Final revision: February 11, 2014.

Accepted: February 11, 2014.

Available online: April 1, 2014.

Manuscript no. 2013-1056.

<sup>1</sup> Department of Medical Genetics, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland.

<sup>2</sup> Department of Genetics, IIS-Fundación Jiménez Díaz, CIBERER, Madrid, Spain.

<sup>3</sup> Department of Ophthalmology, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands.

<sup>4</sup> Department of Ophthalmology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain.

<sup>5</sup> Department of Human Genetics, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands.

<sup>6</sup> Department of Neurology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain.

<sup>7</sup> Institute for Genetic and Metabolic Disease, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands.

<sup>8</sup> Department of Neurology, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands.

<sup>9</sup> Donders Institute for Brain, Cognition, and Behaviour, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands.

<sup>10</sup> Department of Genetics, Insular-Materno Infantil University Hospital, Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

<sup>11</sup> Nijmegen Center for Molecular Life Sciences, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands.

\*These authors contributed equally as first authors.

Financial Disclosure(s):

The author(s) have no proprietary or commercial interest in any materials discussed in this article.

Supported by the Spanish Ministry of Health, Madrid, Spain (grant no.: CIBERER ACCI); ONCE, Madrid, Spain (grant no.: FIS PS09/00459); and FUNDALUCE (grant no.: RD09-0076-00101 [Retics Bionbank]); the Swiss National Science Foundation, Berne, Switzerland (grant no.: 310030\_138346); the Gebert-Rüf Foundation, Basel, Switzerland (Rare Diseases—New Technologies grant); the Netherlands Organization for Scientific Research, Den Haag, The Netherlands (TOP grant no.: 91209047); and the Stichting A. F. Deutman Researchfonds Oogheelkunde Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands.

Abbreviations and Acronyms:

**arRP** = autosomal recessive retinitis pigmentosa; **MRI** = magnetic resonance imaging; **PHARC** = polyneuropathy, hearing loss, cerebellar ataxia, RP, and early-onset cataract; **RP** = retinitis pigmentosa; **WES** = whole exome sequencing.

Correspondence:

Carmen Ayuso, MD, PhD, Department of Genetics, IIS-Fundación Jiménez Díaz, CIBERER, Avenida de los Reyes Católicos, 2, 28040 Madrid, Spain. E-mail: cayuso@fjd.es.

## Resultados

---

### 3.2 Identificación de un nuevo gen, *ZNF408*, como causa de arRP

Dentro del amplio grupo de las distrofias de retina (DR), se encuentra la retinosis pigmentaria (RP) con una prevalencia de 1 en 4000 individuos, siendo una de las formas más frecuentes. Hasta la fecha, se han descrito mutaciones en más de 80 genes como causa de RP, una elevada heterogeneidad genética que dificulta el diagnóstico genético de los pacientes.

En este trabajo se realizó el estudio de una familia española afecta de RP no sindrómica con herencia autosómica recesiva (arRP) mediante la secuenciación de exoma completo y mapeo de homocigosidad, con el fin de identificar su causa genética. La combinación de ambas técnicas permitió la identificación de una delección en homocigosis de 2pb resultando en un codón de parada prematuro (p.Ala122Leufs\*2) en el gen *ZNF408* como causante del fenotipo. Tras este hallazgo se realizó el cribado del gen en una cohorte de 217 casos de arRP, encontrándose una mutación *missense* en homocigosis (p.Arg541Cys) en otra familia.

Puesto que simultáneamente este gen fue asociado a otra enfermedad ocular como es la vitreorretinopatía exudativa familiar (FEVR) autosómica dominante, tanto los pacientes afectados como los portadores asintomáticos disponibles se revisaron oftalmológicamente de forma detallada, no encontrándose signos de FEVR, y apareciendo únicamente, las alteraciones propias de la RP.

Los ensayos de inmunohistoquímica e inmunocolocalización revelaron la localización de *ZNF408* (*zinc-finger protein 408*) en los vasos retinianos así como en los distintos tipos celulares de la retina humana y distribuyéndose más específicamente en las zonas de eucromatina de la región nuclear, apoyando así su función como factor de transcripción. Además, se estudió el efecto funcional de la mutación *missense* p.Arg541Cys, observándose un reclutamiento parcial no significativo de la proteína *wild-type* por parte de la proteína mutante en el citoplasma. Estos resultados permitieron descartar un posible efecto dominante negativo de la mutación p.Arg541Cys, correspondiéndose con lo observado en los portadores asintomáticos. Tras estos estudios, *ZNF408* parece tener un papel importante en la retina, cumpliendo funciones esenciales en el mantenimiento homeostático así como en el desarrollo vascular.

Estos estudios presentan una nueva asociación genotipo-fenotipo consistente en una RP, lo que permitirá incluir este nuevo gen *ZNF408* en futuras aproximaciones diagnósticas. Además se ha podido profundizar en el posible papel que este gen está desempeñando en la retina, y puesto que *ZNF408* codifica para un factor de transcripción, la futura identificación de sus dianas transcripcionales podrá también ayudar al descubrimiento de nuevos genes implicados en DR.







Human Molecular Genetics, 2015, Vol. 24, No. 14 4037–4048

doi: 10.1093/hmg/ddv140  
 Advance Access Publication Date: 16 April 2015  
 Original Article

ORIGINAL ARTICLE

## Whole-exome sequencing reveals ZNF408 as a new gene associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa with vitreal alterations

Almudena Avila-Fernandez<sup>1,3,†</sup>, Raquel Perez-Carro<sup>1,3,†</sup>, Marta Corton<sup>1,3</sup>, Maria Isabel Lopez-Molina<sup>2</sup>, Laura Campello<sup>5</sup>, Alejandro Garanto<sup>6,7</sup>, Laura Fernandez-Sanchez<sup>5</sup>, Lonneke Duijkers<sup>6</sup>, Miguel Angel Lopez-Martinez<sup>1,3</sup>, Rosa Riveiro-Alvarez<sup>1,3</sup>, Luciana Rodrigues Jacy Da Silva<sup>1,3,8</sup>, Rocío Sanchez-Alcudia<sup>1,3</sup>, Esther Martin-Garrido<sup>1,3</sup>, Noelia Reyes<sup>1,3</sup>, Francisco Garcia-Garcia<sup>9,4</sup>, Joaquin Dopazo<sup>9,4,10</sup>, Blanca Garcia-Sandoval<sup>2</sup>, Rob W.J. Collin<sup>6,7</sup>, Nicolas Cuenca<sup>5</sup> and Carmen Ayuso<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, IIS-Fundacion Jimenez Díaz University Hospital (IIS-FJD, UAM), Madrid, Spain, <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, IIS-Fundacion Jimenez Diaz University Hospital, Madrid, Spain, <sup>3</sup>Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain, <sup>4</sup>Bioinformatics in Rare Diseases (BIER), Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia, Spain, <sup>5</sup>Department of Physiology, Genetics and Microbiology, University of Alicante, Alicante, Spain, <sup>6</sup>Department of Human Genetics, <sup>7</sup>Radboud Institute for Molecular Life Sciences (RIMLS), Radboud University Medical Center, Nijmegen 6525 GA, The Netherlands, <sup>8</sup>Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo, Brazil, <sup>9</sup>Computational Genomics Department, Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia, Spain and <sup>10</sup>Functional Genomics Node (INB), Valencia, Spain

\*To whom correspondence should be addressed at: University Hospital Fundación Jiménez Díaz, UAM (IIS-Fundacion Jimenez Diaz), Av. Reyes Católicos No 2. Madrid 28040, Spain. Tel: +34 609612728; Fax: +34 915504849; Email: cayuso@fjd.es

### Abstract

Retinitis pigmentosa (RP) is a group of progressive inherited retinal dystrophies that cause visual impairment as a result of photoreceptor cell death. RP is heterogeneous, both clinically and genetically making difficult to establish precise genotype-phenotype correlations. In a Spanish family with autosomal recessive RP (arRP), homozygosity mapping and whole-exome sequencing led to the identification of a homozygous mutation (c.358\_359delGT; p.Ala122Leufs\*2) in the ZNF408 gene. A screening performed in 217 additional unrelated families revealed another homozygous mutation (c.1621C>T; p.Arg541Cys) in an isolated RP case. ZNF408 encodes a transcription factor that harbors 10 predicted C2H2-type fingers thought to be implicated in DNA binding. To elucidate the ZNF408 role in the retina and the pathogenesis of these mutations we have performed different functional studies. By immunohistochemical analysis in healthy human retina, we identified that ZNF408 is expressed in both cone and rod photoreceptors, in a specific type of amacrine and ganglion cells, and in retinal blood vessels. ZNF408 revealed a

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

Received: February 19, 2015. Revised and Accepted: April 13, 2015

© The Author 2015. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

4037

cytoplasmic localization and a nuclear distribution in areas corresponding with the euchromatin fraction. Immunolocalization studies showed a partial mislocalization of the p.Arg541Cys mutant protein retaining part of the WT protein in the cytoplasm. Our study demonstrates that ZNF408, previously associated with Familial Exudative Vitreoretinopathy (FEVR), is a new gene causing arRP with vitreous condensations supporting the evidence that this protein plays additional functions into the human retina.

## Introduction

Retinitis pigmentosa [RP (MIM number 268000)] is the most common manifestation of inherited retinal dystrophy (RD), with a worldwide prevalence of 1:4000 approximately (1). It is characterized by a progressive degeneration of rod photoreceptors, leading to night blindness and constriction of the visual field, followed by the degeneration of cone photoreceptors, resulting in a total loss of vision.

There is a large variability in the age of onset, progression, retinal appearance and final visual outcome (2). RP is inherited in all Mendelian forms: autosomal dominant (20% of the cases), autosomal recessive (30%) or X-linked trait (10%). Approximately 40% of patients with RP represent isolated cases; the percentage varies among different populations (3,4). Non-Mendelian inheritance patterns such as digenic, mitochondrial or *de novo* mutations have been reported, accounting for a small proportion of cases (2).

To date, >70 genes have been associated with RP, being heterogeneous, both clinically and genetically. However, mutations in these genes account for the disease in little over half of all patients thus, remaining genes yet to be identified (4,5). Although the function of some of these genes has been extensively studied, it is difficult to establish a precise genotype-phenotype correlation because mutations in different RP genes can cause overlapping clinical phenotypes (6).

The ZNF408 gene encodes a zinc finger protein of 720 amino acids that is predicted to harbor 10 C2H2-type finger binding domains thought to be implicated in DNA binding.

Recently, in a large Dutch family, a heterozygous missense p.His45Tyr variant in ZNF408 has been associated to Familial Exudative Vitreoretinopathy [FEVR (MIM number 133780)], a disorder affecting the growth and development of blood vessels in the retina (7).

Interestingly, in this study novel homozygous mutations in the ZNF408 gene have been identified in two unrelated Spanish families as cause of RP. These findings support the hypothesis that different mutations, either in heterozygous or homozygous state, produce completely different phenotypes and suggest that ZNF408 may play additional roles apart from its implication in vasculature development. In this context, this is the first time the expression and cellular distribution of ZNF408 have been studied in the human retina.

## Results

### Previous studies

Two affected siblings (II:1 and II:2) of a Spanish family (RP-0322), whose parents came from the same and small geographic region (Fig. 1A), were diagnosed with autosomal recessive RP (arRP). In order to identify the genetic cause underlying the arRP within the family, first we performed whole-genome homozygosity mapping using high-resolution single nucleotide polymorphism (SNP)-array and further whole-exome sequencing (WES) analysis. A previous genotyping study for the index case (II:2) allowed discarding known mutations associated with arRP. Also, direct Sanger sequencing of the coding exons and flanking intronic sequences of EYS did not detect any mutated allele (8).

### Genetic analysis

#### Homozygosity mapping and WES analysis

Whole-genome homozygosity mapping in II:1 and II:2 of RP-0322 family was performed. The two affected siblings shared four homozygous regions ranging from 2.6 to 1.8 Mb (Table 1). These regions contain a total of 193 genes, none of which were previously associated with retinal dystrophies (RD).

Subsequently, the index case (II:2) of RP-0322 family was analyzed by WES. A total of 88,299,239 reads were uniquely mapped to exonic regions with a median of coverage of 59× (mean coverage 69.5×).

After excluding those variants present in non-coding regions and common variants with a minor allele frequency (MAF) <0.005 at dbSNP, 1000 genomes (1000g) or the exome variant server (EVS) databases, we reduced the number of candidate variants underlying RP from 8133 to 276 (Table 2). Assuming an autosomal recessive inheritance pattern and taking into account a very likely common ancestry in the affected family, homozygous variants lying in the previously identified homozygous regions were prioritized (Table 2). Also, the expression in human retinal tissues was considered. With this criteria, only one likely pathogenic candidate variant remained, i.e. a frameshift variant in exon 3 of ZNF408 (NM\_024741.2: c.358\_359delGT; p.Ala122Leufs\*2) (Fig. 1B). Due to its implication in vasculature development previously described and its expression in human retina, the ZNF408 gene was selected as a new candidate gene causing arRP.

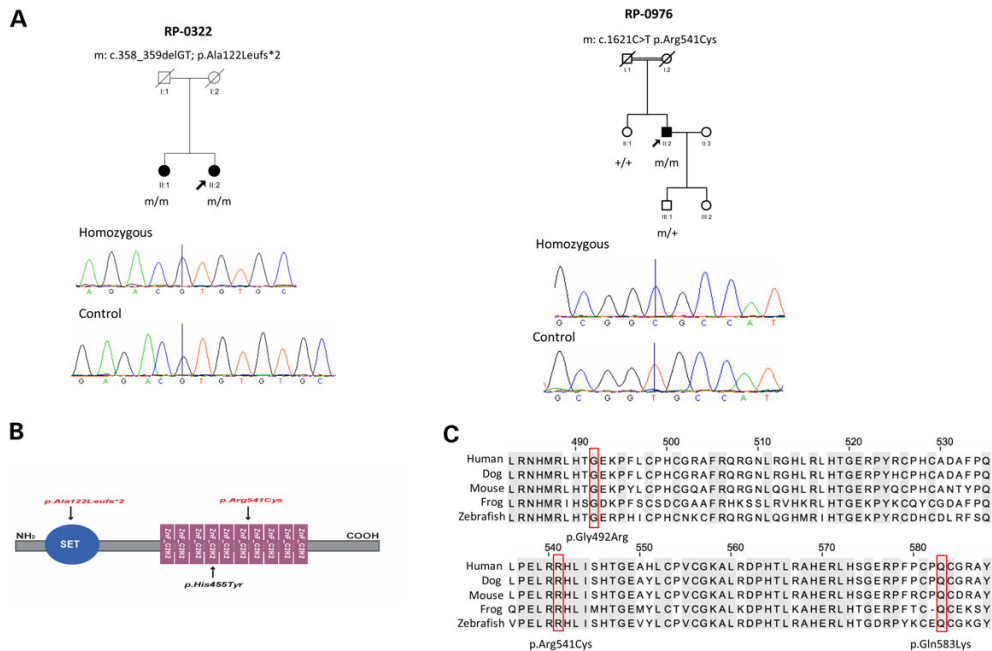
Sanger sequencing of the specific region confirmed the presence of this variant identified by WES (Fig. 1A). This variant was not found in 374 ethnically control alleles nor in 1000g or EVS databases.

#### Screening of the ZNF408 gene in an arRP Spanish cohort

Following this finding, and to determine the prevalence of the ZNF408 mutations as a potential cause of arRP, mutation analysis of the ZNF408 gene was performed by Sanger sequencing in 217 additional Spanish probands affected with sporadic and/or arRP. An additional ZNF408 variant (c.1621C>T; p.Arg541Cys) was found homozygously in a sporadic case from a consanguineous Spanish RP family (II:2, RP-0976, Fig. 1A). This variant was not found in a total of 374 healthy control Spanish chromosomes and in SNP databases (1000g and EVS databases). The Arginine residue at position 541 is localized in the seventh of the 10 zinc finger domain and is highly conserved across evolution (Fig. 1B and C).

Two other novel missense variants, p.Gly492Arg and p.Gln583Lys, were identified in heterozygous state in two other arRP patients. Both missense changes were not present in 75 in-house exome datasets. These residues are highly conserved (Fig. 1C), and *in silico* predictions of the pathogenicity of these two missense variants assessed both of them as deleterious (Table 3).

In addition, a comparative genomic hybridization array (aCGH) with an exonic coverage (Supplementary Material, Fig. S1) was performed to discard large deletions and copy number variations (CNVs) in the ZNF408 locus in both patients. No second allele was found in these two patients.



**Figure 1.** (A) Pedigrees of the two Spanish studied families with ZNF408 mutations. The index case is indicated with an arrow. Sanger sequencing confirms the mutations identified by WES and reveals their complete cosegregation with the disease. The chromatograms of a control and a homozygous individual with mutations are depicted for each variant (blue line). (B) Schematic overview of ZNF408 taken and modified from Collin et al., The mutation previously associated with FEVR is shown in black. The mutations identified in this study and associated with RP are shown in red. (C) Cross-species comparison of the region of ZNF408 indicates that the identified missense mutations affect a highly conserved residues (red box).

**Table 1.** Homozygous regions shared by the two affected members of the RP-0322 family

Ranking	Chr	Start position	End position	Size (Mb)	No. of genes
1	11	44 657 924	47 217 647	2.6	59
2	1	146 198 340	148 529 079	2.3	56
3	7	116 046 131	118 194 089	2.1	17
4	15	38 922 698	40 687 683	1.8	61

Listed are homozygous regions >1 Mb, sorted by size, the start and the end position by hg19 of the regions, the size and the number of genes encompassed each regions.

Chr, chromosome; Mb, megabases; No, number.

The variants p.Gly492Arg and p.Gln583Lys are highly conserved across the evolution (Fig. 1C), rendering it possible that these variants affect ZNF408 protein function but are not responsible for the phenotype in these particular patients.

#### Ophthalmic examination

The age of onset in all affected individuals (II:1 and II:2, RP-0322 and II:2, RP-0976) was 30, 40 and 17 years, respectively. Night blindness was the first symptom followed by visual field loss

**Table 2.** WES findings

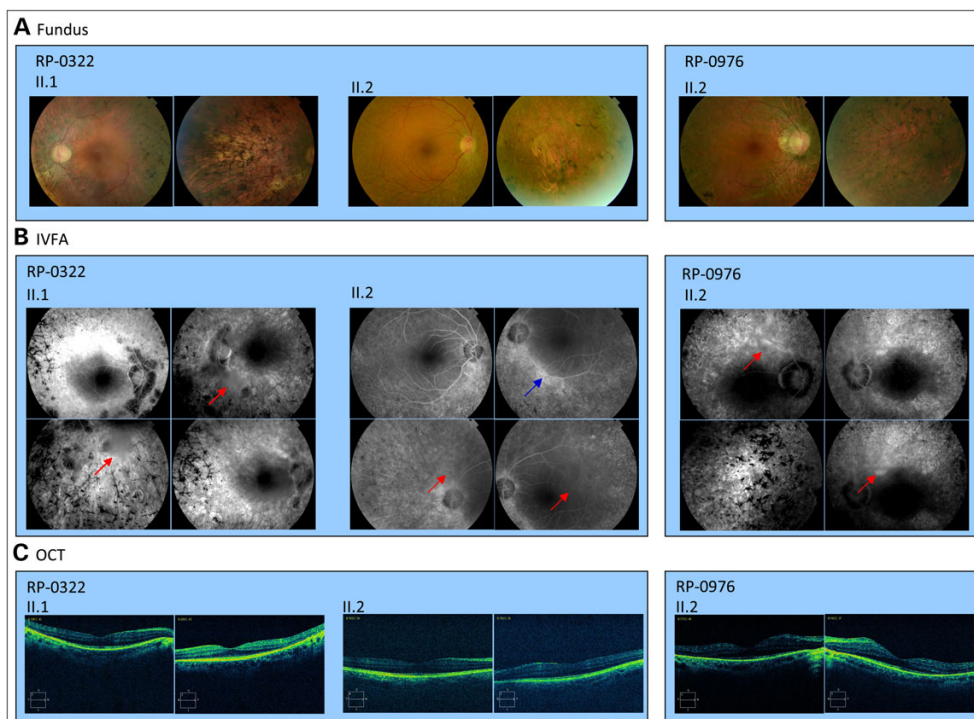
WES finding	No. of variants
Total	8133
Potentially functional variants	7570
Heterozygosis	3865
Homozygosis	3705
Effect	7570
Non-synonymous SNV	7131
Splicing	62
Stop-gain SNV	55
Stop-loss SNV	28
Frameshift	187
In-frame	107
MAF<0.005	276
Heterozygosis	150
Homozygosis	126
Variants in LOH	2
Splicing	1
Frameshift	1

Overview of the number of the high-confident variants present, after applying all quality filters, in the index case (II:2) of the RP-0322.

**Table 3.** Pathogenicity assessment of ZNF408 missense changes

Nucleotide change	Amino acid change	Frequency in control alleles	Predictions of pathogenicity		
			SIFT	Polyphen2	Align GVGD
c.1474G>A	p.Gly492Arg	0/150	Deleterious	Possibly damaging	Class C65
c.1621C>T	p.Arg541Cys	0/374	Deleterious	Possibly damaging	Class C65
c.1747C>A	p.Gln583Lys	0/150	Deleterious	Probably damaging	Class C45

Assessment of pathogenicity for the ZNF408 missense changes. For Align GVGD, class C65 and C45 represent the highest and moderate, respectively, likelihood of a change to be pathogenic.



**Figure 2.** Phenotype of affected individuals with mutations in the ZNF408 gene. (A) Spectrum of fundus findings in different individuals. Funduscopy of three patients (II.1 and II.2 of the RP-0322 family and II.2 for the RP-0976 family) shows pale optic disc, attenuation of retinal vessels and bone spicule pigmentation. For the II.2 of the RP-0976 family it is also shown spotty pigmentation and peripapillary atrophy. Macular preservation is observed in all cases. (B) IVFA of the patients. For the patient II.1 of the RP-0322 the IVFA shows vitreous alterations blurring fundus in some areas (red arrows). The IVFA for the patient II.2 (RP-0322) shows fluorescein enhancement along the inferior arcades (blue arrow), poor pigmentation in mottled pattern in midperiphery and some areas with vitreous condensations (red arrows). For the individual II.2 of the RP-0976 family the IVFA shows typical RP fundus findings and also vitreous condensations blurring of the fundus in some areas (red arrows). (C) Spectrum of OCT imaging in different individuals.

and reduction of visual acuity for all patients. At the time of the last ophthalmologic examination, visual fields were symmetrically reduced from 30 to 10°. The best corrected visual acuity (BCVA) ranged from 0.8 to 0.5. Posterior subcapsular cataract was found in all cases. Fundi showed the typical changes of RP with pale optic disc, narrowed vessels and bone spicule pigmentation (Fig. 2A). Full-field electroretinogram was nonrecordable or substantially reduced. The ophthalmologic data of the patients are summarized in Table 4.

In order to discard any distinctive sign of FEVR an intravenous fluorescein angiography was performed in homozygous (Fig. 2B) and heterozygous carriers (Supplementary Material, Fig. S2). The

intravenous fluorescein angiography (IVFA) for the II:1 (RP-0322) showed classic RP findings and also vitreous alterations in some areas, blurring the visibility of the fundus. Her affected sibling showed poor pigmentation in a mottled 'salt-and-pepper-like' pattern, especially in the midperiphery. Fluorescein enhancement along the inferior temporal arcades corresponds to retinal pigment epithelium (RPE) atrophy. Also, blurring of the fundus was found in some areas due to vitreous condensation. Similarly to the first family, IVFA of patient II:2 (RP-0976), carrying the missense p.Arg541Cys also showed typical RP fundus findings combined with vitreous condensations that clouds the visibility of the fundus (Fig. 2).

Table 4. Clinical features of patients with mutations in the ZNF408 gene

Family	Patient ID	Genotype	Mutations Allele1//Allele2	First symptoms and course	Age at diagnosis (years)	Age of ophthalmic evaluation (years)	BCVA RE/LE	Visual Field RE/LE	ERG	Fundus aspect	IVFA	OCT	Additional findings
RF-0922	I11	ZNF408	p.Ala122Leu167//p.Ala122Leu167	NB (30 years), field constriction and progressive loss of VA	52	69	0.5/0.8	Restricted to 10° central field	No register	Pale optic disc, narrow vessels, moderate bone spicule pigmentation and RPE atrophy in mid periphery and macular preservation	RP findings and vitreous alterations blurring fundus in some areas	No liquid, perfoveal thinning, incipient epiretinal membrane	Photophobia Posterior subcapsular cataract
	I12	ZNF408	p.Ala122Leu167//p.Ala122Leu167	NB (40 years), field constriction and progressive loss of VA	50	67	0.6/0.5	Restricted in superior and temporal hemifield/ Restricted to 30° central field inferiorly	Rods abolished Mixed, cones and flicker diminished	Normal optic disc, mildly attenuated vessels and poor pigmentation in lower hemiretina, macular preservation	Poor pigmentation in mottled pattern specially in midperiphery. Fluorescein enhancement along the inferior temporal arcades. Blurring of the fundus due to vitreous condensation	Normal morphology; no cysts, incipient epiretinal membrane	Photophobia Posterior subcapsular cataract
RF-0976	I12	ZNF408	p.Arg541Cys//p.Arg541Cys	NB, field constriction (17 years) and progressive loss of VA (36 years)	20	50	0.8/0.9	Restricted to 10° central field	NCD	Pale optic disc, peripapillary atrophy, vessel attenuation, both spotty and spicule pigmentation midperiphery, atrophy of the RPE and macular preservation	Typical RP fundus findings combined with vitreous condensations make difficult the visibility of the fundus	Normal morphology in the fovea, no cysts, atrophy in the periphery	Photosensitivity Posterior subcapsular cataract High myopia

ID, identification; BCVA, best corrected visual acuity; RE, right eye; LE, left eye; ERG, electroretinogram; IVFA, intravenous fluorescein angiography; OCT, optical coherence tomography; NB, night blindness; VA, visual acuity; RPE, retinal pigment epithelium; NCD, no clinical data.

The asymptomatic heterozygous p.Arg541Cys carriers (III:1 and III:2) from family RP-0976 were examined. No retinal vasculature abnormalities such as an avascular retina, neovascular membranes or tractional retinal detachments were observed in the retinal periphery on fundus, IVFA and optical coherence tomography (OCT) (Supplementary Material, Fig. S2).

Unfortunately, patients carrying heterozygous p.Gly492Arg and p.Gln583Lys variants were not available for performing additional ophthalmic examination.

#### ZNF408 is expressed in human retina especially in both cone and rod photoreceptor cells

ZNF408 is abundantly expressed in the human fetal eye as well as in the adult retina, suggesting that ZNF408 has an important role in eye development and visual function (7). However, its expression at the protein level and its localization in the human retina have never been investigated. To shed light on these aspects, ZNF408 protein expression and its cellular distribution were assessed using western blot and immunocytochemistry assays, respectively, on adult healthy human retina as well as in the 661W photoreceptor cell line.

In the human retina, the outer nuclear layer (ONL), ganglion cell layer (GCL) and both outer and inner plexiform layer (OPL and IPL) showed immunoreactivity against ZNF408 antibodies (Fig. 3A), being strongest at the ONL level.

In this context, ZNF408 immunolabeling at the ONL level presented intense spots of immunoreactivity located around the nuclei of the photoreceptors (Fig. 3A,B,F and G) and axon terminals (Fig. 3A,B and G; arrows). Additionally, the ZNF408 immunostaining pattern exhibited a marked expression in a specific subtype of amacrine cell (Fig. 3H) and a subtype of ganglion cell of big size, with label in their entire length, including cell body, dendrites and axons (Fig. 3A,B and I). In addition, ZNF408 immunoreactivity was found in dendrites located in the IPL and in some ganglion cell axons running under the ganglion cell bodies in the nerve fiber layer (Fig. 3I).

To verify that the ZNF408 staining was located at the ONL in rod and cones and not in the Müller cells processes, we performed a double immunolabeling with anti-CRALBP antibodies, a specific marker of Müller cells that marks these cells from the outer limiting membrane to the inner limiting membrane, labeling also the RPE (Fig. 3B). Müller cell bodies were located in the inner most layer in the INL and their external processes pass around the cell bodies of all retinal cells, from the outer to the inner limiting membrane (Fig. 3B red). Double labeling with anti-CRALBP and anti-ZNF408 antibodies showed no colocalization (Fig. 3B). Higher magnifications in Figure 4A–C (arrowheads) showed absence of this colocalization verifying thus that ZNF408 is located in cell bodies, cytoplasm and myoids of photoreceptor cells but not in Müller cells.

A closer view of the ONL showed that both rods (Fig. 3F arrowheads) and cones (Fig. 3G; arrowheads) photoreceptor cells presented ZNF408 immunoreactivity. At the OPL level rod spherules (Fig. 3A,B and G; arrows) and cone pedicles (double arrows in Figs 3A,B,G and 4L) were easy to identify. Additionally, a weaker staining was observed in the inner and outer segments (Fig. 3A and G). To confirm these results, we performed double immunostaining using antibodies raised against recoverin that label cone or rod photoreceptors and some type of bipolar cells, and anti-ZNF408. In this context, it was shown (Fig. 4D–F) colocalization of anti-ZNF408 and anti-recoverin in both, cone and rod photoreceptors. Immunoreactivity in rod myoids is sharply reduced at the OLM level (arrowheads in Figs 3A,B,F and 4A–C) and only a

weak immunostaining was observed in rod and cone outer segments. Double immunolabeling with anti-rhodopsin antibodies, a specific marker for rod outer segments, showed colocalization with the weak anti-ZNF408 immunoreactivity at this level (Fig. 4G–I). Cone photoreceptor cells exhibited a bright ZNF408 immunoreactivity in its cell bodies, myoids, axons and pedicles while ellipsoids and outer segments showed a lower immunostaining signal, as revealed the double immunolabeling against anti-cone arrestin (Fig. 4J–L).

As addressed before, ZNF408 is related with FEVR (7). Double immunolabeling using anti-ZNF408 and anti-collagen IV, a specific marker of blood vessels wall, was performed. Fig. 4M–O showed ZNF408 positive cells into blood vessels, which are presumably endothelial cells (Fig. 4M–O; insets). Additionally, an immunofluorescence dotted along the cross sections of blood vessels was observed (Fig. 4M–O, arrows). These results corroborate the relationship found between ZNF408 protein and FEVR patients by Collin and colleagues, supporting thus the role of ZNF408 protein in the development and maintaining of retinal blood vessels.

It is important to remark that the antibody ZNF408 specificity was confirmed by the lack of immunoreactivity in the retina when the antibody was previously preincubated with its blocking peptide (Fig. 3C).

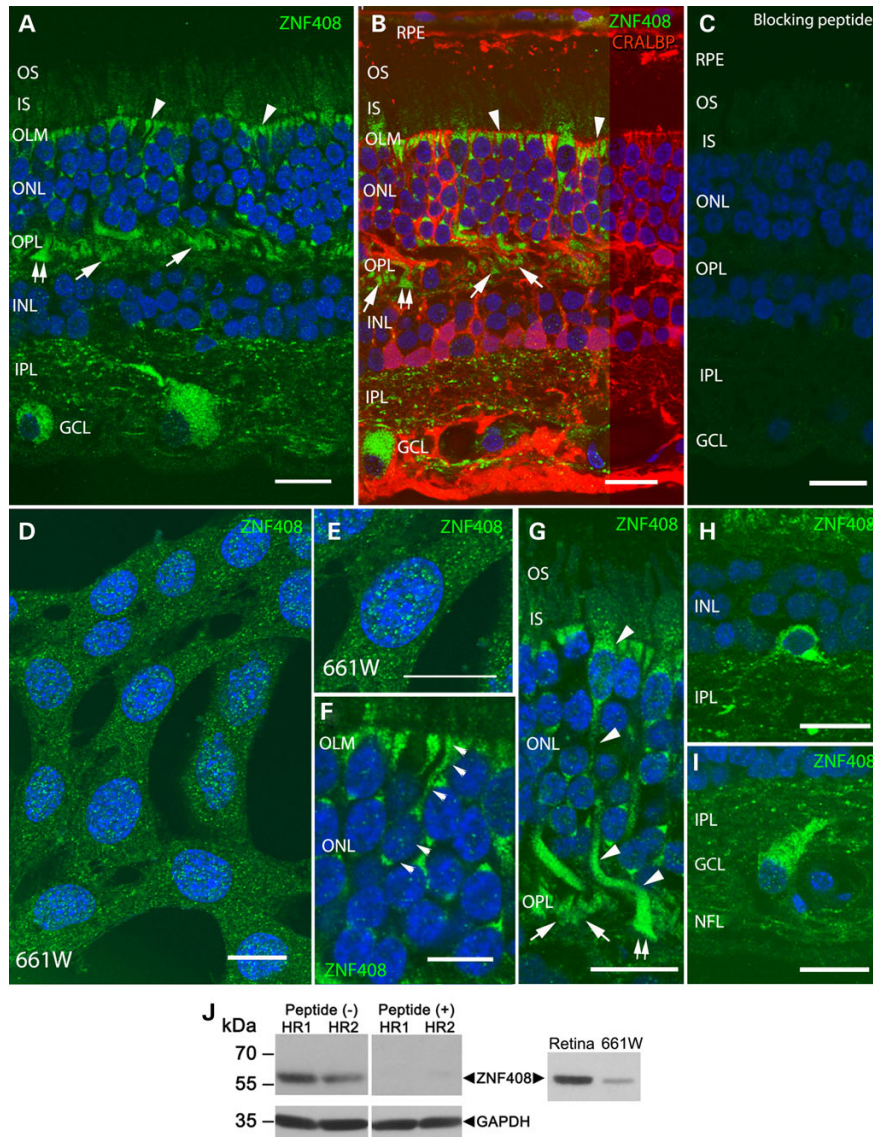
On the other hand, we performed immunocytochemistry analysis in the mouse retinal photoreceptor-derived 661W cell line. In this context, the ZNF408 immunolabeling exhibited a nuclear and cytoplasmic punctate staining pattern (Fig. 3D and E). It is important to highlight the ZNF408 staining in nuclei, as expected given that the ZNF408 gene encodes a transcription factor that harbors 10 predicted C2H2-type finger binding domains thought to be implicated in DNA binding (7). In all cases, the staining pattern appeared in the areas of the nucleus corresponding with the euchromatin fraction (Fig. 3E). Interestingly, this nuclear distribution was also observed in the human retina as demonstrated in cones and rods (Fig. 3F and G), neurons in the INL and ganglion cells (Fig. 3A and I).

The immunoblotting analysis revealed the presence in the human retina and in the 661W cell-line samples of a prominent and specific immunoreactive band with an apparent molecular weight of approximately 67 kDa corresponding to the ZNF408 protein (Fig. 3J). We confirmed the specificity of the antibody by verifying that pre-adsorption of the antibody with the immunogenic peptide interferes with the ZNF408 detection. The observed size which was lower than the predicted for the isoform encoded by the canonical ZNF408 transcript (78.439 kDa) could be the result of a non-uniform binding of the negatively charged SDS to the protein due to its amino acid composition or the presence of a post-translational cleavage of canonical protein, among others.

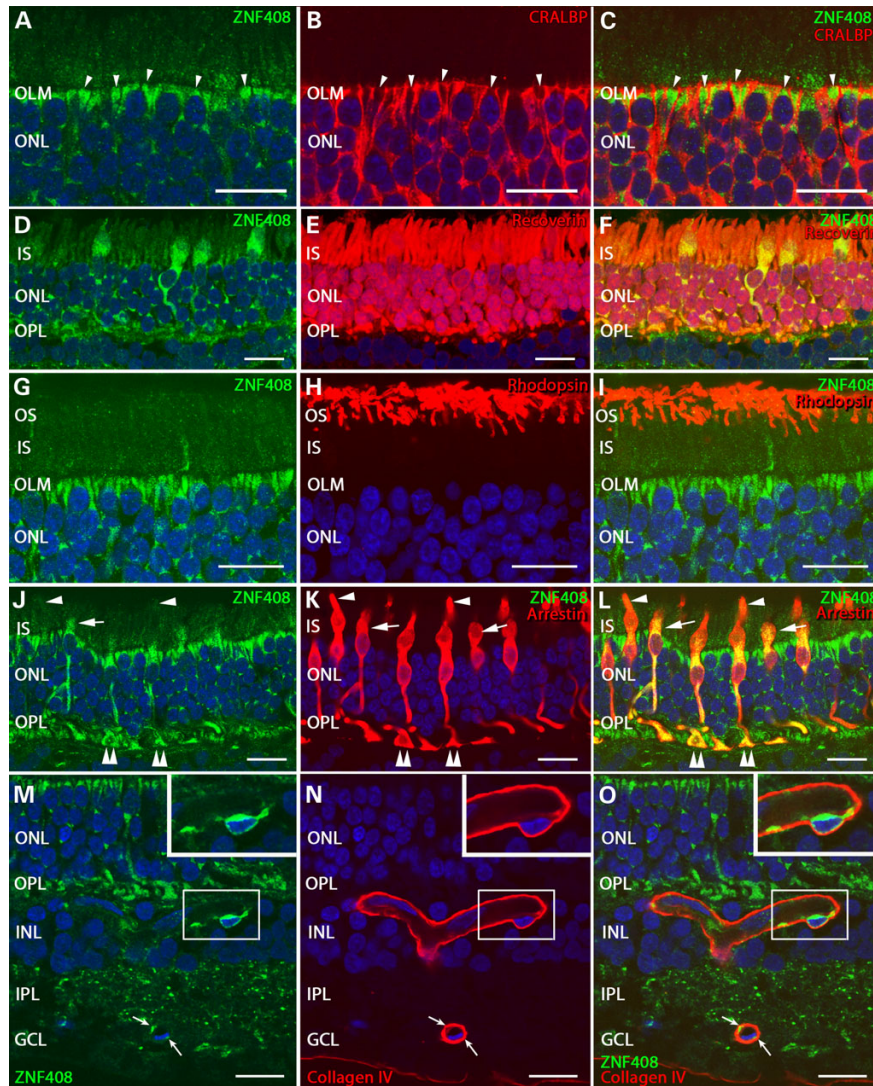
#### Partial mislocalization of WT ZNF408 in presence of mutant p.Arg541Cys protein

Constructs of the wild-type (WT) and the p.His455Tyr mutant together result in mislocalization of the WT ZNF408 in the cytoplasm suggesting oligomerization of ZNF408 WT and mutant proteins (7). In order to probe the behavior of our arRP-associated p.Arg541Cys variant, similar ZNF408 WT and mutant cotransfection studies were performed. Constructs expressing N-terminal HA-tagged fusion proteins of WT\_ZNF408 or the ZNF408\_p.Arg541Cys mutant were generated. The analysis of >100 cells by immunocytochemistry of transiently transfected COS-1 cells revealed that localization of WT is exclusively restricted to the nucleus. The p.Arg541Cys mutant ZNF408 also mainly localizes





**Figure 3.** Immunocytochemistry assays in cryofixed human retina sections and in the 661W photoreceptor cell-line. (A–C,F–H) Human retina immunolabeled with antibody against ZNF408 (green) and CRALBP (red). Nuclei are labeled with TO-PRO (blue). (A,B) ZNF408 distribution in the ONL, OPL, IPL and GCL. (B) Double immunolabeling against CRALBP and ZNF408 antibodies showed no colocalization with Müller cells. (C) No immunofluorescence was detected in section using pre-adsorption with the blocking peptide. (F–G) High magnification of photoreceptors showing immunoreactivity in both rods (F) and cones (arrowheads) (G). ZNF408 is expressed in cell bodies of some type of amacrine (H) and ganglion (I) cells and its dendrites in the IPL (A,B,H,I). Arrows in (A,B,G) indicates spherules of rods while double arrows in (A,B,G) indicates pedicles of cones. Arrowheads in A,B,G show ZNF408 immunolabeling at the border of the OLM. Arrows in (F) indicated the rod myoid and cell body. (D,E) Nuclear and cytoplasmic ZNF408 immunoreactivity in the 661W photoreceptor cell-line. Note the ZNF408 localization in the less condensed chromatin areas. (J) Immunoblotting analysis of ZNF408 protein. Human retina (from two different individual, HR1 and HR2) and 661W photoreceptor cell-line samples expressed strongly immunoreactive bands detected with ZNF408 or GAPDH antibodies (arrowheads). Protein molecular weight markers are given to the left. ZNF408 staining (peptide –) was specifically abolished when the ZNF408 antibody was preincubated with its immunogen peptide (peptide +). Scale bar A,B,C,D,E,G,H = 20, F = 10  $\mu$ m.

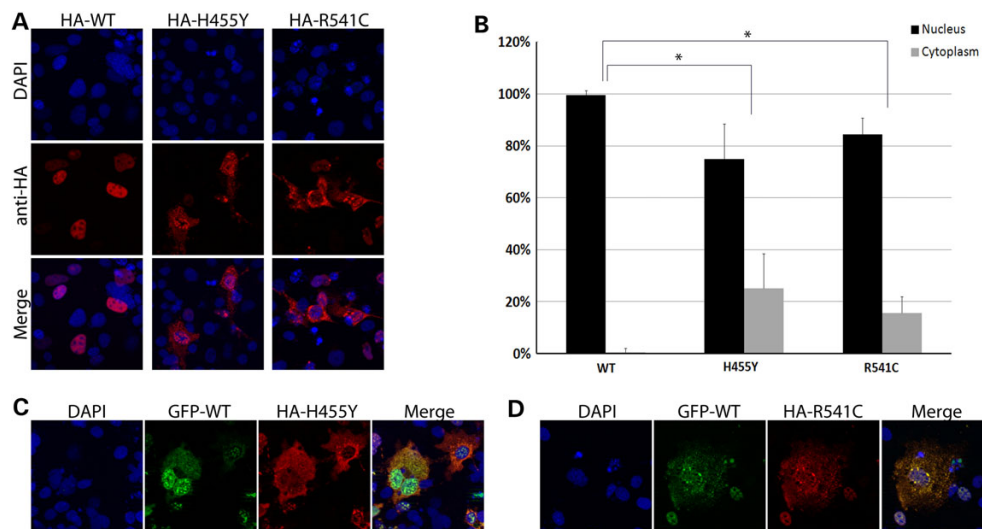


**Figure 4.** Immunocolocalization of ZNF408 in cryostat sections of human retina. Double immunolabeling of ZNF408 with antibodies against CRALBP, a specific marker for Müller cells and RPE (A-C); recoverin that labels cone and rod photoreceptors (D-F); rhodopsin, a marker for rod outer segments, (G-I) and cone arrestin that labels cone photoreceptors (J-L). Blood retinal vessels were labeled with anti-Collagen IV (M-O). No colocalization of ZNF408 and Müller cells were found in the ONL (A-C, arrowheads). Photoreceptor cells labeled with recoverin antibody showed colocalization with ZNF408 in both cones and rods (D-F). ZNF408 showed a weak immunolabeling in rod outer segments labeled with antibodies against rhodopsin (G-I). In addition, the double immunostaining with antibodies against arrestin showed a strong colocalization of ZNF408 in cones where it was located on cell bodies, axons and pedicles (double arrowheads), myoids and elipsoids (arrows), as well as a weak immunoreactivity was observed in the outer segments (arrowheads) (J-L). Antibodies against collagen IV immunolabeled the retinal blood vessels wall (N-O). ZNF408 immunopositive cells were present presumably in endothelial cells of the blood vessels (M-O, square), as well as immunoreactive spots were found along blood vessels in horizontal sections (M-O, arrows). Scale bar = 20  $\mu$ m.

to the nucleus, but occasionally is also present in the cytoplasm of the transfected cells (Fig. 5A and B). In both cases, the accumulation of both mutants in the cytoplasm were statistically significant. However, the p.Arg541Cys mutant did not show a statistically

significant decrease in the amount of cells showing nuclear localization of the ZNF408 protein when compared with the p.His455Tyr mutant. Upon co-transfection analysis of GFP-tagged WT ZNF408 and HA-tagged p.Arg541Cys mutant ZNF408, in those





**Figure 5.** Immunocytochemical analysis. (A) COS-1 cells transiently transfected with constructs encoding HA-tagged WT and mutant (p.His455Tyr, p.Arg541Cys) ZNF408 proteins. DAPI stains cell nuclei (top), whereas the anti-HA antibody stains the ZNF408 fusion proteins (middle). Merged pictures are shown on the bottom. Representative examples are shown for each transfection, indicating full nuclear localization for the WT, but with a partial cytoplasmic localization of the p.His455Tyr and p.Arg541Cys mutant ZNF408 proteins. (B) Quantification by fluorescence microscopy. \*Significant differences ( $P < 0.0001$ ). (C,D) Cotransfection analysis of WT and p.His455Tyr and p.Arg541Cys mutant ZNF408 proteins respectively. DAPI stains cell nuclei (left), GFP stains ZNF408 WT and anti-HA stains ZNF408 mutants (middle) and on the right the merge pictures are showed.

cells where p.Arg541Cys ZNF408 is located in the cytoplasm, it appears to also result in mislocalization of the WT ZNF408 (Fig. 5D). Although similar observations were found with the p.His455Tyr mutant, the amount of mislocalized WT ZNF408 protein appears to be less compared to the FEVR-causing p.His455Tyr variant (Fig. 5C and D).

## Discussion

In this study, we combined homozygosity mapping and whole-exome sequencing analysis to identify two novel homozygous mutations in ZNF408 in unrelated Spanish families affected with RP. Furthermore, our functional studies provide evidence for the first association of this gene with inherited retinal dystrophy to date.

ZNF408 belongs to a large family of transcription factors characterized by an N-terminal a set domain and tandem C-terminal C2H2-type zinc fingers. This gene is highly expressed in human adult and fetal retinal tissues, as was shown by RT-PCR analysis (7), suggesting that ZNF408 could have an important role in retina development and homeostasis.

A heterozygous mutation in ZNF408 has been previously described as cause of FEVR. FEVR is a rare, autosomal-dominant inherited disorder characterized by an incomplete vascularization of the peripheral retina and/or retinal blood vessel differentiation.

However, the two RP families described herein did not show any evident sign of FEVR. Interestingly all affected members of both families presented some vitreous alterations but, the ZNF408-linked RP phenotype of our individuals is completely different from that of FEVR and thus represents a different clinical form caused by mutations in ZNF408.

Previous studies have been described posterior vitreous detachment and other vitreous alterations, including fibrillary

degenerations, floaters, cottonball-like condensations, non-pigmentary and pigmentary particulation in RP patients (9–11). In our patients, the density of the vitreous alterations is higher to the previously described, blurring the fundus resembling the vitreoretinal dystrophies although the morphology is not exactly veils. Therefore, the homozygous mutations described seem to cause a consistent typical RP phenotype with minor vitreous abnormalities other than those found in FEVR patients.

Strikingly, in the RP-0322 family, we have found a homozygous frameshift mutation that it is expected to truncate the ZNF408 protein at its N-terminal, and thus predicted to result in a complete loss-of-function of ZNF408. The identification of a homozygous likely pathogenic missense variant in a second family strongly supports the implication of ZNF408 in retinal degeneration. Our data suggest that ZNF408 may have essential functions in maintenance of retinal homeostasis, in addition to its role in vasculature development.

Since FEVR is inherited as an autosomal-dominant manner and it is known that asymptomatic FEVR patients frequently have very early manifestation of the vitreoretinal findings on angiography (12), an exhaustive ophthalmic examination was performed to exclude any symptom of FEVR in heterozygous carriers of the missense variants found in this study. However, no vascular alterations were observed in the examined asymptomatic individuals.

It is intriguing how different mutations in ZNF408 could cause distinctive phenotypes of retinal disease with clearly different pathogenic mechanisms and also unequivocal inheritance patterns, such as adFEVR and arRP.

As previously described, the FEVR-associated p.His455Tyr variant could act as dominant-negative mutation. However, although the partial retention of the WT\_ZNF408 by the ZNF408\_p.Arg541Cys mutant was shown, this is not enough to produce a dominant-negative

effect suggesting different mutational mechanisms for these two variants. This hypothesis is also strongly supported by the absence of phenotypic alterations in heterozygous carriers of the p.Arg541Cys mutation, i.e. neither displaying features of arRP nor adFEVR.

Zinc fingers are elements for DNA binding found in a high number of proteins which participate in a wide variety of cellular activities (13). The greater the number of finger domains, the higher versatility and the more fingers with specific affinity for different ligands in specific classes of proteins (14,15). ZNF408 comprises 10 of such domains that could have different and still unknown cellular functions in several parts of the organism. The presence of mutations in these different domains suggests these changes are altering the interaction of ZNF408 with specific targets, thereby resulting in the dysregulation of different target genes and subsequently are underlying either FEVR or RP.

Although further studies are mandatory to elucidate the role of ZNF408 in the human retina, it is also important to highlight the ZNF408 staining pattern localizes in the dark areas of the nucleus corresponding with the euchromatin fraction supporting the hypothesis that ZNF408 encodes a transcription factor widely expressed in the human retina. Mutations in other genes encoding transcription factors, such as the photoreceptor-specific nuclear receptor subfamily 2 group E member 3 (NR2E3) gene, which plays a critical role in the photoreceptor differentiation, have been associated with a variety of RDs, such as RP, Goldman-Favre disease or Enhanced S-cone syndrome, and can display different clinical features and patterns of inheritance, including autosomal-dominant and autosomal recessive (16-19).

Further studies on the identification of the transcriptional targets of ZNF408 could help us to highlight new genes implicated for retinal development that could be good candidates for RD.

Here, in order to identify the disease-causing gene in a Spanish family diagnosed with autosomal recessive RP (arRP), we have performed a combined approach including whole homozygosity mapping followed by a WES. The study revealed the presence of two novel different mutations in the ZNF408 gene in two unrelated arRP Spanish families and thereby expanding the spectrum of ZNF408 mutations to be associated with a new phenotype consisting of RP with vitreous condensations.

## Materials and Methods

### Patient recruitment

Patients diagnosed with RP were recruited from the Biobank of the Fundación Jiménez Díaz Hospital (Madrid, Spain). Diagnostic criteria of RP included night blindness and/or peripheral visual loss, with visual field loss and poor visual acuity in advanced stages of the disease. A commercial arRP genotyping microarray v2.0 (AsperBiotech, Tartu, Estonia) was used in the index cases to discard known mutations (20). A total of 218 unrelated Spanish families with autosomal recessive or sporadic RP were selected. Informed consent was obtained from all patients and family members or their legal guardians involved in the study. All procedures were reviewed and approved by the Ethics Committee of the Hospital and adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki (Fortaleza 2013).

One hundred and eighty-seven unrelated individuals of Spanish origin without RP family history were screened as controls to evaluate the frequency of the missense mutation found in this study.

Peripheral blood samples from all participating individuals were collected in EDTA tubes. Genomic DNA was extracted with

an automated DNA extractor (model BioRobotEZ1; QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions.

### Genetic analysis

#### Homozygosity mapping

A whole-genome homozygosity mapping was performed using Affymetrix 6.0 genotyping arrays (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA). Arrays were processed according to manufacturer's protocols by the Spanish Center for Genotyping (CEGEN, Santiago de Compostela, Spain). Homozygosity regions were calculated using the Linkage Disequilibrium-Hidden Markov Model algorithm (21) through the dCHIP software (22). Regions with a size >1 Mb were considered candidate regions to harbor the genetic defect.

#### Next-generation sequencing

WES analysis was performed by the Spanish Centre for Genome Analysis (CNAG, Barcelona, Spain). The SureSelect Human All Exon Version 4 kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used for in-solution enrichment of coding exons and flanking intronic sequences following the manufacturer's standard protocol. Sequencing was done with an Illumina HiSeq2000 sequencing platform (Illumina) generating paired-end reads up to 100 cycles.

Base calling and quality control were performed using the Illumina RTA sequence analysis pipeline. Bioinformatic analysis of the sequencing data was done by the Bioinformatic Platform for Rare Diseases (CIBERER-BIER, <http://www.ciberer.es/bier/>), using standard tools for quality control, sequence alignment, and variant calling in combination with our own in-house scripts including that of single nucleotide variants (SNVs) and small indels (23).

#### Sanger sequencing analysis

Bidirectional automatic sequencing was performed in order to confirm and segregate the obtained results by whole-exome sequencing, also to screen the ZNF408 gene in 217 additional arRP families, and to determine the frequency of one of the missense variations in the control population. Exons and exon-intron boundaries of the ZNF408 gene (NM\_024741.2) were analyzed using eight oligonucleotide primers pairs designed using Primer3 software. Sequences and annealing temperatures are available on request. The PCR products were enzymatically purified with ExoSAP-it (USB, Affymetrix) and sequenced using Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit version 1.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). The PCR products were resolved on an automated sequencer (ABI 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

Sequencing results were analyzed by using Staden Package 1.7.0 software by assembling and visualizing the aligned sequences of the exons.

#### Prediction of the pathogenic effect of the variants

Pathogenicity of this variant was firstly assessed by co-segregation with the disease in the family, by its absence in a total of 374 healthy control Spanish chromosomes and in SNP databases (1000g and EVS databases) and by bioinformatic prediction tools (SIFT, Polyphen2 and align-GVGD) which classified this variant as most likely damaging and by the amino acid conservation across five orthologs of the ZNF408 protein belonging to different evolutionary branches. The Clustal Omega tool and the Jalview Alignment Editor program were used to analyze the multiple sequence alignments.

**Comparative genomic hybridization array**

The custom aCGH 8 × 60k using Agilent SurePrint G3 CGH was designed using the Agilent eArray website (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>) with an average distribution of one probe per 150 pb in the ZNF508 gene.

Briefly, genomic DNA (200 ng) from the patient and from a sex-matched control were digested by AluI and RsaI restriction enzymes for 2 h at 37°C and the digested products were labeled with Cy3-dUTP and Cy5-dUTP fluorochromes using the Sure Tag DNA Labeling Kit (Agilent Technologies). The labeled products were purified, hybridized and washed according to Agilent protocols. The slide was scanned on a SureScan G4900DA scanner (Agilent Technologies), and the resulting TIFF images were converted by the image conversion Feature Extraction software (Agilent Technologies). Results were analyzed by Agilent CytoGenomics software v.2.7 using default analysis method—CGH v2 with the ADM-2 aberration algorithm.

**Ophthalmic examination**

Ophthalmic examinations were performed for all patients with mutations in ZNF408 and the available heterozygous carriers. The evaluation included visual acuity, intraocular pressure, ocular motility, pupillary reaction, biomicroscopic slit lamp examination and dilated fundus examination. Visual function was evaluated by static perimetry and Ganzfeld electroretinography according to the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) (24). An IVFA was performed.

**Immunohistochemistry**

The ZNF408 localization pattern was determined in cryofixed healthy adult human retina sections. They were immunostained at room temperature overnight with rabbit polyclonal antibodies to human ZNF408 from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA; Catalog No. sc-134190) diluted at 1:50 in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4), 0.5% Triton X-100 in the presence or absence of blocking peptide (20:1 peptide: antibody ratio; LifeTein South Plainfield NJ, USA). Double immunocytochemistry with ZNF408 were performed using it in combination with: monoclonal mouse anti-rhodopsin (Millipore Temecula, CA, USA), goat anti-recoverin (Santa Cruz Biotechnology Inc. TX, USA), goat anti-collagen IV (Millipore Temecula, CA, USA) and monoclonal mouse anti-cone arrestin (Dr MacLeish, Morehouse School of Medicine; Atlanta, GA, USA) (25,26). In addition, the 661W photoreceptor cell-line was also probed with the ZNF408 antibodies.

Furthermore, ZNF408 protein expression was assessed using western blotting on adult healthy human retinas as well as in the 661W photoreceptor cell-line. Briefly, proteins were extracted and subjected to immunoblotting analysis. Proteins (40 µg/lane) were resolved by SDS-PAGE on 4–20% polyacrylamide-gradient gels and electrotransferred to Hybond-P PVDF membranes (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). These were probed at 4°C overnight with the same ZNF408 antibodies used in immunocytochemistry assays at a 1:100 dilution in 25 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl (TBS) in the presence or absence of blocking peptide (10:1 peptide: antibody ratio; LifeTein South Plainfield NJ, USA), or with mouse monoclonal antibodies to rabbit muscle GAPDH at a 1:1000 dilution (Millipore; Catalog No. MAB374). Thereafter, the membranes were incubated at room temperature for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or goat anti-mouse (Pierce, Rockford, IL, USA) IgG at a 1:20,000 dilution. Detection was performed by enhanced

chemiluminescence using the SuperSignal West Dura system (Pierce).

**Transfection of COS-1 cells**

Constructs expressing HA-tagged or eCFP-tagged WT and mutant ZNF408 were designed using the mammalian expression vector pcDNA3-HA/DEST or pcDNA3-eCFP/DEST, both driven by a cytomegalovirus promoter.

COS-1 cells were transiently transfected using Effectene (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. In both cases, unpaired Student's t-test as well as Mann-Whitney analyses were used to determine if there were statistically significant differences. Images were obtained with a Zeiss AxioImager Z1 upright fluorescent microscope and processed with a Zeiss ApoTome slider module. All experiments were performed in duplicate (7).

**Supplementary Material**

Supplementary Material is available at HMG online.

**Acknowledgements**

We would like to thank to FJD-Biobanco (PT13/0010/0012), Services of Genetics and Ophthalmology IIS-Fundacion Jimenez Diaz, (Madrid) and to Spanish Center for Genotyping (CEGEN, Santiago de Compostela, Spain) for their contributions to this work.

*Conflict of Interest statement.* None declared.

**Funding**

This work is supported by CIBERER (06/07/0036), FIS (PI013/00226), Ministry of Economy and Competitiveness-FEDER (BFU2012-36845), RETICS (RD12/0034/0010), Fundación ONCE, Fundaluce and grants BIO2011-27069 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, and PROMETEIOII/2014/025 from the Conselleria de Educacio of the Valencia Community. PC is supported by Fundación Conchita Rábago (FCR), MC by Miguel Servet ISCIII (CP/03256) and dS by CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil.

**References**

1. Ayuso, C. and Millan, J.M. (2010) Retinitis pigmentosa and allied conditions today: a paradigm of translational research. *Genome Med.*, **2**, 34.
2. Hartong, D.T., Berson, E.L. and Dryja, T.P. (2006) Retinitis pigmentosa. *Lancet*, **368**, 1795–1809.
3. Ayuso, C., Garcia-Sandoval, B., Najera, C., Valverde, D., Carballo, M. and Antinolo, G. (1995) Retinitis pigmentosa in Spain. The Spanish multicentric and multidisciplinary group for research into retinitis pigmentosa. *Clin. Genet.*, **48**, 120–122.
4. den Hollander, A.I., Black, A., Bennett, J. and Cremers, F.P. (2010) Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. *J. Clin. Invest.*, **120**, 3042–3053.
5. Wright, A.F., Chakarova, C.F., Abd El-Aziz, M.M. and Bhattacharya, S.S. (2010) Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 273–284.

6. Berger, W., Kloeckener-Gruissem, B. and Neidhardt, J. (2012) The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog. Retin. Eye Res.*, **29**, 335–375.
7. Collin, R.W., Nikopoulos, K., Dona, M., Gilissen, C., Hoischen, A., Boonstra, F.N., Poulter, J.A., Kondo, H., Berger, W., Toomes, C. et al. (2013) ZNF408 is mutated in familial exudative vitreoretinopathy and is crucial for the development of zebrafish retinal vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 9856–9861.
8. Barragan, I., Borrego, S., Pieras, J.I., Gonzalez-del Pozo, M., Santoyo, J., Ayuso, C., Baiget, M., Millan, J.M., Mena, M., Abd El-Aziz, M.M. et al. (2010) Mutation spectrum of EYS in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum. Mutat.*, **31**, E1772–E1800.
9. Hikichi, T., Akiba, J. and Trempe, C.L. (1995) Prevalence of posterior vitreous detachment in retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Surg.*, **26**, 34–38.
10. Vingolo, E.M., Giusti, C., Forte, R. and Onori, P. (1996) Vitreal alterations in retinitis pigmentosa: biomicroscopic appearance and statistical evaluation. *Ophthalmologica*, **210**, 104–107.
11. Sudarshan, A.P. (1999) Vitreous change in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*, **106**, 210.
12. Kashani, A.H., Learned, D., Nudleman, E., Drenser, K.A., Capone, A. and Trese, M.T. (2014) High prevalence of peripheral retinal vascular anomalies in family members of patients with familial exudative vitreoretinopathy. *Ophthalmology*, **121**, 262–268.
13. Pavletich, N.P. and Pabo, C.O. (1993) Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science*, **261**, 1701–1707.
14. Morgan, B., Sun, L., Avitahl, N., Andrikopoulos, K., Ikeda, T., Gonzales, E., Wu, P., Neben, S. and Georgopoulos, K. (1997) Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *EMBO J.*, **16**, 2004–2013.
15. Tsai, R.Y. and Reed, R.R. (1998) Identification of DNA recognition sequences and protein interaction domains of the multiple-Zn-finger protein Roaz. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 6447–6456.
16. Escher, P., Gouras, P., Roduit, R., Tiab, L., Bolay, S., Delarive, T., Chen, S., Tsai, C.C., Hayashi, M., Zernant, J. et al. (2009) Mutations in NR2E3 can cause dominant or recessive retinal degenerations in the same family. *Hum. Mutat.*, **30**, 342–351.
17. Pachydaki, S.I., Klaver, C.C., Barbazetto, I.A., Roy, M.S., Gouras, P., Allikmets, R. and Yannuzzi, L.A. (2009) Phenotypic features of patients with NR2E3 mutations. *Arch. Ophthalmol.*, **127**, 71–75.
18. Kanda, A. and Swaroop, A. (2009) A comprehensive analysis of sequence variants and putative disease-causing mutations in photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3. *Mol. Vis.*, **15**, 2174–2184.
19. Yang, Y., Zhang, X., Chen, L.J., Chiang, S.W., Tam, P.O., Lai, T. Y., Chan, C.K., Wang, N., Lam, D.S. and Pang, C.P. (2010) Association of NR2E3 but not NRL mutations with retinitis pigmentosa in the Chinese population. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**, 2229–2235.
20. Avila-Fernandez, A., Cantalapiedra, D., Aller, E., Vallespin, E., Aguirre-Lamban, J., Blanco-Kelly, F., Corton, M., Riveiro-Alvarez, R., Allikmets, R., Trujillo-Tiebas, M.J. et al. (2010) Mutation analysis of 272 Spanish families affected by autosomal recessive retinitis pigmentosa using a genotyping microarray. *Mol. Vis.*, **16**, 2550–2558.
21. Beroukhi, R., Lin, M., Park, Y., Hao, K., Zhao, X., Garraway, L. A., Fox, E.A., Hochberg, E.P., Mellinghoff, I.K., Hofer, M.D. et al. (2006) Inferring loss-of-heterozygosity from unpaired tumors using high-density oligonucleotide SNP arrays. *PLoS Comput. Biol.*, **2**, e41.
22. Lin, M., Wei, L.J., Sellers, W.R., Lieberfarb, M., Wong, W.H. and Li, C. (2004) dChipSNP: significance curve and clustering of SNP-array-based loss-of-heterozygosity data. *Bioinformatics*, **20**, 1233–1240.
23. Aleman, A., Garcia-Garcia, F., Salavert, F., Medina, I. and Dopazo, J. (2014) A web-based interactive framework to assist in the prioritization of disease candidate genes in whole-exome sequencing studies. *Nucleic Acids Res.*, **42**, W88–W93.
24. Marmor, M.F., Fulton, A.B., Holder, G.E., Miyake, Y., Brigell, M. and Bach, M. (2009) ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). *Doc. Ophthalmol.*, **118**, 69–77.
25. Martínez-Navarrete, G., Angulo, A., Martín-Nieto, J. and Cuenca, N. (2008) Gradual morphogenesis of retinal neurons in the peripheral retinal margin of adult monkeys and humans. *J. Comp. Neurol.*, **511**, 557–580.
26. Fernandez-Bueno, I., Fernández-Sánchez, L., Gayoso, M., García-Gutierrez, M., Pastor, J. and Cuenca, N. (2012) Time course modifications in organotypic culture of human neuroretina. *Exp. Eye Res.*, **104**, 26–38.

## Supplementary Material

Whole-exome sequencing reveals ZNF408 as a new gene associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa with vitreal alterations

Almudena Avila-Fernandez\*, Raquel Perez-Carro\*, Marta Corton, Maria Isabel Lopez-Molina, Laura Campello, Alejandro Garanto, Laura Fernandez-Sanchez, Lonneke Duijkers, Miguel Angel Lopez-Martinez, Rosa Riveiro-Alvarez, Luciana Rodrigues Jacy Da Silva, Rocío Sanchez-Alcudia, Esther Martin-Garrido, Noelia Reyes, Francisco Garcia-Garcia, Joaquin Dopazo, Blanca Garcia-Sandoval, Rob W.J. Collin, Nicolas Cuenca and Carmen Ayuso.

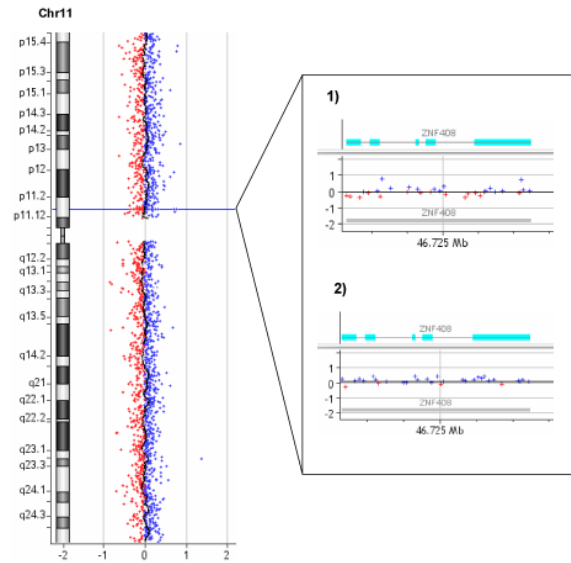


Figure S1. Comparative genomic hybridization array (aCGH) for ZNF408. No alterations were detected for both heterozygous patients, p.Gly492Arg (1) and p.Gln583Lys (2) showing a correct distribution of the probes along the gene. -2/-1: deletions, 0: normal pattern, +1/+2: duplications.

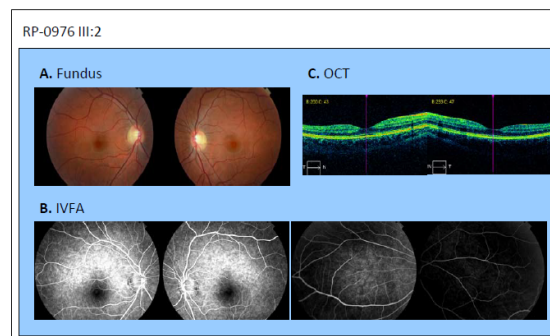


Figure S2. Clinical details of a healthy individual (III.2 RP-0976) carrying a heterozygous mutation in the ZNF408 gene. The funduscopy (A), IVFA (B) and OCT (C) do not show any alteration supporting FEVR.



## Resultados

---

### 3.3 Estudio molecular de pacientes afectos de retinosis pigmentaria autosómica recesiva o esporádica mediante un panel de genes

La retinosis pigmentaria (RP) es la forma más común de distrofia hereditaria de retina (DR) y se caracteriza por presentar una degeneración de los fotorreceptores, principalmente los bastones. La RP es altamente heterogénea tanto clínica como genéticamente lo que complica enormemente su diagnóstico y es por ello una excelente candidata para la aplicación de las tecnologías de secuenciación masiva.

En este trabajo se utilizó una aproximación de secuenciación masiva dirigida basada en un panel de diseño propio que incluía 75 genes asociados a RP, con el cual se analizó una cohorte de 47 familias españolas previamente clasificadas como casos recesivos o esporádicos de RP y cribadas para mutaciones conocidas mediante *microarray* de genotipado. Dentro de esta cohorte, 24 casos índice presentaban una variante previa (mutación ó polimorfismo) lo que nos permitió realizar la validación de la técnica.

Con esta aproximación se caracterizaron 27 de 47 casos totales consiguiendo una capacidad diagnóstica del 57% lo que supone una mejora en comparación con la tasa diagnóstica obtenida con técnicas moleculares convencionales. De un total de 33 variantes consideradas como patogénicas, 20 de ellas (61%) localizadas en los genes *ABCA4*, *CERKL*, *CNGA1*, *EYS*, *PDE6A*, *PRCD*, *RDH12*, *RP1*, *RP2* y *USH2A*, eran nuevas. Adicionalmente, se detectaron variaciones en el número de copia (CNVs) identificándose tres grandes deleciones afectando a los genes *EYS* (2) y *USH2A* (1) respectivamente.

Siete de las 27 familias caracterizadas se reclasificaron clínica o genéticamente. Cuatro de ellas, con mutaciones en *USH2A*, se clasificaron como Síndrome de Usher atípico con una sordera neurosensorial desarrollada durante la edad adulta. Otra de ellas, con mutaciones en *ABCA4*, fue reclasificada también clínicamente a distrofia de conos-bastones. Finalmente, otras dos familias de RP, con mutaciones en *RP1* y *RP2*, se reclasificaron genéticamente como formas dominante y ligada al cromosoma X, respectivamente.

Esta aproximación representa una buena herramienta para el diagnóstico de la RP permitiendo la identificación de nuevas variantes en genes conocidos y la detección de CNVs. Asimismo, este estudio permitió la reclasificación clínica y genética de las familias estudiadas lo que resulta de gran importancia a la hora de proporcionar un diagnóstico preciso y asesoramiento genético a las familias.





# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Panel-based NGS Reveals Novel Pathogenic Mutations in Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa

Received: 02 October 2015  
Accepted: 14 December 2015  
Published: 25 January 2016

Raquel Perez-Carro<sup>1,2</sup>, Marta Corton<sup>1,2</sup>, Iker Sánchez-Navarro<sup>1,2</sup>, Olga Zurita<sup>1,2</sup>, Noelia Sanchez-Bolivar<sup>1,2</sup>, Rocío Sánchez-Alcudia<sup>1,2</sup>, Stefan H. Lelieveld<sup>3</sup>, Elena Aller<sup>2,4</sup>, Miguel Angel Lopez-Martinez<sup>1,2</sup>, M<sup>a</sup> Isabel López-Molina<sup>5</sup>, Patricia Fernandez-San Jose<sup>1,2</sup>, Fiona Blanco-Kelly<sup>1,2</sup>, Rosa Riveiro-Alvarez<sup>1,2</sup>, Christian Gilissen<sup>3</sup>, Jose M Millan<sup>2,4</sup>, Almudena Avila-Fernandez<sup>1,2,\*</sup> & Carmen Ayuso<sup>1,2,\*</sup>

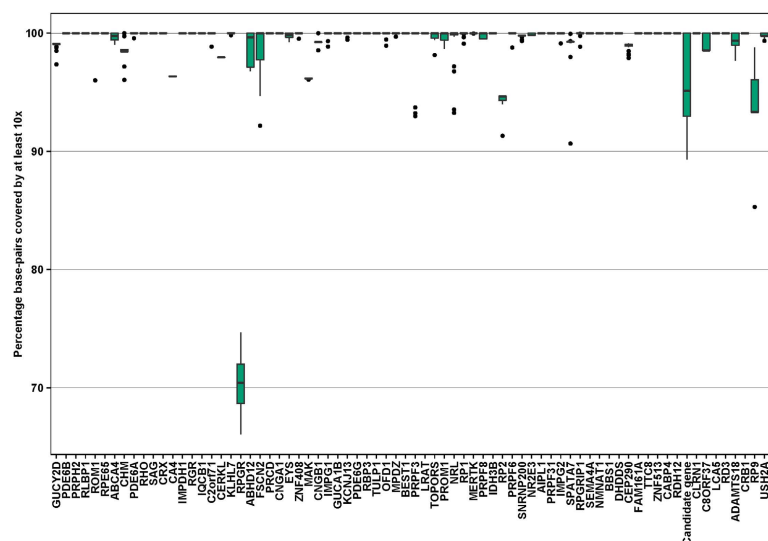
Retinitis pigmentosa (RP) is a group of inherited progressive retinal dystrophies (RD) characterized by photoreceptor degeneration. RP is highly heterogeneous both clinically and genetically, which complicates the identification of causative genes and mutations. Targeted next-generation sequencing (NGS) has been demonstrated to be an effective strategy for the detection of mutations in RP. In our study, an in-house gene panel comprising 75 known RP genes was used to analyze a cohort of 47 unrelated Spanish families pre-classified as autosomal recessive or isolated RP. Disease-causing mutations were found in 27 out of 47 cases achieving a mutation detection rate of 57.4%. In total, 33 pathogenic mutations were identified, 20 of which were novel mutations (60.6%). Furthermore, not only single nucleotide variations but also copy-number variations, including three large deletions in the *USH2A* and *EYS* genes, were identified. Finally seven out of 27 families, displaying mutations in the *ABCA4*, *RP1*, *RP2* and *USH2A* genes, could be genetically or clinically reclassified. These results demonstrate the potential of our panel-based NGS strategy in RP diagnosis.

Retinitis pigmentosa (RP, MIM 268000) is the most common form of inherited retinal degeneration with a prevalence of 1 in 4000 individuals<sup>1</sup>. RP is characterized by primary rod degeneration leading to night blindness, the development of tunnel vision and slow progressive decrease in central vision<sup>2</sup>. However, the disease onset, progression, retinal appearance, and final visual outcome may vary significantly among patients, even within the same family<sup>3</sup>. RP is also a highly heterogeneous genetic disorder; the disease can be inherited in different forms including autosomal dominant (adRP) in about 20–40% of the cases, autosomal recessive (arRP) in 30–50% or X-linked trait (xlRP) in 5–15% of the cases. Sporadic cases (sRP) account for about 40% of all diagnoses, although these percentages vary between different populations<sup>4,5</sup>. Non-Mendelian inheritance patterns such as digenic, mitochondrial or *de novo* mutations have been also reported, though these account for a minor proportion of cases<sup>6,7</sup>.

Hitherto, nearly 3100 pathogenic mutations have been reported<sup>8,9</sup> in more than 80 genes associated with non-syndromic RP and 55 of them have been related to autosomal recessive RP (arRP) (RetNet; update Aug 2015 <https://sph.uth.edu/retnet/>). Although the functions of some of these genes have been extensively studied, it is difficult to establish a precise genotype-phenotype correlation, due to the fact that several genes cause distinct or partially overlapping clinical phenotypes<sup>6</sup>.

Genetic diagnosis of the RD has been mainly based on either the use of the specific genotyping microarrays—for which the mutation detection rate ranges from 11% to 70% depending on the RD form<sup>10–12</sup>—or on a gene-by-gene analysis by Sanger sequencing for mutation screening which is time-consuming and expensive.

<sup>1</sup>Department of Genetics, Instituto de Investigacion Sanitaria-Fundacion Jimenez Diaz University Hospital (IIS-FJD, UAM), Madrid, Spain. <sup>2</sup>Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain. <sup>3</sup>Department of Human Genetics, Radboud university medical center, 6525 GA Nijmegen, The Netherlands. <sup>4</sup>Grupo de Investigación en Enfermedades Neurosensoriales. Instituto de Investigación Sanitaria IIS-La Fe, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain. <sup>5</sup>Department of Ophthalmology, IIS-Fundacion Jimenez Diaz University Hospital, Madrid, Spain. \*These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.A. (email: cayuso@fjd.es)



**Figure 1. Coverage Boxplot.** Overview of 75 genes and the percentage of coding bases covered by at least 10 reads. For each of the 75 genes the percentage of bases not covered by 10 or more reads is shown for the 47 samples. The green colored box indicate the first and third quartile and the black horizontal bar within the box illustrate the median (or second quartile). Measurements are considered outliers (black dots in plot) when they are: 1) less than the first quartile  $-1.5 \times \text{IQR}$  or 2) greater than the third quartile  $+1.5 \times \text{IQR}$ , were the IQR is the "Inter quartile range" (Third quartile  $-$  first quartile).

Despite the difficulties, the molecular diagnosis of patients affected with RD provides them a number of benefits as it can supply an accurate prognosis of the clinical course of the disease and appropriate genetic counseling to the families. In addition, the molecular characterization of patients allows future inclusion in clinical trials based on gene therapy.

In the last few years, the development of high-throughput technologies, such as next-generation sequencing (NGS), has allowed to screen a large number of genes. Simultaneously, this technique offers a high sensitivity and efficiency making the molecular diagnosis of this heterogeneous disease easier.

NGS is currently considered the most efficient method for mutation screening. Recent studies in different populations demonstrated the great potential of NGS technologies as a diagnostic tool in the field of RD characterizing around 30–60% of cases<sup>9,13</sup>.

Herein, we report an in-house targeted gene panel developed to be an efficient and feasible tool for molecular diagnosis. Using this approach we were able to study 47 unrelated Spanish families affected by arRP. In addition, this strategy allowed us to amplify the mutational spectrum identifying not only point mutations but also copy-number variations (CNV), thereby further increasing the diagnostic yield.

## Results

Next generation sequencing experiments were run on the Illumina MiSeq platform using 150 bp paired-end reads. On average 2,971,800 reads per patient were generated. On average the base-pairs of the genes present in the panel were covered by 722 times (range [92x–2911x]) and 99.1% of the base-pairs in coding regions of the 75 RD genes were covered by at least 10 reads. In addition, for 73.5% of the genes all of the base-pairs were covered by 10 reads or more. A complete overview of the coverage of each gene is shown in Fig. 1.

Because of high GC content and/or repetitive elements it was impossible to design efficient probes in seven specific regions (Supp. Table 1) of the genes: *CERKL*, *CA4*, *RP2*, *SNRNP200*, *CEP290* and *EYS*. All of these exons were additionally analyzed by Sanger sequencing though no mutations were found among the uncharacterized patients.

**Validation of the panel-based NGS.** In order to verify the reliability of our NGS approach, we used a validation cohort consisting of 24 out of the total 47 patients analyzed, who had different heterozygous variants (17 mutations and 7 polymorphisms) previously identified by a genotyping microarray (Asper Biotech). Our strategy allowed us to redetect all the variants found and previously checked by Sanger sequencing giving us a sensitivity of 100% for those validation variants (Table 1).

**Genetic findings in 47 RP patients.** For the 47 unrelated RP families analyzed, a total of 27 were molecularly characterized using our NGS strategy, reaching a diagnosis detection rate of 57.4% (Table 1).

Family	Gene	Allele 1				Allele 2				
		Nucleotide change	Protein Change	Methods	Reference	Nucleotide change	Protein Change	Methods	Reference	Segregation
RP-1147	<i>CNGA1</i>	c.94C > T	p.Arg32*	aC	Paloma (2002)	c.830G > A	p.Arg277Gln	H	This study	Yes
RP-2066	<i>PDE6A</i>	c.1705C > A	p.Gln569Lys	aC	Dryja (1999)	c.1620 + 1G > T	splicing defect	H	This study	NA
RP-2114	<i>RDH12</i>	c.278T > C	p.Leu93Pro	aC	Avila-Fernandez (2010)	c.210–211insC	p.Arg71Glnfs*12	H	This study	NA
RP-1319	<i>USH2A</i>	c.2276G > T	p.Cys759Phe	aC	Rivolta (2000)	c.920–923dupGCCA	p.His308Glnfs*16	H	Weston (2000)	NA
RP-1412	<i>USH2A</i>	c.2276G > T	p.Cys759Phe	aC	Rivolta (2000)	c.1214delA	p.Asn405Ilefs*3	H	Schwartz (2005)	Yes
RP-1646	<i>USH2A</i>	c.2276G > T	p.Cys759Phe	aC	Rivolta (2000)	c.12575G > A	p.Arg4192His	H	Avila-Fernandez (2010)	Yes
RP-1695	<i>USH2A</i>	c.2276G > T	p.Cys759Phe	aC	Rivolta (2000)	c.9799T > C	p.Cys3267Arg	H	Aller (2006)	NA
RP-1735	<i>USH2A</i>	c.2276G > T	p.Cys759Phe	aC	Rivolta (2000)	c.12153–12175delAAT TTTAAGCCCTTGGACTCTGA	p.Glu4051Aspfs*40	H	This study	NA
RP-1802	<i>USH2A</i>	c.2276G > T	p.Cys759Phe	aC	Rivolta (2000)	c.920–923dupGCCA	p.His308Glnfs*16	H	Weston (2000)	Yes
RP-1976	<i>USH2A</i>	c.2276G > T	p.Cys759Phe	aC	Rivolta (2000)	c.8254G > A	p.Gly2752Arg	H	Nakanishi (2009)	NA
RP-1979	<i>USH2A</i>	c.2276G > T	p.Cys759Phe	aC	Rivolta (2000)	c.1606T > C	p.Cys536Arg	H	Dreyer (2000)	Yes
RP-2112	<i>USH2A</i>	c.2276G > T	p.Cys759Phe	aC	Rivolta (2000)	Deletion Ex.45-49	–	H	Baux (2014)	NA
RP-2113	<i>USH2A</i>	c.2276G > T	p.Cys759Phe	aC	Rivolta (2000)	c.5462A > G	p.Lys1821Arg	H	This study	Yes
RP-1543	<i>ABCA4</i>	c.4234C > T	p.Gln1412*	H	Maugeri (1999)	c.5917delG	p.Val1973*	H	Rivera (2000)	NA
RP-1056	<i>CERKL</i>	c.847C > T	p.Arg283*	H	Tuson (2004)	c.664C > T	p.Gln222*	H	This study	Yes
RP-1998	<i>CNGBI</i>	c.2957A > T	p.Asn986Ile	H	Simpson (2011)	c.2957A > T	p.Asn986Ile	H	Simpson (2011)	Yes
RP-1706	<i>EYS</i>	c.2826–2827delAT	p.Val944Glyfs*9	H	This study	Deletion Ex.19	–	H	This study	Yes
RP-1929	<i>EYS</i>	c.9142dupA	p.Arg3048Lysfs*9	H	This study	Deletion Ex.13-14	–	H	Pieras (2011)	NA
RP-1142	<i>GUCY2D</i>	c.1762C > T	p.Arg588Trp	H	Stone (2007)	c.1762C > T	p.Arg588Trp	H	Stone (2007)	Yes
RP-0372	<i>PDE6A</i>	c.1957C > T	p.Arg653*	H	This study	c.1957C > T	p.Arg653*	H	This study	Yes
RP-0040	<i>PRCD</i>	c.74 + 1G > A	splicing defect	H	This study	c.74 + 1G > A	splicing defect	H	This study	Yes
RP-1772	<i>RP1</i>	c.2431delA	p.Ser812Valfs*36	H	This study					Yes
RP-1988	<i>RP1</i>	c.400–401insGC	p.His136Argfs*8	H	This study	c.400–401insGC	p.His136Argfs*8	H	This study	Yes
RP-1201	<i>RP2</i>	c.708C > G	p.Cys236Trp	H	This study					Yes
RP-0338	<i>USH2A</i>	c.9433C > T	p.Leu3145Phe	H	This study	c.9433C > T	p.Leu3145Phe	H	This study	Yes
RP-0344	<i>USH2A</i>	c.8693A > C	p.Tyr2898Ser	H	de Castro-Miró (2014)	c.10008C > A	p.Cys3336*	H	This study	Yes
RP-0456	<i>USH2A</i>	c.2276G > T	p.Cys759Phe	H	Rivolta (2000)	c.10709G > T	p.Cys3570Phe	H	This study	NA

**Table 1. Causative mutations identified in 27 characterized autosomal recessive retinitis pigmentosa families.** Abbreviations: arRP Chip (aC); Haloplex (H). NA: No additional family members available.

After applying the filtering criteria better described in *Methods section*—which included the *in silico* prediction analysis (Table 2) and based upon the segregation analysis and the absence of those missense and splice-site novel variants in the healthy Spanish population—a total of 33 different variants were considered as causative mutations. All the variants considered as causative in the complete cohort were confirmed by Sanger sequencing therefore no false positives were found giving us a specificity of 100%.

Twenty of these causative mutations (60.6%), located in the *ABCA4*, *CERKL*, *CNGA1*, *EYS*, *PDE6A*, *PRCD*, *RDH12*, *RP1*, *RP2* and *USH2A* genes, were novel (Table 1).

Among the identified variants, 45.4% (15/33) were loss-of-function (LOF) mutations including six nonsense and nine frameshift mutations and 6% (2/33) were splice-site mutations. Approximately one-third (39.4%; 13/33) of the detected mutations were missense variants. Furthermore, three large deletions of one or more exons were found in the *USH2A* and *EYS* genes in the families RP-1706, RP-1929 and RP-2112.

In 13 out of the 27 characterized families (48.1%) one allele was previously identified by the genotyping microarray and we were able to find the second allele applying our NGS approach. For the remaining 14 characterized families (51.9%) with no previous known variation, causative mutations were found with our NGS strategy thereby establishing a molecular diagnosis. Three families with a previous mutation were not diagnosed with a second causative mutated allele whereas the fourth family with a previous mutation in *USH2A* (p.Cys759Phe) was finally diagnosed with a mutation in the *RP1* gene (RP-1772).

Based on our genetic screening, a total of seven out of the 27 cases could be reclassified. Five of them were clinically reclassified after the genetic screening. Four turned out to be atypical Usher syndrome: adult-onset mild neurosensory hearing loss (RP-1735, RP-1979, RP-0338 and RP-0344 with mutations in *USH2A*) and one cone-rod dystrophy (CRD) (RP-1543 with mutations in *ABCA4*). The other two remained with the diagnosis of RP but turned out to be an X-linked (xlRP) and autosomal dominant retinitis pigmentosa (adRP) with mutations in *RP2* (RP-1201) and *RP1* (RP-1772) respectively (Table 1). The clinical information of all index cases of characterized families is shown in Supp. Table 2.

Missense Variants											
Family	Gene	cDNA	Protein	SIFT	Polyphen	Align GVG D	Mut.Taster	phyloP	SPV	EVS	ExAC
RP-1147	<i>CNGA1</i>	c.1037G>A	p.Arg346Gln	D(0)	Pos. D(0.852)	Class C35	D	5.39	-	0.0001	0.00001
RP-1201	<i>RP2</i>	c.708C>G	p.Cys236Trp	D(0)	Pr. D(0.997)	Class C65	D	-0.149	-	-	-
RP-0456	<i>USH2A</i>	c.10709G>T	p.Cys3570Phe	D(0)	Pr. D(0.996)	Class C65	D	5.21	-	-	-
RP-0338	<i>USH2A</i>	c.9433C>T	p.Leu3145Phe	D(0.02)	Pos. D(0.598)	Class C15	P	0.70	-	0.0001	-
RP-2113	<i>USH2A</i>	c.5462A>G	p.Lys1821Arg	T(0.1)	B(0.096)	Class C25	P	2.00	-	-	-
Splice Variants											
Family	Gene	cDNA	Protein	HSF	BDGP	AST	NetGene 2	ESEFinder	SPV	EVS	ExAC
RP-2066	<i>PDE6A</i>	c.1620+1G>T	splicing defect	95.1/-	0.99/-	86.85/69.73	0.82/-	loss SF2/ASF	-	-	0.00001
RP-0040	<i>PRCD</i>	c.74+1G>A	splicing defect	79.8/-	0.45/-	67.08/49.96	0.7/-	loss SF2/ASF	-	-	0.00002

**Table 2. Pathogenicity assesment of novel rare missense and splicing variants.** Abbreviations: SIFT (D: deleterious; T: tolerated); Polyphen (Pos.D: possibly damaging; Pr.D: probably damaging; B: benign); Align GVG D (Class C15 less likely pathogenic and Class C65 most likely pathogenic); Mutation taster (D: disease causing; P: polymorphism). PhyloP (From negative values to 1: fast-evolving sites and positive values above 1: conserved sites). Splicing prediction software: wild-type/mutant score. Human Splice finder (HSF), Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP), Analyzer Splice Tool (AST). - means the depletion of the 5' splice site. SPV: Spanish Population Variation Database. EVS: Exome Variant Server. ExAC: Exome Aggregation Consortium.

**CNV Analysis from High-coverage NGS Data.** The high number of readouts obtained by the Illumina MiSeq Sequencing for NGS allowed us to perform a quantitative analysis.

Only targeted regions covered by at least 100X, in order to avoid false positive calls, were selected for the CNV analysis. After the CNV study carried out in our cohort, five large copy-number changes in a heterozygous state, of which two deletions in the *EYS* gene, one deletion in *USH2A* and two different duplications in the *CEP290* gene, were detected (Supp. Table 3). The two deletions identified in the *EYS* gene comprised exons 13-14 (previously reported) and exon 19 (firstly reported in this study), whereas a deletion from the exon 45 to 49 previously reported by Baux *et al.*<sup>14</sup> was detected in *USH2A* (Table 1). All copy number variants were subsequently validated by MLPA (Fig. 2). To check the *CEP290* duplications in the RP-0830 family, a customized-aCGH previously designed in our group for another purpose<sup>15</sup> including several genes was used but the duplications could not be confirmed (data not shown).

**Uncertain variants and unsolved cases.** Novel missense variants predicted as pathogenic were found. However their high frequency in Spanish population (SPV database) leads us to classify them as benign (Supp Table 4).

For the family RP-1874 only one pathogenic allele, a non-canonical splice site mutation in *CNGB1* (c.2634+6G>A) was identified (Table 3). The index case of the RP-1747 family carried two potentially pathogenic heterozygous mutations in two different genes, *EYS* (p.Tyr2822Cys) and *USH2A* (p.Gly1871Asp) however no second allele was found (Table 3). Finally, in 17 out of 47 families (36.1%) no candidate variants were found.

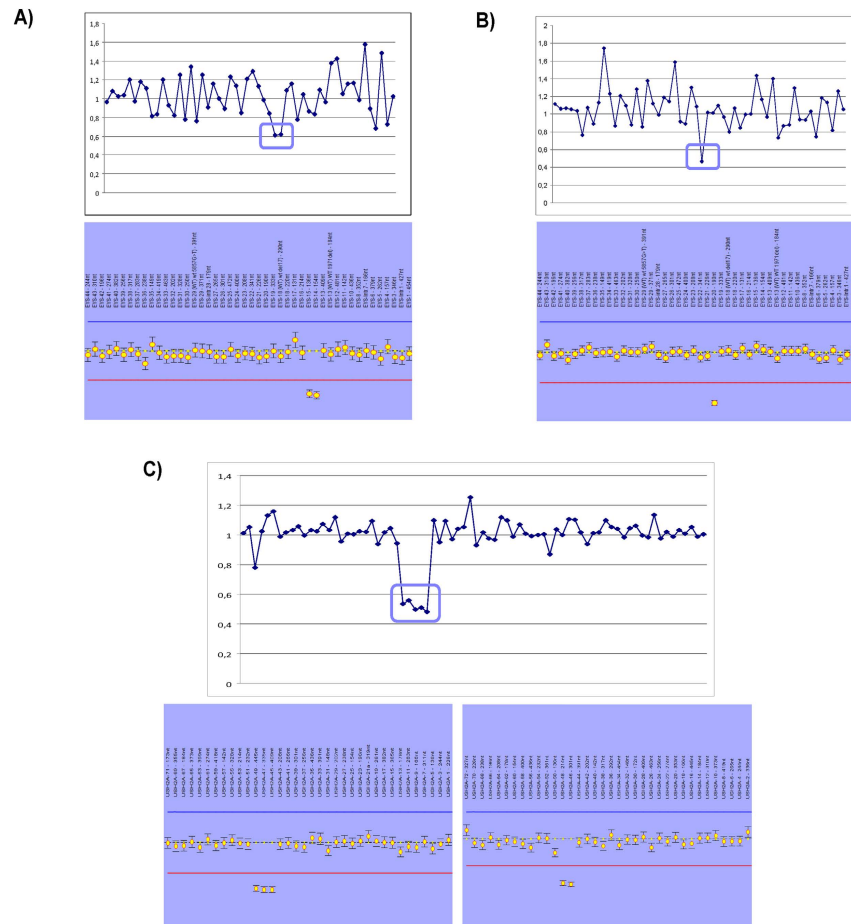
## Discussion

Recently, the NGS has been proved to be very helpful for carrying out genetic studies in heterogeneous diseases such as Retinitis Pigmentosa<sup>13,16</sup>. In our study, a targeted sequence capture to detect novel pathogenic variants in 75 known RP genes in 47 arRP Spanish families was performed.

Twenty-seven out of 47 families were solved (detection rate of 57.4%) identifying 33 different mutations. From them, 60.6% (20/33) were novel mutations affecting the *ABCA4*, *CERKL*, *CNGA1*, *EYS*, *PDE6A*, *PRCD*, *RDH12*, *RPI*, *RP2* and *USH2A* genes. All known variants used as positive controls were redetected by this technology demonstrating the high specificity and sensitivity of our approach.

Unfortunately, for those cases with only one pathogenic allele or with two heterozygous mutations in different genes, cosegregation analysis could not be performed or provided results were inconclusive. Further transcriptional profile studies may clarify the effect of the non-canonical splice-site mutation found in the *CNGB1* gene. Some authors have claimed to have found evidence of digenic inheritance when they detect two clear mutations in two different genes<sup>17</sup>. However, as has been previously reported, this event is rarely demonstrated, since the genetic load of mutations in genes responsible for RP is very high as has been previously reported<sup>18</sup>. In the family RP-1747 that carried two likely pathogenic variants in *USH2A* and *EYS* we cannot exclude the presence of a second pathogenic allele in deep intronic or other genomic regions that are not systematically analyzed, and a third mutation is found by chance in the second gene. Alternatively it could be that the gene responsible for the disease had not yet been identified, and the possible modifier effect of the mutations found in the *EYS* and *USH2A* genes remain to be demonstrated.

According to the molecular results, seven out of 27 families were both clinically and genetically reclassified. In order to provide an accurate genetic counseling, disease prognosis and follow up to the families, their reclassification is crucial. In addition, it allows to develop new personalized therapies for these families. Since mutations in *USH2A* cause both non-syndromic RP and Usher syndrome<sup>19,20</sup>, the presence of the mutations in this gene in the



**Figure 2.** CNVs analysis and MLPA profile for the three large rearrangements. Ratios below 0.7 were considered deletions; those above 1.2 were considered to be duplications. (A) Deletion of exons 13 and 14 identified in the *EYS* gene in the RP-1929 family. (B) Deletion of exon 19 identified in the *EYS* gene in the RP-1706 family. (C) Gross deletion from the exon 45 to 49 in *USH2A* (RP-2112).

families requires the hearing follow up for these patients. The RP-1543 family with mutations in *ABCA4* was previously classified as arRP however, the presence of these two mutations arguing in favour of a cone-rod dystrophy allowed after a careful clinical evaluation its reclassification<sup>21</sup>. It is well known that at advance stages of the disease it is difficult to establish a precise clinical diagnosis. The family RP-1201 presented a mutation in the *RP2* X-linked gene changing dramatically the genetic counseling for the family. In addition previous studies have demonstrated that around 15% of males with isolated RP carry mutations in X-linked retinal degeneration genes<sup>22</sup>.

Lastly the RP-1772 family, which carried a heterozygous *RPI* mutation, was re-classified as an autosomal dominant RP. Although mutations in the *RPI* gene have been described in both, autosomal dominant and recessive RP forms<sup>23</sup>, type and location of the mutation and phenotype can help in the genetic classification. The novel frameshift mutation was located in the protein domain where mutations were usually found causing autosomal dominant RP. Also, the phenotype of the patients argues in favour of this finding due to the recessive mutations in the *RPI* gene cause an early onset RP<sup>24</sup>. Although there was not antecedents of retinal degeneration in the family, we could confirm the frameshift mutation also in a non-affected sibling supporting the existence of the incomplete penetrance previously reported in this gene<sup>25</sup>. Thus, the identification of the genetic defect becomes increasingly relevant, especially when gene-specific therapeutic approaches are becoming more promising according to the results of the ongoing clinical trials<sup>26</sup>.

It is important to be aware of the NGS limitations. The detection of some types of mutations could be missed as trinucleotide repeats, small insertions/deletions or CNV variations<sup>27</sup>. In our design, for *RPGR* only 70% of the

Splicing													
Family	Gene	Nucleotide change	Protein Change	HSF	BDGP	NetGene 2	ESEFinder	1000G	EVS	ExAC	SPV	Reference	
RP-1874	<i>CNGBI</i>	c.2634 + 6G > A	splicing defect	New cryptic acceptor site	New cryptic acceptor site	New cryptic acceptor site	loss SRp40	-	-	0.000008	-	This study	
Missense													
Family	Gene	Nucleotide change	Protein Change	SIFT	Polyphen	Align GVGD	Mut.Taster	phyloP	1000G	EVS	ExAC	SPV	Reference
RP-1747	<i>EYS</i>	c.8465A > G	p.Tyr282Cys	Not scored	Pr.D(0.997)	Class C0	P	1.23	-	-	-	-	This study
RP-1747	<i>USH2A</i>	c.5612G > A	p.Gly1871Asp	D(0)	Pr.D(0.995)	Class C65	D	2.81	0.0016	-	0.0003	-	This study

**Table 3. Unsolved families carrying one pathogenic allele.** Abbreviations: SIFT (D: deleterious; T: tolerated); Polyphen (Pos.D: possibly damaging; Pr.D: probably damaging; B: benign); Mutation taster (D: disease causing; P: polymorphism). Splicing prediction software: wild-type/mutant scores. Human Splice finder (HSF), Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP), Analyzer Splice Tool (AST). EVS: Exome Variant Server. ExAC: Exome Aggregation Consortium. SPV: Spanish Population Variation Database.

whole gene was covered by at least 10X. Due to the highly repetitive sequences and purine-rich regions in open reading frame 15 (ORF15)—that is the last exon of the *RPGR* gene in which nearly 60% of disease-causing *RPGR* mutations are located—is difficult to capture using conventional NGS technologies. However, the rest of the gene was greatly covered. To date other alternatives have been successfully performed to sequence ORF15 in those cases in which attempts at characterization by NGS had failed<sup>28</sup>.

The high coverage obtained with our panel-based NGS approach allows us to perform a CNV analysis in our cohort providing the genetic diagnosis for three families (3/47). Although the CNVs results could not be reliable when the coverage fell below 100X, this analysis should be routinely applied in targeted sequencing.

Regardless of the inheritance pattern, in well-characterized cases, the panel-based targeted sequencing is superior to other methods in both time and cost, which makes it an optimal approach. Compared with other technologies used in the past such as genotyping microarrays<sup>12</sup>, NGS has been reported to identify the genetic cause in 19% to 50% of arRP cases (and 50% to 82% of RP cases in general)<sup>10,29</sup>, which is significantly higher than the reported 11–12% for microarray screening in Spanish population.

Our results extend not only the mutational spectrum for arRP but also the population specific variants frequently found in our Spanish database and facilitates further interpretation of NGS panel on RD patients. Our cohort was selected after a previous screening with a genotyping microarray and 11 out of the 17 families with a previous mutated allele had a mutation in the *USH2A* gene enriching the percentage of *USH2A* mutations. Therefore, our results are not representative of the frequency and distribution of the genes in the Spanish population.

The obtained detection rate of 57.4% supports the application of this targeted NGS strategy as an effective tool for the diagnosis of RP patients<sup>30</sup> because our approach can handle the heterogeneity of the disease. Further improvements in NGS technologies and the discovery of novel genes involved in the disease will likely improve the molecular diagnosis of RP.

## Methods

**Patients recruitment.** Patients diagnosed with RP were recruited from the Biobank of the Fundación Jiménez Díaz Hospital (Madrid, Spain). Diagnostic criteria for RP included night blindness and/or peripheral visual loss and poor visual acuity in advanced stages of the disease. Ophthalmic examinations including electroretinogram (ERG), fundus, visual field test and best-corrected visual acuity (BCVA) measurements were performed on each index case.

Peripheral blood samples of index cases and their family members were collected in EDTA tubes. DNA was extracted from peripheral blood leukocytes with an automated DNA extractor (model BioRobotEZ1; Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions.

A total of 47 unrelated Spanish families with arRP or sporadic RP (sRP), previously screened for known mutations with a specific arRP genotyping microarray (AsperBiotech, Tartu, Estonia) were selected. The cohort included 24 patients with a previously identified variation (mutation or polymorphism) used as validation controls and 23 without any previous genetic alteration. Informed consents were obtained from all patients and family members involved in the study. All procedures were reviewed and approved by the Ethics Committee of the hospital and adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki and further reviews (Fortaleza, 2013).

Two hundred and sixty-seven in-house whole exomes from Spanish individuals (Spanish Population Variations Database available in the public domain at <http://bioinfo.cipf.es/apps-beta/spv/1.0.1/> and created by Bioinformatic Platform for Rare Diseases CIBERER-BIER, <http://www.ciberer.es/bier/>) without RP family history of RP were used as controls to evaluate the frequency of the variations found in this study.

**Capture panel design.** A customized Haloplex panel was designed to capture 75 RD genes (74 previously known and one candidate gene) of which 41 were linked to arRP (RetNet; update Sept 2015 <https://sph.uth.edu/retnet/>).

The design was performed as previously described<sup>30</sup>. The capture sequences included all coding exons and 20 bp of their flanking 5' and 3' intronic regions. Additionally, four known deep-intronic mutations, involving the



genes *CEP290*, *OFD1*, *PRPF31* and *USH2A* were covered. In total 1127 regions were targeted comprising 352 Kb of target sequence. The final design covered 99.1% of the requested target regions.

**Targeted NGS approach.** The HaloPlex enrichment system is based on restriction enzyme digestion of genomic DNA followed by hybridization of customized probes to capture regions of interest, which are subsequently amplified by PCR.

The sequence capture was performed following the manufacturer's protocol (version D3, December 2012) for Illumina Sequencing protocol (Agilent Technologies Inc., 131 Santa Clara, CA, USA) with minor revisions as previously described<sup>30</sup>. Capture libraries were sequenced using the MiSeq v2 reagents kit (Illumina, San Diego, California, USA) on 8 runs in an Illumina MiSeq as 150 bp paired-end reads, following the manufacturer's protocol.

The primary analysis, including base calling and quality scoring, was performed by the Illumina RTA software application.

**Data analysis.** Results were analyzed with two different custom pipelines: DNAnexus analysis ([www.dnanexus.com](http://www.dnanexus.com)) and BaseSpace BWA Enrichment v2.1 analysis (Illumina, San Diego, California, USA). For both, sequence reads from Illumina MiSeq instrument were mapped to the hg19/GRCh37 human reference genome. The alignment and variant calling were performed using Burrows-Wheeler Aligner (BWA)-MEM<sup>31</sup> and Genome Analysis Toolkit (GATK) respectively, with default parameters depending on the pipeline used. The CalculateHsMetrics tool in Picard was used to produce the reads and coverage statistics ([www.picard.sourceforge.net](http://www.picard.sourceforge.net)).

Single base pair coverage for the 75 genes was calculated based on the BAM files with the use of the *coverage* function of BEDtools (v2.19.1)<sup>32</sup>. The coverage on base-pair resolution was computed for the protein coding regions (hg19 assembly) of the NCBI RefSeq database (Release 70)<sup>33</sup>. The RefSeq transcripts were downloaded from the UCSC genome browser and converted to bed format by a custom Java program. For a total of 185,751 bases the coverage was determined.

The output VCF files were annotated in order to identify and classify the disease-relevant variants using the GATK Variant Annotator and ENSEMBL Variant Effect Predictor v72 for the samples analyzed with DNAnexus and the VariantStudio Variant Analysis Software (Illumina, San Diego, California, USA) for the samples analyzed with the BaseSpace BWA Enrichment v2.1.

All identified variants were annotated according to the guidelines published by the Human Genome Variation Society ([www.hgvs.org/mutnomen](http://www.hgvs.org/mutnomen)) and were checked in the dbSNP v132 and Human Gene Mutation Data (HGMD® Professional) databases.

**Variant prioritization and pathogenicity assessment.** Identified variants were filtered by applying the following prioritization criteria<sup>4,30</sup>:

- (1) Variants in the coding sequence excluding intergenic, 5' and 3' untranslated regions or deep intronic variants were selected.
- (2) Variants were filtered by minor allele frequency (MAF)  $\leq 0.005$  or without MAF value in the 1000 Genomes Project, Exome Variant Server (EVS) and Exome Aggregation Consortium (ExAC).
- (3) Variants were checked in dbSNP132
  - Variants with *rs* number and present in Human Gene Mutation Data (HGMD® Professional) and Leiden Open Variation Database (LOVD), were considered as known pathogenic mutations after all the references were checked.
  - Variants without *rs* number were considered as novel rare variants.
- (4) Nonsense, frameshift and canonical splice-site variants were considered to be pathogenic.
- (5) Missense or non-canonical splice-site novel rare variants were checked against the Spanish Population Variation Database (BIER), including 267 exomes from healthy individuals. If a given variant was not present, the *in silico* prediction was performed.
- (6) To assess the pathogenesis of the missense variants, four different predictive software programs were used including: i) Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT; [sift.jcvi.org](http://sift.jcvi.org)), ii) Polymorphism Phenotyping v2 (Polyphen-2; [genetics.bwh.harvard.edu/pph2](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2)), iii) Align GVD (agvgd.iarc.fr/agvgd\_input.php) and iv) Mutation Taster ([www.mutationtaster.org](http://www.mutationtaster.org)). Variants detected in potential splice-sites were analyzed by: i) Human Splice Finder (HSF; [www.umd.be/HSF](http://www.umd.be/HSF)), ii) Analyzer Splice Tool (AST; [ibis.tau.ac.il/ssat/SpliceSite-Frame.htm](http://ibis.tau.ac.il/ssat/SpliceSite-Frame.htm)), iii) Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP; [www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice)), iv) NetGene 2 ([www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2)) and v) ESE Finder 3.0 (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>). Those variants predicted as damaging by at least two different prediction softwares were initially considered potentially pathogenic.

For those samples with a previous pathogenic variant a manual search for a second variant allele in the corresponding gene was performed directly. When a second pathogenic allele was not found we applied the previous filtering criteria in order to find other RP genes. Variants were further prioritized according to the inheritance pattern.

**Data validation and segregation analysis.** A total of 24 patients carrying a previous known variant (17 mutations and 7 polymorphism) were tested as validation controls to verify the reliability of our custom NGS strategy.

Sanger sequencing was performed to confirm all the deleterious mutations and potentially pathogenic variants and to segregate them in the families. Bidirectional automatic sequencing was performed using 20-mer oligonucleotide primer pairs designed by ExonPrimer software (UCSC). Primer sequences and annealing temperatures are available from the authors on request. The PCR products were enzymatically purified with ExoSAP-it (USB, Affymetrix) and sequenced using BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life technologies). The PCR products were resolved on an automated sequencer (ABI 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems). The results were analyzed by Staden Package software version 2.0.0b10 (available at: staden.sourceforge.net; accessed September, 2014) by assembling and visualizing the aligned sequences compared with reference sequence (UCSC Genome Browser).

**Copy-number variation analysis.** Due to the very high expected coverage for all target regions sequenced with the Illumina MiSeq system (>90% base-pairs covered by 100×), a copy-number variation (CNV) analysis was performed. The coverage of each target region was normalized and compared against normalized data of the rest of the samples of the same run to obtain the ratio relative coverage<sup>34</sup>. Only those cases with a heterozygous pathogenic single-nucleotide mutation in a specific gene were analyzed. If the ratio fell below 0.7 it was considered a deletion and if it rose above 1.2 it was considered a duplication. In addition only those regions with ≥ 100× were selected. Following these criteria the detected CNVs were validated by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for the affected genes. For the *EYS* gene, the SALSA MLPA probemix P328 was used. To confirm the *USH2A* CNV the SALSA MLPA probemixes P361 and P362 were utilized (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). The MLPA reaction was performed following the manufacturer's instructions. The MLPA results were analyzed with the Coffalyser.Net software (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands).

The validation of the putative CNVs found in *CEP290*, in which commercial MLPA was not available, was performed by a customized comparative genomic hybridization array (aCGH).

**Comparative genomic hybridization array (aCGH).** The customized aCGH 8 × 60 k Agilent SurePrint G3 CGH was designed using the Agilent eArray website (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>) with an average distribution of 1 probe per 150 pb.

The processing was performed according to manufacturer's recommendations as previously described<sup>15</sup>.

Results were analyzed by Agilent CytoGenomics software v.2.7 using default analysis method – CGH v2 with the ADM-2 aberration algorithm.

## References

- den Hollander, A. I., Black, A., Bennett, J. & Cremers, F. P. Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. *The Journal of clinical investigation* **120**(9), 3042 (2010).
- Ayuso, C. & Millan, J. M. Retinitis pigmentosa and allied conditions today: a paradigm of translational research. *Genome medicine* **2**(5), 34 (2010).
- Hartong, D. T., Berson, E. L. & Dryja, T. P. Retinitis pigmentosa. *Lancet* **368**(9549), 1795 (2006).
- Neveling, K. *et al.* Next-generation genetic testing for retinitis pigmentosa. *Human mutation* **33**(6), 963 (2012).
- Ayuso, C. *et al.* Retinitis pigmentosa in Spain. The Spanish Multicentric and Multidisciplinary Group for Research into Retinitis Pigmentosa. *Clinical genetics* **48**(3), 120 (1995).
- Berger, W., Kloeckener-Gruissem, B. & Neidhardt, J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Progress in retinal and eye research* **29**(5), 335 (2010).
- Ferrari, S. *et al.* Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Current genomics* **12**(4), 238 (2011).
- Huang, X. F. *et al.* Genotype-phenotype correlation and mutation spectrum in a large cohort of patients with inherited retinal dystrophy revealed by next-generation sequencing. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics* **17**(4), 271 (2015).
- Daiger, S. P., Sullivan, L. S. & Bowne, S. J. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clinical genetics* **84**(2), 132 (2013).
- van Huet, R. A. *et al.* The efficacy of microarray screening for autosomal recessive retinitis pigmentosa in routine clinical practice. *Molecular vision* **21**, 461 (2015).
- Koenekoop, R. K. *et al.* Genetic testing for retinal dystrophies and dysfunctions: benefits, dilemmas and solutions. *Clinical & experimental ophthalmology* **35**(5), 473 (2007).
- Avila-Fernandez, A. *et al.* Mutation analysis of 272 Spanish families affected by autosomal recessive retinitis pigmentosa using a genotyping microarray. *Molecular vision* **16**, 2550 (2010).
- Chen, X. *et al.* Targeted sequencing of 179 genes associated with hereditary retinal dystrophies and 10 candidate genes identifies novel and known mutations in patients with various retinal diseases. *Investigative ophthalmology & visual science* **54**(3), 2186 (2013).
- Baux, D. *et al.* Enrichment of LOVD-USHbases with 152 *USH2A* genotypes defines an extensive mutational spectrum and highlights missense hotspots. *Human mutation* **35**(10), 1179 (2014).
- Avila-Fernandez, A. *et al.* Whole-exome sequencing reveals ZNF408 as a new gene associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa with vitreal alterations. *Hum Mol Genet* **24**(14), 4037 (2015).
- Zhao, L. *et al.* Next-generation sequencing-based molecular diagnosis of 82 retinitis pigmentosa probands from Northern Ireland. *Hum Genet* **134**(2), 217 (2015).
- Sullivan, L. S. *et al.* Prevalence of disease-causing mutations in families with autosomal dominant retinitis pigmentosa: a screen of known genes in 200 families. *Investigative ophthalmology & visual science* **47**(7), 3052 (2006).
- Sanchez-Alcudia, R. *et al.* Contribution of mutation load to the intrafamilial genetic heterogeneity in a large cohort of Spanish retinal dystrophies families. *Investigative ophthalmology & visual science* **55**(11), 7562 (2014).
- Lenassi, E. *et al.* A detailed clinical and molecular survey of subjects with nonsyndromic *USH2A* retinopathy reveals an allelic hierarchy of disease-causing variants. *Eur J Hum Genet* **23**(10), 1318 (2015).
- McGee, T. L. *et al.* Novel mutations in the long isoform of the *USH2A* gene in patients with Usher syndrome type II or non-syndromic retinitis pigmentosa. *J Med Genet* **47**(7), 499 (2010).
- Cremers, F. P., Maugeri, A., den Hollander, A. I. & Hoyng, C. B. The expanding roles of *ABCA4* and *CRB1* in inherited blindness. *Novartis Found Symp* **255**, 68 (2004).



22. Branham, K. *et al.* Mutations in RPGR and RP2 account for 15% of males with simplex retinal degenerative disease. *Investigative ophthalmology & visual science* **53**(13), 8232 (2012).
23. Siemiatkowska, A. M. *et al.* Identification of a novel nonsense mutation in RP1 that causes autosomal recessive retinitis pigmentosa in an Indonesian family. *Molecular vision* **18**, 2411 (2012).
24. Avila-Fernandez, A. *et al.* Identification of an RP1 prevalent founder mutation and related phenotype in Spanish patients with early-onset autosomal recessive retinitis. *Ophthalmology* **119**(12), 2616 (2012).
25. Gamundi, M. J. *et al.* Three novel and the common Arg677Ter RP1 protein truncating mutations causing autosomal dominant retinitis pigmentosa in a Spanish population. *BMC Med Genet* **7**, 35 (2006).
26. Jacobson, S. G. *et al.* Improvement in vision: a new goal for treatment of hereditary retinal degenerations. *Expert Opin Orphan Drugs* **3**(5), 563 (2015).
27. Bamshad, M. J. *et al.* Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature reviews. Genetics* **12**(11), 745 (2011).
28. Huang, X. F. *et al.* Identification of false-negative mutations missed by next-generation sequencing in retinitis pigmentosa patients: a complementary approach to clinical genetic diagnostic testing. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics* **17**(4), 307 (2015).
29. Glockle, N. *et al.* Panel-based next generation sequencing as a reliable and efficient technique to detect mutations in unselected patients with retinal dystrophies. *Eur J Hum Genet* **22**(1), 99 (2014).
30. Fernandez-San Jose, P. *et al.* Targeted Next-Generation Sequencing Improves the Diagnosis of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa in Spanish Patients. *Investigative ophthalmology & visual science* **56**(4), 2173 (2015).
31. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**(14), 1754 (2009).
32. Quinlan, A. R. & Hall, I. M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**(6), 841 (2010).
33. Pruitt, K. D. *et al.* RefSeq: an update on mammalian reference sequences. *Nucleic Acids Res* **42** (Database issue), D756 (2014).
34. Aparisi, M. J. *et al.* Targeted next generation sequencing for molecular diagnosis of Usher syndrome. *Orphanet journal of rare diseases* **9**, 168 (2014).

### Acknowledgements

We would like to thank the FJD-Biobanco (RD09/0076/00101), and the Departments of Genetics and Ophthalmology of the IIS-Fundacion Jimenez Diaz, (Madrid). We also wish to recognize CIBER-ER (06/07/0036), FIS (PI013/00226 and PI013/00638), Miguel Servet CP/03256 (ISCIII), ONCE and Fundaluce for their support. RPC is supported by Fundación Conchita Rábago (FCR). RSA and ISN are supported by Sara Borrell grants CD12/00676 and CD13/00085 respectively (ISCIII).

### Author Contributions

R.P.C. and A.A.F. analyzed the data obtained with this N.G.S. approach, R.P.C. interpreted the results, performed the data validation and segregation analysis. R.P.C. and A.A.F. wrote the manuscript which was approved by all co-authors. M.C. designed and checked the R.D. panel. I.S.N. checked the samples and prepared the libraries together with M.A.L.M. and R.R.A. M.I.L.M. performed the ophthalmic examinations. F.B.K. attended R.P. families and provided genetic counselling. O.Ž. and N.S.B. performed segregation studies. R.S.A., M.C. and P.E.S.J. participated in the data interpretation. S.L. and C.G. performed the coverage data analysis. E.A. and J.M.M. participated in the C.N.V. analysis. C.A. and A.A.F. planned the experiments, interpreted the results and reviewed the manuscript and C.A. obtained funding for the project.

### Additional Information

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** Perez-Carro, R. *et al.* Panel-based NGS Reveals Novel Pathogenic Mutations in Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa. *Sci. Rep.* **6**, 19531; doi: 10.1038/srep19531 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

### Panel-based NGS Reveals Novel Pathogenic Mutations in Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa

Raquel Perez-Carro<sup>1,2</sup>, Marta Corton<sup>1,2</sup>, Iker Sánchez-Navarro<sup>1,2</sup>, Olga Zurita<sup>1,2</sup>, Noelia Sanchez-Bolivar<sup>1,2</sup>, Rocío Sánchez-Alcudia<sup>1,2</sup>, Stefan H. Lelieveld<sup>3</sup>, Elena Aller<sup>2,4</sup>, Miguel Angel Lopez-Martinez<sup>1,2</sup>, M<sup>a</sup> Isabel López-Molina<sup>5</sup>, Patricia Fernandez-San Jose<sup>1,2</sup>, Fiona Blanco-Kelly<sup>1,2</sup>, Rosa Riveiro-Alvarez<sup>1,2</sup>, Christian Gilissen<sup>3</sup>, Jose M Millan<sup>2,4</sup>, Almudena Avila-Fernandez<sup>1,2,6</sup>, Carmen Ayuso\*<sup>1,2,6</sup>.

**Supplementary Table 1.** Regions not covered in our RD panel.

Chr	Start position	End position	Gene	Exon
2	96967395	96967407	<i>SNRNP200</i>	4
2	182468774	182468826	<i>CERKL</i>	2
6	64497950	64498012	<i>EYS</i>	39
12	88471664	88471677	<i>CEP290</i>	40
12	88510789	88510829	<i>CEP290</i>	18
17	58232683	58232718	<i>CA4</i>	2
X	46713082	46713137	<i>RP2</i>	2

**Panel-based NGS Reveals Novel Pathogenic Mutations in Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa**

Raquel Perez-Carro<sup>1,2</sup>, Marta Corton<sup>1,2</sup>, Iker Sánchez-Navarro<sup>1,2</sup>, Olga Zurita<sup>1,2</sup>, Noelia Sanchez-Bolivar<sup>1,2</sup>, Rocío Sánchez-Alcudia<sup>1,2</sup>, Stefan H. Lelieveld<sup>3</sup>, Elena Aller<sup>2,4</sup>, Miguel Angel Lopez-Martinez<sup>1,2</sup>, M<sup>a</sup> Isabel López-Molina<sup>5</sup>, Patricia Fernandez-San Jose<sup>1,2</sup>, Fiona Blanco-Kelly<sup>1,2</sup>, Rosa Riveiro-Alvarez<sup>1,2</sup>, Christian Gilissen<sup>3</sup>, Jose M Millan<sup>2,4</sup>, Almudena Avila-Fernandez<sup>1,2,6</sup>, Carmen Ayuso<sup>1,2,6</sup>\*

**Supplementary Table 2.** Clinical findings identified in the index cases of the characterized families.

Family	Symptoms and course	Fundus	ERG	Other features
RP-1147	NB (16y), VF constriction (30y) and VA diminished (30y)	Bone spicule pigmentation	ND	
RP-2066	NB (6y), loss of VF (6y) and VA diminished (10y)	Bone spicule pigmentation in mid periphery	ND	
RP-2114	NB (3y), loss of VF (3y) and VA diminished (4y)	Attenuated vessels and bone spicule pigmentation.	NR	Photofobia
RP-1319	NB (20y), VF constriction (22y) and loss of VA (28y)	Bone spicule pigmentation and macular edema.	ND	
RP-1412	NB (18y), VF constriction (30y) and loss of VA (38y)	ND	ND	
RP-1646	NB (48y), VF constriction (48y) and loss of VA (53y)	Bone spicule pigmentation	ND	
RP-1695	NB (7y), loss of VF (13y) and VA diminished (13y)	ND	NR	Photofobia
RP-1735	NB (30y), loss of VF (30y) and VA diminished (43y)	Pale optic disc. Bone spicule pigmentation and attenuated vessels.	Reduced a-wave and b-wave amplitudes	Bilateral sensorineural hearing loss
RP-1802	NB (48y), VF constriction (48y) and loss of VA (53y)	Bone spicule pigmentation	ND	Posterior subcapsular cataract (45y)
RP-1976	NB (40y), VF constriction (50y) and loss of VA (56y)	Pale optic disc. Bone spicule pigmentation and attenuated vessels.	NR	Posterior subcapsular cataract (66y) Photofobia
RP-1979	NB (30y), VF constriction (30y) and loss of VA (33y)	Pale optic disc. Bone spicule pigmentation and attenuated vessels.	NR	Posterior subcapsular cataract (49y). Bilateral sensorineural hearing loss
RP-2112	NB (30y), loss of VF (36y) and VA diminished (39y)	Bone spicule pigmentation	NR	
RP-2113	NB (35y), loss of VF (50y) and VA diminished (55y)	Pale optic disc. Bone spicule pigmentation	ND	Posterior subcapsular cataract (62y). Photofobia
RP-1543	NB (20y), VF constriction (23y) and loss of VA (8y)	Pale optic disc. Bone spicule pigmentation	NR	Nystagmus
RP-1056	NB (21y), loss of VF (28y) and VA diminished (30y)	ND	ND	Posterior subcapsular cataract (38y)
RP-1998	NB (12y), loss of VF (12y) and VA diminished (27y)	Attenuated vessels and initial pigment deposits	Reduced a-wave and b-wave amplitudes	
RP-1706	NB (10y), VF constriction (6y) and loss of VA (15y)	Pale optic disc. Bone spicule pigmentation and attenuated vessels.	NR	Posterior subcapsular cataract (42y)
RP-1929	NB (10y), VF constriction (10y) and loss of VA (10y)	Pale optic disc. Bone spicule pigmentation	ND	Posterior subcapsular cataract (70y)
RP-1142	NB (<10y), loss of VF (<10y) and VA diminished (<10y)	Pale optic disc. Bone spicule pigmentation and attenuated vessels.	NR	Posterior subcapsular cataract (70y). Dyschromatopsia
RP-0372	NB (5y), loss of VF (5y) and VA diminished (5y)	Bone spicule pigmentation and attenuated vessels.	Reduced a-wave and b-wave amplitudes	
RP-0040	NB (25y), VF constriction (25y) and loss of VA (28y)	Pale optic disc. Bone spicule pigmentation and attenuated vessels.	NR	Posterior subcapsular cataract (34y)
RP-1772	NB (20y), VF constriction (35y) and loss of VA (45y)	Bone spicule pigmentation and attenuated vessels.	Reduced a-wave and b-wave amplitudes	Photofobia
RP-1988	NB (6y), VF constriction (6y) and loss of VA (6y)	Bone spicule pigmentation and attenuated vessels.	ND	Photofobia. Dyschromatopsia
RP-1201	NB (16y), loss of VF (20y) and VA diminished (26y)	ND	ND	
RP-0338	NB (35y), loss of VF (35y) and VA diminished (35y)	Bone spicule pigmentation in mid periphery and attenuated vessels	NR	Bilateral sensorineural hearing loss
RP-0344	NB (21y), VF constriction (28y)	Pale optic disc. Bone spicule pigmentation and attenuated vessels.	NR	Photofobia. Bilateral sensorineural hearing loss
RP-0456	NB (38y), VF constriction (40y) and loss of VA (42y)	ND	ND	Posterior subcapsular cataract (40y)

Abbreviations: NB(night blindness); VF(VF); VA(visual acuity);ERG(electroretinogram); NR( non-recordable);ND(no data).

**Panel-based NGS Reveals Novel Pathogenic Mutations in Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa**

Raquel Perez-Carro<sup>1,2</sup>, Marta Corton<sup>1,2</sup>, Iker Sánchez-Navarro<sup>1,2</sup>, Olga Zurita<sup>1,2</sup>, Noelia Sanchez-Bolivar<sup>1,2</sup>, Rocío Sánchez-Alcudia<sup>1,2</sup>, Stefan H. Lelieveld<sup>3</sup>, Elena Aller<sup>2,4</sup>, Miguel Angel Lopez-Martinez<sup>1,2</sup>, M<sup>a</sup> Isabel López-Molina<sup>5</sup>, Patricia Fernandez-San Jose<sup>1,2</sup>, Fiona Blanco-Kelly<sup>1,2</sup>, Rosa Riveiro-Alvarez<sup>1,2</sup>, Christian Gilissen<sup>3</sup>, Jose M Millan<sup>2,4</sup>, Almudena Avila-Fernandez<sup>1,2,6</sup>, Carmen Ayuso\*<sup>1,2,6</sup>.

**Supplementary Table 3.** Targeted regions identified with a copy number variations. If the ratio fell below 0.7 it was considered a deletion and if rose above 1.2 was considered as duplication.

Family	chr	Start position	End position	Gene	Exon	Ratio	Validation
RP-1706	6	65596359	65596964	EYS	19	0.46	MLPA (+)
RP-1929	6	65707432	65707849	EYS	14	0.61	MLPA (+)
	6	65767362	65767710	EYS	13	0.62	MLPA (+)
RP-2112	1	215986857	215987433	USH2A	49	0.51	MLPA (+)
	1	215990172	215990713	USH2A	48	0.53	MLPA (+)
	1	216011212	216011614	USH2A	47	0.47	MLPA (+)
	1	216017384	216018005	USH2A	46	0.48	MLPA (+)
	1	216019005	216019497	USH2A	45	0.46	MLPA (+)
RP-0830	12	88471664	88471865	CEP290	40	1.24	aCGH (-)
	12	88522578	88523012	CEP290	11	1.25	aCGH (-)

### Panel-based NGS Reveals Novel Pathogenic Mutations in Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa

Raquel Perez-Carro<sup>1,2</sup>, Marta Corton<sup>1,2</sup>, Iker Sánchez-Navarro<sup>1,2</sup>, Olga Zurita<sup>1,2</sup>, Noelia Sanchez-Bolivar<sup>1,2</sup>, Rocío Sánchez-Alcudia<sup>1,2</sup>, Stefan H. Lelieveld<sup>3</sup>, Elena Aller<sup>2,4</sup>, Miguel Angel Lopez-Martinez<sup>1,2</sup>, M<sup>a</sup> Isabel López-Molina<sup>5</sup>, Patricia Fernandez-San Jose<sup>1,2</sup>, Fiona Blanco-Kelly<sup>1,2</sup>, Rosa Riveiro-Alvarez<sup>1,2</sup>, Christian Gilissen<sup>3</sup>, Jose M Millan<sup>2,4</sup>, Almudena Avila-Fernandez<sup>1,2,6</sup>, Carmen Ayuso\*<sup>1,2,6</sup>.

**Supplementary Table 4.** Novel missense variants predicted as pathogenic found in our cohort that were previously identified in Spanish population.

Gene	Nucleotide change	Protein change	SIFT	Polyphen	Align GVDG	Mut.Taster	SPV
<i>EYS</i>	c.5510G>C	p.Trp1837Ser	Not scored	Pos.D (0.67)	Class C0	P	0.006
<i>MPDZ</i>	c.2344G>A	p.Gly782Arg	D(0)	Pr.D(1)	Class C65	D	0.015



## Discusión

---

El objetivo principal de este trabajo ha sido profundizar en el conocimiento de las bases moleculares y genéticas de la retinosis pigmentaria mediante la utilización de diferentes aproximaciones de secuenciación masiva, con el fin de identificar nuevos genes y nuevas asociaciones relacionadas con la patología así como establecer un nuevo algoritmo diagnóstico.

Para ello, se han seleccionado familias españolas afectadas de RP, de herencia recesiva y esporádica, no caracterizadas genéticamente procedentes de los servicios de Oftalmología y Genética del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz. Todas ellas se han estudiado previamente, a lo largo de los últimos años, siguiendo el algoritmo diagnóstico clásico que incluye cribado mediante secuenciación automática Sanger de regiones o genes determinados (Corton et al., 2013b), técnicas de mapeo de homocigosidad para aquellas familias que presentan consanguinidad o endogamia (Bernal et al., 2001) y/o *microarray* de genotipado en el que están incluidas mutaciones conocidas en genes asociados a RP (Ávila-Fernández et al., 2010; Avila-Fernandez et al., 2008)

El desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación masiva, en ocasiones en combinación con otras técnicas clásicas, ha sido clave en el estudio molecular de enfermedades tan heterogéneas como la RP. En ese sentido, se han seleccionado un total de 20 familias afectadas de arRP que permanecían sin caracterizar tras el cribado previo mediante técnicas clásicas para realizar estudios de secuenciación de exoma completo (WES), con el fin de identificar nuevos genes implicados en la patología.

### 4.1 Datos globales obtenidos mediante WES

Los datos globales obtenidos en los últimos años en el Departamento de Genética mediante los estudios de secuenciación de exoma completo (WES), se detallan a continuación. Se han caracterizado 15 de las 20 familias totales estudiadas, representando una tasa diagnóstica del 75%. En 12 de las 20 familias analizadas (60%), el gen identificado como causante de la patología, había sido ya previamente asociado a distrofias de retina: *ABCA4*(1), *AIPL1*(1), *CEP290*(1), *CDHR1*(1), *CHM*(1), *CNGB3*(1), *PDE6A*(1), *RP1*(2), *TULP1*(1) y *USH2A*(2) (Corton et al., 2013a; Nikopoulos et al., 2015) (**Anexo I**) y datos del grupo no publicados. Es importante destacar que estos genes habían sido ya cribados para mutaciones previamente descritas mediante otras técnicas clásicas como *microarrays* de genotipado lo que pone de manifiesto las limitaciones de éstas, al menos, en el contexto genético de la retinosis pigmentaria.

No obstante, y a pesar de que varios expertos en el campo sostienen la hipótesis de que la mayor parte de genes implicados en RP están ya descritos (den Hollander et al., 2010; Neveling et al., 2012), en tres de las familias afectadas (15%), se han identificado nuevos genes candidatos como causantes de RP no sindrómica. Esta tasa de éxito en la identificación de nuevos genes, podría ser debida a que nuestras familias habían sido previamente estudiadas tanto clínica como genéticamente, a diferencia de otras cohortes *naive* (de Castro-Miró et al., 2016; Riera et al., 2017). Asimismo, en los últimos años y

gracias a estas técnicas de alto rendimiento, han sido muchos los autores que han reportado nuevos genes asociados a esta patología, como por ejemplo *SAMD11* (Corton et al., 2016) derivado también de este proyecto (**Anexo II**), *POMGNT1* (Xu et al., 2016), *HGSNAT* (Haer-Wigman et al., 2015), o *AGBL5* (Kastner et al., 2015), entre otros.

La gran variabilidad fenotípica de estos pacientes, su solapamiento clínico con otras formas de distrofias de retina y en ocasiones, la limitada información clínica disponible, dificulta enormemente su diagnóstico. Esta limitación explica el alto porcentaje de reclasificaciones tanto clínicas como genéticas una vez identificadas las mutaciones responsables en las familias (Almoguera et al., 2015; Corton et al., 2013a). Por ello, el uso de aproximaciones que nos permitan abarcar todos los genes asociados a distrofias de retina, como es el estudio mediante WES, ayudaría a incrementar la tasa diagnóstica de aquellos pacientes o familias de los que no se disponga prácticamente de información clínica.

Este trabajo ha estado centrado en el estudio mediante WES de dos de estas familias españolas, realizado dentro de un marco de colaboración con varios grupos nacionales e internacionales del Consorcio Europeo de Enfermedades Retinianas (*European Retinal Disease Consortium*), y que nos han permitido establecer una nueva asociación del gen *ABHD12* a RP no sindrómica e identificar un nuevo gen, *ZNF408*, como responsable de RP.

#### 4.1.1 Nueva asociación del gen *ABHD12* a RP no sindrómica

Antes de este trabajo sólo se habían descrito 10 mutaciones nulas (*nonsense*, *frameshift*, o grandes deleciones) en el gen *ABHD12* en asociación a un único fenotipo, el síndrome de PHARC (polineuropatía, pérdida de audición, ataxia, retinosis pigmentaria y cataratas) (Fiskerstrand et al., 2010; Eisenberger et al., 2012; Chen et al., 2013a). En este trabajo se identificaron 5 mutaciones nuevas en este gen: un cambio *frameshift* (p.Arg107Glufs\*8), una mutación *nonsense* (p.Trp159\*) y tres cambios *missense* (p.Thr202Ile, p.Arg186Pro y p.His372Gln) como causantes de la patología en las tres familias estudiadas. Además en este estudio se describen por primera vez, mutaciones *missense* como causantes de este síndrome. Cabría esperar que el efecto de estas mutaciones *missense* resultara en una actividad reducida y no en una actividad completamente abolida de la proteína como presumiblemente ocurre en el caso de las mutaciones nulas, pudiendo dar lugar a un amplio espectro fenotípico. Sin embargo, la mutación p.His372Gln identificada en la familia RP-1487, se ha considerado probablemente patogénica puesto que el aminoácido 372 es uno de los sitios activos de la proteína ABHD12 y estudios previos han demostrado que alteraciones en este aminoácido causan la pérdida completa de la actividad (Navia-Paldanius et al., 2012) dando lugar a alteraciones consistentes con el síndrome de PHARC.

Adicionalmente, en este estudio se han caracterizado dos familias, ambas con un alelo nulo y un alelo con una mutación de cambio de aminoácido, presentando una amplia variabilidad fenotípica. Por un lado, una de las familias de origen holandés (W08-1833) presentaba un moderado síndrome de PHARC con RP, pérdida de audición, signos moderados de neuropatía periférica y ataxia sin presentar atrofia cerebelosa. Sin embargo, la otra familia de origen español (RP-1292) presentaba una RP no sindrómica, exclusivamente con alteraciones oftalmológicas típicas y habiéndose descartado afectación extra-ocular alguna, siendo los pacientes afectados de avanzada edad. La variabilidad fenotípica observada en asociación al genotipo identificado podría deberse a que la mutación p.Thr202Ile identificada en la familia RP-



1292, que presenta únicamente RP, sea menos patogénica. Este residuo afectado parece alterar menos la estructura tridimensional de la proteína que la mutación p.Arg186Pro y además está menos conservado a lo largo de la evolución. También sugiere una condición hipomorfa de dicha mutación (DeLuca et al., 2016; Xu et al., 2016) lo que permitiría una actividad residual de la proteína ABHD12 que, compensada con otras proteínas de la ruta, hace que no se vean afectados otros tejidos extraoculares pero sí la retina debido a su mayor demanda metabólica. No obstante, estudios de expresión de RNA y de cuantificación de actividad de ABHD12 (Chen et al., 2013a; Savinainen et al., 2016) en nuestros pacientes nos habrían permitido analizar más en profundidad el papel etiológico de las mutaciones encontradas.

Recientemente, se ha evaluado el efecto de tres mutaciones en el gen *ABHD12*, una *nonsense* (p.Arg352\*) y dos *missense* entre las que se incluye la mutación p.Thr202Ile identificada en la familia RP-1292 en nuestro estudio (Tingaud-Sequeira et al., 2017). En este estudio en células transfectadas se ha demostrado que a nivel de expresión no hay diferencias significativas en ninguno de los casos, y a nivel de proteína no se observaron diferencias entre la proteína *wild-type* (ABHD12-WT) y las proteínas mutadas (ABHD12-T253R y ABHD12-T202I) mientras que, como cabría esperar, en el caso de la proteína ABHD12-R352\* se observaba una banda de tamaño correspondiente a la proteína truncada. No obstante, el ensayo de actividad monoacilglicerol lipasa (MAGL) de ABHD12 ha revelado un significativo descenso de la actividad de las proteínas mutantes respecto de la proteína *wild-type*, y aunque la diferencia no es significativa, se observa una mayor actividad en el caso de la proteína ABHD12-T202I lo que apoyaría nuestra hipótesis inicial de que la mutación p.Thr202Ile sería menos patogénica y por ello estaría dando lugar a un fenotipo más leve (Tingaud-Sequeira et al., 2017).

Muchos autores han reportado la variabilidad fenotípica existente en pacientes con mutaciones en *ABHD12* ya sea dentro de la misma familia o en pacientes procedentes de diferentes familias con la misma mutación (Yoshimura et al., 2015), lo que también sugiere la presencia de alelos modificadores o la expresión variable intrafamiliar como ha sido ya reportado en otras distrofias de retina (Coppieters et al., 2010; Khanna et al., 2009).

Adicionalmente, este trabajo ha ampliado el espectro fenotípico del gen *ABHD12*, lo que ha permitido su inclusión en futuros estudios de pacientes con RP no sindrómica o variaciones del síndrome de PHARC (*PHARC-like*). Hasta la fecha se han caracterizado cinco casos con mutaciones en *ABHD12* diagnosticados inicialmente de Síndrome de Usher por padecer retinosis pigmentaria y sordera en la infancia o en las primeras décadas de vida y en los que finalmente, tras una revisión clínica exhaustiva se han identificado problemas neurológicos resultando de gran importancia clínica para estos pacientes. Tras estos descubrimientos y puesto que la aparición de ataxia, polineuropatía u otros problemas neurológicos asociados suele ser más tardía, estas entidades *PHARC-like* deberían tenerse en cuenta como diagnóstico diferencial en los casos de Síndrome de Usher tipo 3 (Eisenberger et al., 2012; Yoshimura et al., 2015).

La proteína ABHD12 (*Abhydrolase domain-containing protein 12*) se encarga de hidrolizar el 2-araquidonoilglicerol (2-AG), componente principal en el sistema de señalización endocannabinoide, en cerebro de ratón. Sin embargo existen otras serina-hidrolasas como la monoacilglicerol lipasa (MAGL) o la proteína ABHD6 (*Abhydrolase domain-containing protein 6*) que también tienen actividad 2-AG hidrolasa. En cerebro de ratón, ABHD12 es la responsable de una pequeña proporción de la actividad de hidrólisis del 2-AG, en torno al 15% junto con la actividad de ABHD6, mientras que el 85% restante se debe a la actividad de la proteína MAGL (Blankman et al., 2007; Navia-Paldanius et al., 2012). No

obstante el estudio del modelo murino de PHARC (ABHD12<sup>-/-</sup>) en el cual existe ausencia completa de esta proteína sostiene que ABHD12 tiene otro sustrato endógeno que es la lisofosfatidilserina (LPS) (Blankman et al., 2013). Por lo tanto, la patogénesis tanto del síndrome de PHARC como de la RP podría estar asociada a la alteración del metabolismo de fosfolípidos, en la que participan otras muchas enzimas cuyos genes como es el caso de *PNPLA6*, *DDHD1* o *PCYT1A*, están mutados en distintas patologías neurodegenerativas (Lamari et al., 2015; Wortmann et al., 2015). En cuanto al fenotipo reportado, el modelo *knockout* de ratón presenta discapacidad motora o ataxia, alteraciones del comportamiento o pérdida de audición sin embargo no presenta alteraciones oculares reportándose una estructura y función del ojo normal y no detallándose estudios específicos que permitan descartar alteraciones en la retina (Blankman et al., 2013). Recientemente se ha desarrollado un modelo de PHARC en pez zebra en el que se observaron rasgos típicos del síndrome de PHARC, como son ataxia o discapacidad motora, defectos de mielinización, una disminución de células ciliadas en el oído interno y por último, una alteración en la arquitectura de la retina, observándose una disminución de fotorreceptores y de proyecciones axónicas procedentes de células ganglionares (Tingaud-Sequeira et al., 2017).

Existen algunos estudios de expresión de ABHD12 (Bases de datos ProteomicsDB, MaxQB y MOPED) en los que se observa expresión diferencial en epitelio nasal, piel, hueso, tejido placentario o cerebro. Algunos autores han demostrado una alta expresión de *ABHD12* en microglía (Fiskerstrand et al., 2010), mientras que precisamente la expresión de las otras enzimas serina-hidrolasas es muy baja o casi inexistente sugiriendo que ABHD12 pueda tener un papel crucial en este tipo celular. En el modelo de ratón ABHD12<sup>-/-</sup> se describe un proceso de neuroinflamación en el cerebro mediado por un aumento de los niveles de lípidos de cadena larga (LPS) y la consiguiente activación de la microglía, lo que podría estar causando las alteraciones neurológicas (Blankman et al., 2013). La microgliosis, proceso de activación de la microglía, ha sido previamente asociada a enfermedades neurodegenerativas incluyendo las distrofias de retina (Ebert et al., 2009). En la retina, las células de microglía en reposo, localizadas en la capa plexiforme interna y externa (Karlstetter et al., 2010), cumple funciones vitales entre las que se incluyen la homeostasis neuronal, la depuración de desechos tisulares o la secreción de factores neurotróficos. Su activación produce una transformación fenotípica de las células microgliales (Karlstetter et al., 2010), una proliferación local, migración y secreción de citoquinas que a su vez estimulan la fagocitosis de los fotorreceptores mediada por macrófagos (Joly et al., 2009; Zhao et al., 2015b) y un cambio en el perfil transcripcional en el que se ha observado que este proceso de activación precede a cualquier signo de apoptosis o degeneración (Gehrig et al., 2007).

Tanto el sistema de señalización endocannabinoide como la ruta metabólica de lisofosfatidilserina están implicados en numerosos procesos inmunológicos y neurológicos entre los que se incluyen la neurotransmisión (plasticidad sináptica), analgesia, apetito, aprendizaje, estado de ánimo o neuroinflamación entre otros (Kamat et al., 2015; Murataeva et al., 2014), despertando un gran interés en la comunidad científica por su potencial para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos (Chicca et al., 2015; Parkkari et al., 2014). Adicionalmente, la degeneración retiniana precedida por una activación de la microglía convierte a estas células en interesantes dianas para posibles nuevas terapias en distrofias de retina (Peng et al., 2014; Roche et al., 2016; Schuetz and Thanos, 2004).

### 4.1.2 Identificación de un nuevo gen, *ZNF408* como causa de arRP

La combinación de los resultados obtenidos por mapeo de homocigosidad y estudio de secuenciación de exoma completo (WES), nos llevaron a la identificación de un nuevo gen asociado a RP, el gen *ZNF408*. Tras los hallazgos del WES y el posterior cribado en nuestra cohorte de familias afectadas de arRP y sRP, se caracterizaron dos familias (RP-0322 y RP-0976), ambas con dos mutaciones nuevas en homocigosidad (p.Ala122Leufs\*2 y p.Arg541Cys). Además, se identificaron dos variantes nuevas en heterocigosidad (p.Gly492Arg y p.Gln583Lys) en uno de los alelos en otras dos familias en las cuales, se descartó la presencia de grandes deleciones/duplicaciones en el segundo alelo tras un estudio de array CGH. No fue posible la realización de estudios oftalmológicos a los pacientes afectados, por lo que no se ha podido establecer la causalidad de estas variantes.

Simultáneamente al presente trabajo, otros autores identificaron por primera vez mutaciones en el gen *ZNF408* como responsables de la vitreorretinopatía exudativa familiar (FEVR), de herencia autosómica dominante, que padecían las familias estudiadas (Collin et al., 2013). Esta patología se caracteriza por presentar una aberrante vascularización de la retina periférica así como una incorrecta diferenciación de los vasos sanguíneos retinianos dando lugar a exudados, tracciones y desprendimientos de vítreo, entre otros. Por ello, nuestros pacientes incluyendo dos portadores heterocigotos asintomáticos, se revisaron cuidadosamente descartándose cualquier signo de FEVR y presentando únicamente rasgos de RP típica con condensaciones vítreas. En estos dos últimos años, otros autores han reportado nuevas mutaciones patogénicas en *ZNF408* (Figura 4.8) como causantes de FEVR autosómica dominante en distintas poblaciones (Musada et al., 2016; Salvo et al., 2015). Además han descrito otros tres cambios *missense* (p.Ser126Asn, p.Pro144Ser y p.Met232Val) siendo clasificados como variantes de significado incierto (VUS) (Collin et al., 2013; Musada et al., 2016).

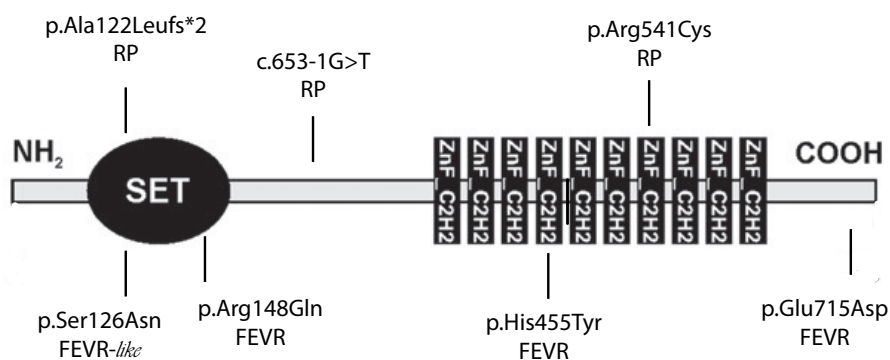


Figure 4.8: Mutaciones reportadas, hasta la fecha, en el gen *ZNF408*. En la parte superior aquellas causantes de retinosis pigmentaria y abajo aquellas causantes de vitreorretinopatía exudativa familiar. Modificada de Collin et al, 2013.

Recientemente se ha identificado mediante WES una nueva mutación c.653-1G>T en homocigosidad en el gen *ZNF408* en tres pacientes de RP pertenecientes a una familia tunecina (Figura 4.8) que provoca una alteración en el proceso de *splicing* dando lugar a una proteína aberrante. Este nuevo hallazgo apoya la implicación del gen *ZNF408* en esta patología (Habibi et al., 2015).

A pesar de que resulta complicado establecer una correlación genotipo-fenotipo, cabe destacar que tanto la mutación *frameshift* p.Ala122Leufs\*2 como la mutación de *splicing* c.653-1G>T en los que cabría esperar una pérdida completa de la proteína ZNF408 se han asociado exclusivamente a un fenotipo de RP no sindrómica. Asimismo, la presencia de individuos asintomáticos portadores de estas mutaciones aparentemente deletéreas, sugiere que la haploinsuficiencia no da lugar a fenotipo. Sin embargo, en los distintos casos con mutaciones de cambio de aminoácido en las que no es posible predecir el efecto sobre la proteína, no es posible establecer una correlación genotipo-fenotipo unívoca existiendo una elevada variabilidad fenotípica.

*Collin* y colaboradores realizaron estudios funcionales de co-transfección para analizar el efecto que causaba la mutación p.His455Tyr identificada en una familia con FEVR demostrándose un efecto dominante negativo (Collin et al., 2013). Se realizaron los mismo ensayos para estudiar el posible efecto que tendría en estado de heterocigosidad la única mutación missense descrita (p.Arg541Cys) en homocigosis, y se demostró que no se producía de manera significativa el efecto dominante negativo previamente reportado. Estos resultados se corresponden con lo observado en la familia RP-0976, donde los hijos portadores de la mutación p.Arg541Cys, son completamente asintomáticos no presentando alteraciones retinianas ni vasculares en la angiografía a diferencia de los pacientes asintomáticos heterocigotos de FEVR sugiriendo que las distintas mutaciones podrían estar afectando a diferentes sitios de unión a proteínas.

El gen *ZNF408* codifica para un factor de transcripción que contiene un dominio SET en el extremo N-terminal de la proteína, presente en muchas proteínas cromosómicas y el cual se cree que está involucrado en modulación de la expresión génica mediada por cromatina (Jenuwein et al., 1998), y 10 dominios *zinc finger* (C2H2) en su extremo C-terminal (Collin et al., 2013). Estos dominios son cruciales no sólo para la unión con el DNA, sino también con el RNA y otras proteínas (Brayer and Segal, 2008; Iuchi, 2001; Thiesen and Bach, 1993). Por ello, cuanto mayor sea el número de dominios *zinc finger* de una proteína, mayor será la variabilidad de sus posibles dianas (Chiang and Ayyanathan, 2013; Pearson et al., 2011; Razin et al., 2012). El amplio número de estos dominios sugiere que ZNF408 podría estar involucrado en numerosas funciones en los distintos tejidos. Estudios previos han revelado expresión ubicua de este gen tanto en tejido fetal (riñón, bazo, colon u ojo) como en tejido adulto (pulmón, riñón, médula espinal, entre otros, mostrándose una elevada expresión en retina). Los estudios de inmunohistoquímica en retina humana realizados en este trabajo han revelado su expresión en fotorreceptores, células ganglionares y amacrinas, y su localización a nivel nuclear más concretamente en zonas de eucromatina, correspondiéndose con su papel en regulación de la expresión génica como factor de transcripción (Davie et al., 2015). Además, se ha podido confirmar la expresión de ZNF408 en tejido endotelial de los vasos sanguíneos de la retina apoyando la posible implicación de éste en desarrollo vascular (Collin et al., 2013).

Por el momento no se han reportado estudios con modelos murinos, pero en este trabajo se ha podido demostrar también expresión de ZNF408 en fotorreceptores, concretamente conos, de ratón (línea celular 661-W). Por otro lado, en el modelo *knockdown* de pez zebra desarrollado por *Collin* y colaboradores, se han observado defectos en el desarrollo de la vasculatura del ojo, sin embargo no se aportan evidencias de anomalías retinianas. Adicionalmente, en estos experimentos se han reportado otras afectaciones extraoculares sugiriendo que distintas mutaciones en *ZNF408* podrían causar diferentes fenotipos en humanos

Éste no es el primer caso de asociación de un factor de transcripción tipo *zinc finger* a este grupo de patologías oculares, un ejemplo de ello es el gen *ZNF513* (8 dominios C2H2 *zinc finger*) reportado como causante de RP no síndrónica en una familia de Pakistán (Li et al., 2010). Estudios de expresión han demostrado la localización también ubicua de este factor de transcripción siendo más pronunciada en la retina tanto humana como de ratón. A diferencia con el modelo de pez zebra de *ZNF408*, la inhibición de la expresión de *ZNF513* en los ciprínidos, no causa defectos extraoculares ni una vascularización retiniana aberrante, sin embargo sí que causa defectos tanto estructurales como funcionales en la retina, como un adelgazamiento de ésta causado por la degeneración de los fotorreceptores, principalmente bastones, consistente con los hallazgos clínicos encontrados en los pacientes con RP (Li et al., 2010).

Adicionalmente, se han reportado mutaciones en el gen *ZNF423* como causantes por un lado del síndrome de Joubert (JBS MIM#614844), un tipo de distrofia de retina síndrónica caracterizada por presentar alteraciones renales y neurológicas, y por otro, de ciliopatías asociadas a nefronoptisis (NPHR-RC) (Chaki et al., 2012). Dependiendo de la mutación identificada y de la localización de ésta, se han identificado patologías con un fenotipo más o menos severo e incluso, distintos patrones de herencia. Este gen codifica para un factor de transcripción de 30 dominios C2H2 *zinc finger* el cual participa activamente en la ruta de señalización de respuesta a daño en el DNA. Estudios de co-inmunoprecipitación han revelado interacción de *ZNF423* con CEP290, localizado en la zona ciliar, lo que demuestra la existencia de complejos dinámicos de interacción (Chaki et al., 2012).

Estos hallazgos son consistentes con la hipótesis de que cuanto mayor sea el número de dominios C2H2 *zinc finger*, mayor será la variabilidad de sus posibles dianas y por tanto de los mecanismos relacionados. Aparentemente, el factor de transcripción *ZNF513*, a pesar de expresarse ubicuamente sólo participa en procesos de desarrollo y mantenimiento de la retina a diferencia con *ZNF408* que además está participando activamente en el desarrollo vascular, mientras que *ZNF423* participa en numerosas rutas en distintos tejidos ya que diferentes alteraciones en este gen causan anomalías renales, neurológicas o retinianas, entre otras.

En vertebrados, los mecanismos de expresión génica de los fotorreceptores de la retina, tanto bastones como conos, están regulados por una amplia red de factores de transcripción, que controlan por un lado su propia expresión mediante unión a sus propios promotores, y por otro la expresión de otros factores de transcripción u otros genes. Estudios de inmunoprecipitación de cromatina (*ChIP- Chromatin Immunoprecipitation*) han revelado la interacción de *ZNF513* con promotores no sólo de otros factores de transcripción, como *Pax6* o *Sp4* si no también, de otros genes que participan activamente en el desarrollo y mantenimiento de los fotorreceptores como la rodopsina (Li et al., 2010). Futuros estudios, como ensayos de inmunoprecipitación de cromatina, nos permitirían profundizar en los distintos mecanismos moleculares en los que está participando *ZNF408* así como descubrir nuevas dianas transcripcionales, genes y/o factores de transcripción, que puedan tener un papel fundamental en la retina.

Se ha demostrado ampliamente que el estudio por WES representa una herramienta eficaz tanto en el diagnóstico molecular como en investigación genética en el estudio de enfermedades heterogéneas, como la RP, especialmente en aquellos casos en los que la información clínica es limitada. En la actualidad, además, la limitación del análisis bioinformático que existía hace algunos años, se está solventando gracias a la comercialización de *software* sencillos y/o la incorporación de personal bioinformático en los grupos de trabajo lo que facilita enormemente tanto el procesamiento y análisis de datos como el control

de calidad, el mapeo de las lecturas o la anotación, hasta el filtrado o priorización e interpretación de las variantes encontradas (Pabinger et al., 2014). Por otro lado, y con objeto de incrementar su aplicabilidad, los protocolos de preparación de las librerías también se han vuelto cada vez más asequibles. No obstante, existen todavía algunas limitaciones por abordar especialmente ahora que el coste por base está descendiendo de manera vertiginosa y los estudios de secuenciación de exoma completo se están estableciendo como aproximación no sólo a nivel de investigación si no también en un contexto diagnóstico (Lelieveld et al., 2016).

## 4.2 Datos globales obtenidos mediante secuenciación dirigida

Una de las conclusiones principales extraídas de los estudios WES realizados tanto en población española (Corton et al., 2013a; Almoguera et al., 2015; González-del Pozo et al., 2014; Méndez-Vidal et al., 2013) como en otras poblaciones (Arash Eshghabadi et al., 2015; Jinda et al., 2014; Xu et al., 2014) es que el porcentaje de familias que se caracterizan con mutaciones en genes ya asociados a RP es muy elevado. Por ello, se propuso realizar una aproximación de secuenciación dirigida basado en paneles en cuyo diseño estaban incluidos 75 genes previamente asociados a DR no sindrómica. Este trabajo nos ha permitido realizar la optimización y validación de esta aproximación NGS dirigida, con el objetivo de caracterizar el mayor número de pacientes, para que una vez descartadas mutaciones en genes ya conocidos, se puedan llevar a cabo estudios más amplios de exoma o genoma completo que nos permitan identificar nuevos genes involucrados en retinosis pigmentaria.

El enorme potencial de este tipo de secuenciación masiva dirigida ya ha sido demostrado previamente en esta patología, tanto en nuestra cohorte española (Fernandez-San Jose et al., 2015b) como en otras poblaciones (Consugar et al., 2014; Zhao et al., 2015a; Chen et al., 2013b). En este estudio, la tasa diagnóstica obtenida tras analizar 47 familias afectadas de arRP ha sido del 57%, identificándose 33 mutaciones distintas, de las cuales 20 han sido nuevas. En comparación con otras tecnologías clásicas utilizadas hace unos años como primera aproximación, como es el cribado mediante secuenciación automática de Sanger o los *microarrays* de genotipado (Blanco-Kelly et al., 2012; Dryja and Li, 1995), las tecnologías NGS son capaces de identificar la causa genética en el 30-70% de los casos, dependiendo del tipo de RP y de la tecnología utilizada (Fernandez-San Jose et al., 2015b; Glöckle et al., 2014), siendo del 20 al 50% en arRP (Fu et al., 2013; Neveling et al., 2012), consistente con los resultados obtenidos en este trabajo. Este porcentaje es significativamente más elevado que el 11-15% obtenido tras el cribado con *microarrays* de genotipado en población española (Ávila-Fernández et al., 2010) y en otras poblaciones (van Huet et al., 2015).

Tras los resultados genéticos obtenidos con la aproximación de secuenciación dirigida basada en un panel de 75 genes, siete de las 27 familias caracterizadas fueron reclasificadas tanto clínica como genéticamente. Cinco de ellas fueron clínicamente reclasificadas: cuatro se han clasificado como síndrome de Usher atípico, con una sordera neurosensorial de aparición en edad adulta identificándose mutaciones en el gen *USH2A* y la otra, se ha clasificado como distrofia de conos-bastones tras la identificación de mutaciones en el gen *ABCA4*. Las otras dos familias restantes se han reclasificado genéticamente pasando a ser RP autosómica dominante y RP ligada al cromosoma X, con mutaciones en los genes *RP1* y *RP2*, respectivamente. En estos dos últimos casos, los estudios de segregación familiar resultaron claves para el proceso de reclasificación de estas familias y demostraron que un alto porcentaje de los casos esporádicos, que en población española representan aproximadamente un 40% de los casos totales de RP,

se deben a mutaciones en genes de herencia dominante o ligada al cromosoma X. Esto puede ser debido bien a que existe penetrancia incompleta en generaciones previas dando lugar a una amplia variabilidad fenotípica o incluso familiares completamente asintomáticos o bien por la aparición de mutaciones *de novo*. Se estima que en torno al 1-2% de los casos esporádicos se deben a mutaciones *de novo* en genes de herencia dominante y que el 15% de varones afectados podrían presentar mutaciones en los genes *RPGR* y *RP2* de herencia ligada al cromosoma X (Branham et al., 2012; Neveling et al., 2012). En este trabajo no se han identificado mutaciones *de novo*, sin embargo con la llegada de la NGS, se ha podido demostrar que el número de mutaciones *de novo* en RP estaría infraestimado, siendo un factor limitante la disponibilidad de familiares para la identificación de éstas, calculándose una implicación de entre el 3-5% según datos del grupo no publicados y otros trabajos (Bravo-Gil et al., 2017). La reclasificación de estas familias es crucial y supone para ellas una serie de ventajas, no sólo a la hora de proporcionarles un adecuado consejo genético y un correcto pronóstico y seguimiento, sino que puede permitir el desarrollo de nuevas terapias personalizadas en cada caso concreto.

En dos de las familias recesivas estudiadas sólo se encontró un alelo en estado de heterocigosidad; en la familia RP-1874 en el gen *CNGB1* y en la familia RP-1747 en los genes *EYS* y *USH2A*, no pudiéndose descartar la presencia del segundo alelo en zonas reguladoras o intrónicas profundas no analizadas sistemáticamente en este trabajo. Tras estudios de MLPA en la familia RP-1747, se descartaron grandes deleciones o duplicaciones tanto en el gen *EYS* como en *USH2A*. En un estudio en población control, se ha demostrado que uno de cada cuatro o cinco individuos no afectados serían portadores de mutaciones patogénicas en genes recesivos de distrofias de retina hereditarias entre las que se encuentran la retinosis pigmentaria (Nishiguchi and Rivolta, 2012), por lo que alternativamente existe la posibilidad de que el gen causante de la enfermedad no sea ninguno de los anteriormente citados, siendo éstos alelos modificadores o hallazgos fortuitos.

Un factor importante a tener en cuenta son las limitaciones propias de cada tecnología NGS. Un problema común a todas ellas es la dificultad de capturar regiones complicadas altamente repetitivas o ricas en purinas. Un ejemplo de ello es el exón 15 del gen *RPGR* (ORF15), en el cual se localizan en torno al 60% de las mutaciones causantes de RP ligada al cromosoma X (xLRP) (Sharon et al., 2003). Se ha hecho un estudio comparativo entre las diferentes aproximaciones NGS (secuenciación dirigida por el método de amplicones o de captura, WES y WGS) utilizadas en el Departamento de Genética, observándose que en ningún caso se consigue solventar íntegramente este problema. Varios autores proponen la utilización de técnicas alternativas como la PCR de alta fidelidad de manera adicional a la NGS para el estudio de estas regiones complicadas. Gracias a esta estrategia han sido capaces de rediagnosticar entre el 14-30% de pacientes de xLRP no caracterizados (Huang et al., 2015; Li et al., 2016).

En esta nueva era genómica, el interés de la comunidad científica ya no sólo está en la identificación de cambios puntuales (SNVs) si no en otro tipo de alteraciones genéticas, como son las variaciones en el número de copia (*Copy Number Variations*; CNVs). Aunque se desconoce la contribución de las CNVs en las enfermedades humanas, se cree que la implicación de estos grandes reordenamientos sería mayor que la de los cambios puntuales (Lupski, 2007; Zhang et al., 2009). Tanto CNVs que abarcan de manera parcial un gen concreto hasta aquellas que abarcan varios genes pueden alterar funciones fisiológicas imprescindibles provocando patologías muy diversas. No obstante, es difícil atribuir correlaciones genotipo-fenotipo ya que a menudo no hay información de bases de datos (DGVA, dbVar), guías o predictores de patogenicidad (Hehir-Kwa et al., 2010) que nos permitan establecer su causalidad. Alrededor del 90% de las CNVs

reportadas, no han sido genotipadas en individuos control por lo que se desconoce su verdadera frecuencia en las distintas poblaciones (Zhang et al., 2009). Cabe destacar también que una CNV no es sinónimo de patogenicidad ya que es posible encontrar desde duplicaciones que provoquen fenotipos más suaves hasta variantes polimórficas benignas (Iafate et al., 2004).

Desde hace algunos años hasta la actualidad, las tecnologías estándar utilizadas para la detección de CNVs son las basadas en *arrays* de SNPs, *arrays* CGH o MLPA (Jin et al., 2008; Pieras et al., 2011; Steele-Stallard et al., 2013). Sin embargo, las tecnologías NGS se presentan como un método prometedor para detección de CNVs (Almoguera et al., 2015; Aparisi et al., 2014; Eisenberger et al., 2013; Martin-Merida et al., 2017). Con el principal objetivo de facilitar su detección, se están diseñando algoritmos bioinformáticos para identificación de CNVs, aunque ninguno de ellos parece obtener la sensibilidad y especificidad deseada ya que existe mucha variabilidad dependiendo de las distintas tecnologías de NGS. Éste es uno de los factores limitantes, ya que una mayor homogeneidad obtenida entre las distintas muestras en términos de captura y profundidad de lectura, facilita notablemente la posterior normalización entre ellas (Kadalayil et al., 2014; Tattini et al., 2015).

La alta profundidad de lectura y uniformidad obtenida con nuestra aproximación NGS basada en secuenciación dirigida mediante panel de genes, nos ha permitido realizar un estudio de CNVs siendo capaces de detectar tres grandes deleciones involucrando a los genes *EYS* y *USH2A*, en los cuales ya se había reportado una elevada prevalencia de grandes deleciones y duplicaciones (Dad et al., 2015; García-García et al., 2014; Pieras et al., 2011). La contribución de las alteraciones en el número de copia en los casos de RP está todavía por determinar, ya que hasta ahora se han publicado pocos estudios al respecto y sólo en algunos genes concretos, por lo que posiblemente, la fracción de grandes reordenamientos parece estar infraestimada (Bujakowska et al., 2016; Van Cauwenbergh et al., 2016; Khateb et al., 2016). Estudios realizados en el gen *USH2A*, sugieren que al menos el 25% de los pacientes portadores de una mutación puntual podrían presentar reordenamientos en el segundo alelo (García-García et al., 2014; Steele-Stallard et al., 2013). Asimismo, estudios realizados en el gen *EYS*, han reportado grandes deleciones/duplicaciones en el 15% de los pacientes con un alelo mutante previamente identificado (Eisenberger et al., 2013; Pieras et al., 2011). Sin embargo, está ampliamente reportado que el gen *ABCA4* con una alta prevalencia, con más de 1000 mutaciones puntuales reportadas, no presenta un porcentaje elevado de CNVs asociadas a patología (Riveiro-Alvarez et al., 2013). Recientemente, se ha demostrado la alta prevalencia de CNVs tanto en distintos genes candidatos como en genes previamente asociados a distrofias de retina mediante análisis por plataforma de array CGH (Bujakowska et al., 2016; Van Cauwenbergh et al., 2016), así como por estudios de secuenciación de exoma completo (Khateb et al., 2016), obteniendo una tasa de detección diagnóstica de entre el 4 y 18%, respectivamente.

A pesar de los resultados obtenidos en nuestro trabajo y, aunque existen multitud de estudios publicados al respecto (Gambin et al., 2016; Poultney et al., 2013; Coin et al., 2012), las tecnologías basadas en secuenciación dirigida de genes concretos o secuenciación de exoma completo, no serían las más adecuadas para la realización de estudios de estos grandes reordenamientos. En estas aproximaciones se captura menos del 2% de región codificante y en dichos datos genómicos no existe uniformidad a lo largo del genoma, por lo que teniendo en cuenta las bases de los algoritmos utilizados en los métodos de identificación de CNVs, esto dificultaría su detección (Lelieveld et al., 2016). Por ello, el estudio de genoma completo (WGS) sería probablemente la mejor plataforma para una detección más fiable no sólo de variaciones en el número de



copia sino también de otras variantes estructurales, así como de establecer de forma más precisa los puntos de rotura de éstas, que mayoritariamente recaen en regiones intrónicas profundas por presentar un alto porcentaje de elementos repetitivos (Gilissen et al., 2014).

La rápida evolución de las tecnologías de secuenciación masiva, tanto en la precisión y en el rendimiento de los secuenciadores que han conseguido reducir tiempo de respuesta y coste por base, como en el desarrollo de protocolos más rápidos y sencillos, o avances en el manejo e interpretación de los datos generados, ha permitido su rápida expansión no sólo dentro de la investigación si no también en el ámbito clínico. La implementación clínica de detección de CNVs en las distintas aproximaciones de NGS como secuenciación dirigida, o secuenciación de exoma o genoma completo mediante protocolos y procesos de control de calidad estandarizados tendría el potencial de reducir drásticamente el número de ensayos genómicos requeridos por paciente para llegar a un diagnóstico final, lo que mejoraría considerablemente no sólo la atención sanitaria si no también los costes totales en sanidad (Hehir-Kwa et al., 2015).

Hace algunos años, tanto por cobertura, uniformidad y profundidad de lectura, como por el coste por base o el manejo de la gran cantidad de datos genéticos generados, hacía imposible pensar la implementación de la secuenciación del exoma completo en la práctica clínica, sin embargo en la actualidad es ya una realidad. En ocasiones, si existen suficientes evidencias clínicas optar por un panel de genes dirigido a un subtipo concreto de distrofia de retina (DR), como puede ser la retinosis pigmentaria, podría ser la aproximación más adecuada. No obstante, diferentes estudios sugieren que aproximadamente el 35% de los casos de DR quedan sin resolver a nivel genético, a pesar de que la mayor parte de genes implicados han sido ya identificados (den Hollander et al., 2010). Este hecho sugiere que quizás, la mejor aproximación en aquellas distrofias de retina no definidas clínicamente, sean estudios de secuenciación de exoma completo pero dirigidos en primer lugar al análisis de genes previamente asociados con la patología (OMIM y RetNet), ya que se presenta como una estrategia fiable con una alta sensibilidad y especificidad a llevar a cabo en la rutina diagnóstica de estos pacientes (Riera et al., 2017). En este contexto es posible establecer nuevas correlaciones genotipo-fenotipo, nuevas asociaciones o establecer nuevos patrones de herencia, hecho que ha permitido reclasificar varios genes de DR (Riera et al., 2017; de Castro-Miró et al., 2016; Xu et al., 2016; Shevach et al., 2015). Además cabe destacar el gran potencial de esta tecnología para el descubrimiento de nuevos genes asociados a estas patologías tan heterogéneas y fenotípicamente solapantes, una vez que ya se han descartado los genes conocidos. Muchos son los trabajos donde se reportan nuevas asociaciones y el número de nuevos genes ha seguido creciendo exponencialmente en los últimos años (Corton et al., 2016; Xu et al., 2016; Haer-Wigman et al., 2015; Roosing et al., 2015; Wang et al., 2015; Ajmal et al., 2014).

No obstante, tras esta aproximación, una proporción significativa de pacientes afectados de diferentes distrofias de retina siguen aún sin diagnosticar genéticamente (Riera et al., 2017; de Castro-Miró et al., 2016). Existen múltiples razones, como la cobertura desigual en los distintos genes dependiendo de las regiones complejas que presenten, problemas en el proceso bioinformático entre los que se encuentran un correcto mapeo y anotación de variantes, la presencia de mutaciones potencialmente patogénicas en genes aún no asociados a DR, mecanismos epigenéticos y efectos modificadores, entre otros. Adicionalmente, otro factor de gran importancia es que probablemente las mutaciones causantes de enfermedad en esos pacientes se encuentran fuera de las regiones diana, en región no codificante bien en regiones reguladoras o regiones intrónicas profundas. Se cree que en torno al 15% de las mutaciones causales se localizan fuera de las regiones codificantes (Botstein and Risch, 2003).

El principal requisito de todas las aproximaciones de secuenciación masiva, es una cobertura y profundidad de lectura por base suficiente para que la detección de variantes genómicas sea fiable, es decir que presenten un alto porcentaje de sensibilidad y especificidad. Estudios comparativos de secuenciación de exoma y genoma completo, han demostrado que a pesar de que la aproximación WES ha mejorado considerablemente en los últimos años en términos de profundidad de lectura, en las plataformas de genoma completo (WGS) no sólo se generan profundidades 87 veces superiores, sino que también ha mejorado la cobertura de las regiones codificantes pasando de un 95% de región codificante cubierta en WES a un 98% en WGS (Lelieveld et al., 2015). Si bien, la baja cobertura de ciertas regiones sabemos que son debidas a secuencias altamente repetitivas o ricas en purinas, complicadas tanto de capturar como de secuenciar (Benjamini and Speed, 2012), una de las ventajas del WGS a parte de secuenciar regiones no codificantes es que no hay involucrados métodos de captura por lo que no se introduce ese sesgo (Lelieveld et al., 2015). Además otro parámetro a tener en cuenta son los falsos positivos de ambas tecnologías siendo prácticamente igual en las *indels* pero siendo casi 5 veces superior (78%) para los cambios puntuales en el caso de WES en comparación con los estudios de WGS (17%) (Belkadi et al., 2015). Algunos autores han demostrado que los parámetros de sensibilidad y especificidad entre aproximaciones de secuenciación dirigida (*targeted* NGS) y WGS son prácticamente similares, siendo ligeramente más bajas en WES (Ellingford et al., 2016).

Uno de los grandes retos en estos estudios WGS es el análisis de la gran cantidad de datos generados. Los datos brutos obtenidos en región codificante con WES difieren ligeramente con los encontrados en WGS, demostrándose en estudios preliminares que se obtienen en torno a 4,4 millones de cambios puntuales (SNVs) y 276 CNVs de media por genoma completo (Gilissen et al., 2014). Sin embargo, sí que existe una gran diferencia entre los datos obtenidos tras los filtros de profundidad de lectura, calidad, frecuencia alélica, frecuencia poblacional, entre otros, siendo de 105 SNVs y 32 *indels* en WES y de 692 SNVs y 105 *indels* en WGS (Belkadi et al., 2015). Éste es uno de los inconvenientes a los que nos enfrentamos en estudios de NGS pero especialmente en aquellos tan amplios como el WES o WGS en los que surge la cuestión de cómo proceder con variantes encontradas aparentemente deletéreas de las cuales no hay apenas información, categorizadas como variantes de significado incierto (VUS *variant of uncertain significance*). La realización de estudios funcionales, especialmente para aquellas variantes encontradas en regiones reguladoras o intrónicas profundas puede ser muy costoso en términos económicos y de tiempo, especialmente si el objetivo de esta aproximación a largo plazo es su implementación en la rutina diagnóstica. En este punto se destaca la importancia de que existan distintas bases de datos accesibles a toda la comunidad científica en la que se reporten frecuencias alélicas obtenidas en distintas poblaciones, que nos permitan evaluar la causalidad de las variantes encontradas, e incluso reclasificar mutaciones y/o polimorfismos (Zazo-Seco et al., 2017; Shearer et al., 2014).

Tras los resultados obtenidos mediante estudios de secuenciación de genoma completo, ya utilizado en el ámbito de la investigación, podemos concluir que se plantea como una aproximación prometedora a largo plazo en el ámbito clínico ya que se estima que el rendimiento diagnóstico podría aumentar globalmente en un 30% en los pacientes con distrofias de retina (Ellingford et al., 2016), sumando, además, el beneficio que supondría que con una única tecnología se puedan identificar con precisión no sólo mutaciones puntuales sino otras variantes estructurales (Ellingford et al., 2016). Sin embargo, a día de hoy, los estudios de secuenciación dirigida por paneles de genes o secuenciación de exoma completo (WES) o dirigido a unos genes específicos, ofrecen mayores ventajas en términos económicos, de tiempo y de manejo, análisis y almacenamiento de los datos genéticos generados.

Otro de los problemas a los que nos enfrentamos son los hallazgos inesperados o secundarios. La probabilidad de encontrar unos de estos hallazgos inesperados en un panel de genes específico de una enfermedad concreta es prácticamente inexistente, sin embargo esta probabilidad aumenta considerablemente en estudios más amplios como WES o WGS. A pesar de que los algoritmos bioinformáticos deben estar centrados en el análisis de los genes relacionados con la enfermedad del paciente, existe la posibilidad de que en el proceso de priorización de las variantes genéticas aparezcan estos hallazgos secundarios. Existen guías continuamente actualizadas en las que se recomiendan cómo actuar o qué y cómo reportar estas variantes genéticas (Ayuso and Dal-Ré, 2016; Matthijs et al., 2016; Kalia et al., 2016). Actualmente, el Colegio Americano de Medicina Genética y Genómica (ACMG)(Kalia et al., 2016) ha publicado una lista de 60 genes considerados médicamente accionables ya que tienen una significancia médica clara e inmediata para la salud del paciente así como para los miembros de su familia, estén o no relacionados con los síntomas actuales. Estos hallazgos inesperados deberán ser reportados, siempre que el paciente así lo refleje, ya que podrían tener consecuencias a nivel de asesoramiento genético, elección reproductiva etc (Ayuso and Dal-Ré, 2016; Matthijs et al., 2016; Kalia et al., 2016).

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo nos han permitido establecer un nuevo algoritmo de estudio en las distrofias de retina tanto en un contexto diagnóstico como en un contexto de investigación, lo que permitirá agilizar y optimizar la caracterización molecular de los pacientes afectados (Figura 4.9). A comienzos de esta tesis doctoral, año 2013, cuando se empezó a incrementar considerablemente el uso de las tecnologías NGS, se realizó la validación en paralelo de ambas técnicas, tanto secuenciación dirigida basada en panel de genes como secuenciación de exoma completo, para poder realizar una comparativa de manejo y almacenamiento de datos genómicos generados, tiempo de filtrado, priorización y análisis de las variantes encontradas y de capacidad diagnóstica entre ambas (Figura 4.9 A). Tras los resultados obtenidos, y debido a que en los últimos años las tecnologías han mejorado su calidad, los costes por base se han reducido notablemente, entre otros, el algoritmo de estudio propuesto se muestra en la (Figura 4.9B.)

### 4.3 Perspectivas futuras

En la actualidad se han desarrollado ya aproximaciones de tercera generación, basados en la secuenciación de una única molécula de DNA (*Single-molecule sequencing* SMS). En estas nuevas tecnologías, la etapa de amplificación ya no se lleva a cabo lo que reduce los sesgos generados en este proceso además de reducir el tiempo y precio global de la secuenciación. Además con estas nuevas estrategias se ha conseguido aumentar la longitud de las lecturas en 3 órdenes de magnitud, lo que permitirá realizar ensamblajes *de novo* e incluso detectar haplotipos completos. Adicionalmente, se cree que esto podría solventar uno de los mayores problemas de las aproximaciones de segunda generación, la cobertura de regiones altamente repetitivas, aunque esto suponga ensamblajes más complejos y generación de nuevos algoritmos o estrategias que permitan realizar el máximo aprovechamiento de los datos generados (Lavezzo et al., 2016; Schadt et al., 2010).

Existen diferentes tecnologías basadas en: i) secuenciación a tiempo real (Eid et al., 2009; Rhoads and Au, 2015), ii) secuenciación basada en microscopía electrónica de transmisión (Krivanek et al., 2010) o iii)

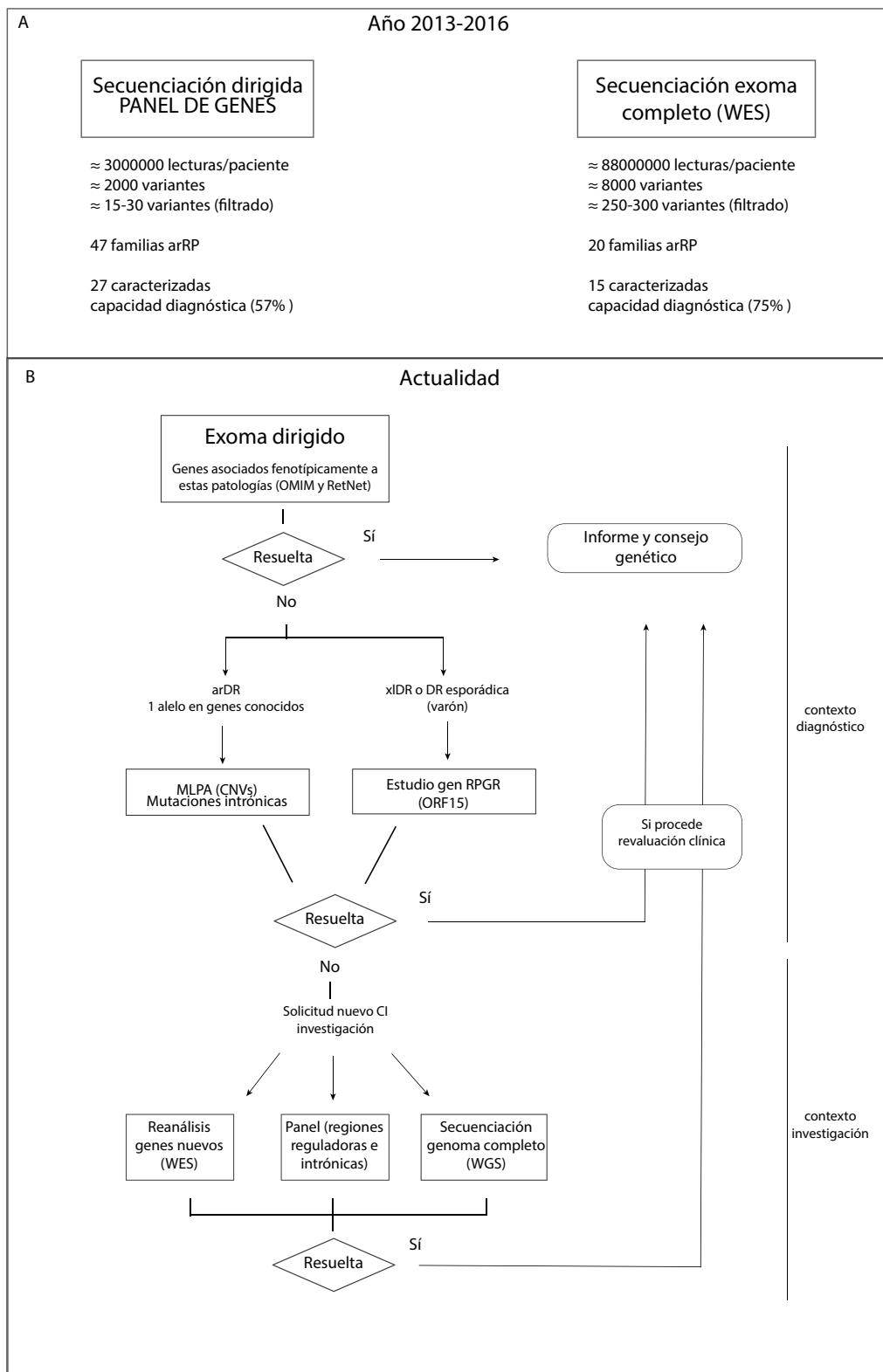


Figure 4.9: Nuevo algoritmo de estudio en distrofias de retina basado en la implementación de las distintas tecnologías de secuenciación masiva.

secuenciación a través de nanoporos (Feng et al., 2015; Derrington et al., 2010; Luan et al., 2010). Todas estas aproximaciones tienen una utilidad más allá de la secuenciación del DNA, permitiendo la identificación de patrones de metilación, el estudio de los transcriptomas mediante secuenciación de moléculas únicas de RNA sin necesidad de procesos de conversión de RNA en cDNA, la caracterización completa de la traducción o la detección de nuevas interacciones entre DNA y proteínas (Lavezzo et al., 2016). La secuenciación de DNA a gran escala, junto con datos moleculares relacionados con fenotipos específicos permitirá establecer nuevas estrategias en áreas como la medicina personalizada, que hará que repercutan enormemente en la atención sanitaria de los pacientes.

En la actualidad, están emergiendo ya las catalogadas como tecnologías de cuarta generación en las que se pretende comprender mejor la organización compleja de algunos tejidos mediante el análisis detallado de células individuales preservando la localización espacial del DNA y RNA. Algunos estudios han demostrado el potencial de las aproximaciones de NGS en RNA de células únicas (*single-cell RNA sequencing*) proporcionando nuevos conocimientos sobre la red transcripcional de diferentes tejidos (Hanchate et al., 2015), sin embargo, en todos estos ensayos es necesaria una disgregación de las células de su microambiente lo que podría estar alterando los datos en relación a lo que está ocurriendo en el tejido original. Esta limitación se vería solventada en estas nuevas aproximaciones en las que se propone una secuenciación *in situ* de los ácidos nucleicos tanto DNA como RNA directamente en células o tejidos (Ke et al., 2016).

A pesar de que estas tecnologías se presentan como aproximaciones prometedoras, todavía existen numerosos retos que afrontar como la baja eficiencia y/o el manejo e interpretación de los datos para poder ser aplicables tanto en investigación como en el ámbito clínico.



## Conclusiones

---

1. Los resultados de este trabajo demuestran, como se describe en la literatura, que la aplicación de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva para el estudio molecular de las distrofias de retina, enfermedades muy heterogéneas tanto clínica como genéticamente, incrementa considerablemente la capacidad diagnóstica, siendo una aproximación fiable y eficiente.

2. Los estudios de secuenciación de exoma completo en nuestra cohorte de pacientes con DR, han permitido profundizar en el conocimiento de las bases moleculares de la retinosis pigmentaria estableciendo nuevas asociaciones fenotípicas a entidades genéticas previamente reportadas e identificando un nuevo gen como causante de esta patología, abriendo así nuevas posibilidades a futuras aproximaciones diagnósticas.

3. La identificación de cinco nuevas mutaciones en el gen *ABHD12* y una detallada revisión clínica en las familias estudiadas, ha permitido ampliar el espectro fenotípico de este gen, previamente asociado a una forma sindrómica de RP (síndrome de PHARC), asociándose también a retinosis pigmentaria no sindrómica en una familia en la que se descartaron otras alteraciones propias de este síndrome, estableciéndose una nueva asociación del gen *ABHD12*.

4. Mediante la combinación de mapeo de homocigosidad y secuenciación de exoma completo, se ha identificado *ZNF408* como nuevo gen causante de retinosis pigmentaria autosómica recesiva en dos familias españolas. Los estudios funcionales han revelado que el factor de transcripción *ZNF408* parece desempeñar un papel importante en la retina, cumpliendo funciones esenciales en el mantenimiento homeostático así como en el desarrollo vascular.

5. La tecnología de secuenciación masiva basada en panel de genes aplicada en este trabajo, en la que se han incluido 75 genes previamente asociados a distrofias de retina ha permitido alcanzar una tasa diagnóstica de 57%, entre las familias RP autosómicas recesivas incremento notable respecto a la tasa diagnóstica del 11-15% obtenida con las técnicas clásicas utilizadas.

6. La aproximación de secuenciación masiva dirigida ha permitido identificar un total de 33 variantes diferentes consideradas como patogénicas, de las cuales casi el 61% eran nuevas. Además tanto la buena cobertura como la profundidad de lectura obtenida, ha permitido no sólo la detección de mutaciones puntuales, sino también CNVs, identificándose tres grandes deleciones afectando a los genes *EYS* y *USH2A*.

7. Tras estos estudios algunas familias no fueron caracterizadas, sin embargo, no es posible descartar que exista una causa genética. Esto es debido a las diferentes limitaciones de las técnicas, la existencia de regiones no cubiertas, regiones no analizadas como regiones reguladoras o intrónicas profundas, o la presencia de grandes reordenamientos. Si bien, este hecho permite la incorporación de estos pacientes en futuros proyectos de investigación.

8. La secuenciación masiva ha ayudado a definir el diagnóstico molecular de las familias afectadas, llevando a la reclasificación clínica y/o genética de ocho de ellas lo que resulta de gran importancia a la hora de proporcionar un diagnóstico preciso y un adecuado asesoramiento genético. La caracterización genética de estas familias permitirá la inclusión de estos pacientes en futuras aproximaciones terapéuticas.

9. Tras los resultados obtenidos mediante los estudios de secuenciación dirigida y secuenciación de exoma completo en este trabajo se ha podido establecer un nuevo algoritmo de estudio en las distrofias de retina, lo que permitirá agilizar y optimizar el diagnóstico molecular de los pacientes afectados de estas patologías.





## Conclusions

---

1. The results obtained from this work demonstrate that the application of next-generation sequencing technologies to the molecular diagnosis of retinal dystrophies, highly heterogeneous diseases both clinically and genetically, increases the diagnostic rate considerably and is a reliable and efficient approach.

2. Molecular basis of retinitis pigmentosa understanding increased with our results obtained by whole exome sequencing studies in our RD patient's cohort. New phenotypic association was established and a new gene as a cause of this disease was identified, shedding light on new possibilities for future diagnostic approaches.

3. The identification of five new mutations in the *ABHD12* gene and a detailed clinical review in the families studied, allowed to extend the phenotypic spectrum of this gene. Previously associated with a syndromic form of RP (PHARC syndrome), this gene was also associated with non-syndromic retinitis pigmentosa in a family in which extra-ocular alterations characteristic of this syndrome have been ruled out, establishing a new phenotypic association to the *ABHD12* gene.

4. The combination of homozygosity mapping and whole exome sequencing approaches, led to the identification of *ZNF408* as a new candidate gene responsible for autosomal recessive retinitis pigmentosa in two Spanish families. Interestingly, functional studies revealed that the ZNF408 transcription factor has an important role in the retina, performing essential functions in retinal homeostasis maintenance as well as in vascular development.

5. Our approach using a panel of 75 genes previously associated with retinal dystrophies reached a diagnostic rate of 57% among the autosomal recessive RP families. This approach allowed to increase by four compared to the diagnostic rate (11-15%) obtained using the classic techniques.

6. This targeted-NGS strategy led to the identification of 33 different pathogenic variants, of which almost 61% were novel mutations. In addition, the good coverage and the read depth obtained allowed the detection not only of point mutations but also copy number variations (CNVs). Three large deletions located two of them in the *EYS* gene and the other in the *USH2A* gene were identified.

7. Unfortunately, after these studies some families remain uncharacterized and it is not possible to rule out a genetic cause. This can be owing to different factors such as the different NGS limitations, the regions not covered by design, regions not systematically analyzed as regulatory or deep intronic regions, or the presence of genomic alterations such as large rearrangements, in the uncharacterized families. However, further analysis that overcome the limitations mentioned above will be performed on those to better understand and characterize this disease.

8. Next-generation sequencing technologies helped to define the molecular diagnosis of RP families studied and therefore to provide an accurate diagnosis and proper genetic counseling. We reclassified eight of them both clinically and genetically. The genetic characterization of these families will allow the inclusion of these patients in future therapeutic approaches.

9. From the results obtained in this work based on targeted sequencing and whole exome sequencing, it has been possible to establish a new algorithm to study retinal dystrophies, which will allow the speeding up and optimizing of the molecular diagnosis for patients affected by these diseases.



## Bibliografía

---

- Ajmal, M., Khan, M. I., Neveling, K., Khan, Y. M., Azam, M., Waheed, N. K., Hamel, C. P., Ben-Yosef, T., De Baere, E., Koenekoop, R. K., et al. (2014). A missense mutation in the splicing factor gene *dhx38* is associated with early-onset retinitis pigmentosa with macular coloboma. *Journal of medical genetics*, pages jmedgenet–2014.
- Alfano, G., Kruczek, P. M., Shah, A. Z., Kramarz, B., Jeffery, G., Zelhof, A. C., and Bhattacharya, S. S. (2016). Eys is a protein associated with the ciliary axoneme in rods and cones. *PloS one*, 11(11):e0166397.
- Almoguera, B., Li, J., Fernandez-San Jose, P., Liu, Y., March, M., Pellegrino, R., Golhar, R., Corton, M., Blanco-Kelly, F., López-Molina, M. I., et al. (2015). Application of whole exome sequencing in six families with an initial diagnosis of autosomal dominant retinitis pigmentosa: lessons learned. *PloS one*, 10(7):e0133624.
- Aparisi, M. J., Aller, E., Fuster-García, C., García-García, G., Rodrigo, R., Vázquez-Manrique, R. P., Blanco-Kelly, F., Ayuso, C., Roux, A.-F., Jaijo, T., et al. (2014). Targeted next generation sequencing for molecular diagnosis of usher syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*, 9(1):168.
- Arango-Gonzalez, B., Trifunović, D., Sahaboglu, A., Kranz, K., Michalakis, S., Farinelli, P., Koch, S., Koch, F., Cottet, S., Janssen-Bienhold, U., et al. (2014). Identification of a common non-apoptotic cell death mechanism in hereditary retinal degeneration. *PloS one*, 9(11):e112142.
- Arash Eshghabadi, M., Fedra Hajizadeh, M., Mohammad Reza Akbari, M., Kimia Kahrizi, M., and Mohammad Riazi Esfahani, M. (2015). Impact of whole exome sequencing among iranian patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Archives of Iranian medicine*, 18(11):776.
- Ávila-Fernández, A., Cantalapiedra, D., Aller, E., Vallespín, E., Aguirre-Lambán, J., Blanco-Kelly, F., Corton, M., Riveiro-Álvarez, R., Allikmets, R., Trujillo-Tiebas, M. J., et al. (2010). Mutation analysis of 272 spanish families affected by autosomal recessive retinitis pigmentosa using a genotyping microarray.
- Avila-Fernandez, A., Corton, M., Nishiguchi, K. M., Muñoz-Sanz, N., Benavides-Mori, B., Blanco-Kelly, F., Riveiro-Alvarez, R., Garcia-Sandoval, B., Rivolta, C., and Ayuso, C. (2012). Identification of an *rp1* prevalent founder mutation and related phenotype in spanish patients with early-onset autosomal recessive retinitis. *Ophthalmology*, 119(12):2616–2621.
- Avila-Fernandez, A., Riveiro-Alvarez, R., Vallespin, E., Wilke, R., Tapias, I., Cantalapiedra, D., Aguirre-Lamban, J., Gimenez, A., Trujillo-Tiebas, M.-J., and Ayuso, C. (2008). *Cerkl* mutations and associated phenotypes in seven spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(6):2709–2713.
- Ayuso, C. and Dal-Ré, R. (2016). Comunicación de los resultados a los participantes en la investigación genética de las enfermedades raras. *Ética En La Investigación De Las Enfermedades Raras*.
- Ayuso, C., Garcia-Sandoval, B., Najera, C., Valverde, D., Carballo, M., and Antiñolo, G. (1995). Spanish multicentric and multidisciplinary group for research into retinitis pigmentosa. retinitis pigmentosa in spain. *Clin Genet*, 48:120–122.
- Ayuso, C. and Millan, J. M. (2010). Retinitis pigmentosa and allied conditions today: a paradigm of translational research. *Genome medicine*, 2(5):34.
- Bainbridge, J. W., Smith, A. J., Barker, S. S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., Viswanathan, A., Holder, G. E., Stockman, A., Tyler, N., et al. (2008). Effect of gene therapy on visual function in leber's congenital amaurosis. *New England Journal of Medicine*, 358(21):2231–2239.
- Bakondi, B., Lv, W., Lu, B., Jones, M. K., Tsai, Y., Kim, K. J., Levy, R., Akhtar, A. A., Breunig, J. J., Svendsen, C. N., et al. (2016). In vivo *crispr/cas9* gene editing corrects retinal dystrophy in the *s334ter-3* rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Molecular Therapy*, 24(3):556–563.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Bao, R., Huang, L., Andrade, J., Tan, W., Kibbe, W. A., Jiang, H., and Feng, G. (2014). Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing. *Cancer informatics*, pages 67–83.
- Belkadi, A., Bolze, A., Itan, Y., Cobat, A., Vincent, Q. B., Antipenko, A., Shang, L., Boisson, B., Casanova, J.-L., and Abel, L. (2015). Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(17):5473–5478.
- Benjamini, Y. and Speed, T. P. (2012). Summarizing and correcting the gc content bias in high-throughput sequencing. *Nucleic acids research*, page gks001.
- Berger, W., Kloeckener-Gruissem, B., and Neidhardt, J. (2010). The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Progress in retinal and eye research*, 29(5):335–375.
- Bernal, S., Calaf, M., Adan, A., Solans, T., Valverde, D., Ayuso, C., and Baiget, M. (2001). Evaluation of rbp1 in 50 autosomal recessive retinitis pigmentosa and 4 retinitis punctata albescens spanish families. *Ophthalmic genetics*, 22(1):19–25.
- Blanco-Kelly, F., García-Hoyos, M., Cortón, M., Ávila-Fernández, A., Riveiro-Álvarez, R., Giménez, A., Hernan, I., Carballo, M., and Ayuso, C. (2012). Genotyping microarray: mutation screening in spanish families with autosomal dominant retinitis pigmentosa.
- Blanco-Kelly, F., Jaijo, T., Aller, E., Avila-Fernandez, A., López-Molina, M. I., Giménez, A., García-Sandoval, B., Millán, J. M., and Ayuso, C. (2015). Clinical aspects of usher syndrome and the ush2a gene in a cohort of 433 patients. *JAMA ophthalmology*, 133(2):157–164.
- Blankman, J. L., Long, J. Z., Trauger, S. A., Siuzdak, G., and Cravatt, B. F. (2013). Abhd12 controls brain lysophosphatidylserine pathways that are deregulated in a murine model of the neurodegenerative disease pharc. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(4):1500–1505.
- Blankman, J. L., Simon, G. M., and Cravatt, B. F. (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chemistry & biology*, 14(12):1347–1356.
- Botstein, D. and Risch, N. (2003). Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature genetics*, 33:228–237.
- Branham, K., Othman, M., Brumm, M., Karoukis, A. J., Atmaca-Sonmez, P., Yashar, B. M., Schwartz, S. B., Stover, N. B., Trzuppek, K., Wheaton, D., et al. (2012). Mutations in rpgr and rp2 account for 15% of males with simplex retinal degenerative diseasex-linked mutations in simplex males. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(13):8232–8237.
- Bravo-Gil, N., González-del Pozo, M., Martín-Sánchez, M., Méndez-Vidal, C., Rodríguez-de la Rúa, E., Borrego, S., and Antiñolo, G. (2017). Unravelling the genetic basis of simplex retinitis pigmentosa cases. *Scientific Reports*, 7.
- Brayer, K. J. and Segal, D. J. (2008). Keep your fingers off my dna: protein–protein interactions mediated by c2h2 zinc finger domains. *Cell biochemistry and biophysics*, 50(3):111–131.
- Bujakowska, K. M., Fernandez-Godino, R., Place, E., Consugar, M., Navarro-Gomez, D., White, J., Bedoukian, E. C., Zhu, X., Xie, H. M., Gai, X., et al. (2016). Copy-number variation is an important contributor to the genetic causality of inherited retinal degenerations. *Genetics in Medicine*.
- Caviedes, S. A., Hornillos, J. A. C., and Dacasa, A. G. (1991). *Oftalmología: II*. Universidad de Cantabria, Servicio de Publicaciones.
- Chaki, M., Airik, R., Ghosh, A. K., Giles, R. H., Chen, R., Slaats, G. G., Wang, H., Hurd, T. W., Zhou, W., Cluckey, A., et al. (2012). Exome capture reveals znf423 and cep164 mutations, linking renal ciliopathies to dna damage response signaling. *Cell*, 150(3):533–548.
- Chen, D.-H., Naydenov, A., Blankman, J. L., Mefford, H. C., Davis, M., Sul, Y., Barloon, A. S., Bonkowski, E., Wolff, J., Matsushita, M., et al. (2013a). Two novel mutations in abhd12: expansion of the mutation spectrum in pharc and assessment of their functional effects. *Human mutation*, 34(12):1672–1678.

- Chen, T.-Y., Peng, Y., Dhallan, R., Ahamed, B., Reed, R., and Yau, K. (1993). A new subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel in retinal rods. *Nature*, 362(6422):764.
- Chen, X., Zhao, K., Sheng, X., Li, Y., Gao, X., Zhang, X., Kang, X., Pan, X., Liu, Y., Jiang, C., et al. (2013b). Targeted sequencing of 179 genes associated with hereditary retinal dystrophies and 10 candidate genes identifies novel and known mutations in patients with various retinal diseases identifying novel and recurring hrd-causing mutations. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(3):2186–2197.
- Chiang, C. and Ayyanathan, K. (2013). Snail/gfi-1 (snag) family zinc finger proteins in transcription regulation, chromatin dynamics, cell signaling, development, and disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 24(2):123–131.
- Chiang, J., Lamey, T., McLaren, T., Thompson, J. A., Montgomery, H., and De Roach, J. (2015). Progress and prospects of next-generation sequencing testing for inherited retinal dystrophy. *Expert review of molecular diagnostics*, 15(10):1269–1275.
- Chicca, A., Arena, C., and Manera, C. (2015). Beyond the direct activation of cannabinoid receptors: New strategies to modulate the endocannabinoid system in cns-related diseases. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 10(2):122–141.
- Choi, M., Scholl, U. I., Ji, W., Liu, T., Tikhonova, I. R., Zumbo, P., Nayir, A., Bakkaloğlu, A., Özen, S., Sanjad, S., et al. (2009). Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel dna sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45):19096–19101.
- Cirulli, E. T. and Goldstein, D. B. (2010). Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 11(6):415–425.
- Coin, L. J., Cao, D., Ren, J., Zuo, X., Sun, L., Yang, S., Zhang, X., Cui, Y., Li, Y., Jin, X., et al. (2012). An exome sequencing pipeline for identifying and genotyping common cnvs associated with disease with application to psoriasis. *Bioinformatics*, 28(18):i370–i374.
- Collin, R. W., Nikopoulos, K., Dona, M., Gilissen, C., Hoischen, A., Boonstra, F. N., Poulter, J. A., Kondo, H., Berger, W., Toomes, C., et al. (2013). Znf408 is mutated in familial exudative vitreoretinopathy and is crucial for the development of zebrafish retinal vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24):9856–9861.
- Consugar, M. B., Navarro-Gomez, D., Place, E. M., Bujakowska, K. M., Sousa, M. E., Fonseca-Kelly, Z. D., Taub, D. G., Janessian, M., Wang, D. Y., Au, E. D., et al. (2014). Panel-based genetic diagnostic testing for inherited eye diseases is highly accurate and reproducible, and more sensitive for variant detection, than exome sequencing. *Genetics in Medicine*, 17(4):253–261.
- Coppieters, F., Casteels, I., Meire, F., De Jaegere, S., Hooghe, S., Van Regemorter, N., Van Esch, H., Matulevičienė, A., Nunes, L., Meersschant, V., et al. (2010). Genetic screening of lca in belgium: predominance of cep290 and identification of potential modifier alleles in ah1 of cep290-related phenotypes. *Human mutation*, 31(10):E1709–E1766.
- Corton, M., Ávila-Fernández, A., Campello, L., Sánchez, M., Benavides, B., López-Molina, M. I., Fernández-Sánchez, L., Sánchez-Alcudia, R., Da Silva, L. R. J., Reyes, N., et al. (2016). Identification of the photoreceptor transcriptional co-repressor samd11 as novel cause of autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Scientific reports*, 6.
- Corton, M., Nishiguchi, K. M., Avila-Fernández, A., Nikopoulos, K., Riveiro-Alvarez, R., Tatu, S. D., Ayuso, C., and Rivolta, C. (2013a). Exome sequencing of index patients with retinal dystrophies as a tool for molecular diagnosis. *PloS one*, 8(6):e65574.
- Corton, M., Tatu, S. D., Avila-Fernandez, A., Vallespín, E., Tapias, I., Cantalapiedra, D., Blanco-Kelly, F., Riveiro-Alvarez, R., Bernal, S., García-Sandoval, B., et al. (2013b). High frequency of crb1 mutations as cause of early-onset retinal dystrophies in the spanish population. *Orphanet journal of rare diseases*, 8(1):20.
- Dad, S., Rendtorff, N. D., Kann, E., Albrechtsen, A., Mehrjouy, M. M., Bak, M., Tommerup, N., Tranebjærg, L., Rosenberg, T., Jensen, H., et al. (2015). Partial ush2a deletions contribute to usher syndrome in denmark. *European Journal of Human Genetics*, 23(12):1646–1651.
- Daiger, S., Sullivan, L., and Bowne, S. (2013). Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clinical genetics*, 84(2):132–141.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Davie, K., Jacobs, J., Atkins, M., Potier, D., Christiaens, V., Halder, G., and Aerts, S. (2015). Discovery of transcription factors and regulatory regions driving in vivo tumor development by atac-seq and faire-seq open chromatin profiling. *PLoS genetics*, 11(2):e1004994.
- de Castro-Miró, M., Tonda, R., Escudero-Ferruz, P., Andrés, R., Mayor-Lorenzo, A., Castro, J., Ciccioli, M., Hidalgo, D. A., Rodríguez-Ezcurra, J. J., Farrando, J., et al. (2016). Novel candidate genes and a wide spectrum of structural and point mutations responsible for inherited retinal dystrophies revealed by exome sequencing. *PLoS one*, 11(12):e0168966.
- DeLuca, A. P., Whitmore, S. S., Barnes, J., Sharma, T. P., Westfall, T. A., Scott, C. A., Weed, M. C., Wiley, J. S., Wiley, L. A., Johnston, R. M., et al. (2016). Hypomorphic mutations in *trnt1* cause retinitis pigmentosa with erythrocytic microcytosis. *Human molecular genetics*, 25(1):44–56.
- den Hollander, A. I., Black, A., Bennett, J., and Cremers, F. P. (2010). Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. *The Journal of clinical investigation*, 120(9):3042–3053.
- Derrington, I. M., Butler, T. Z., Collins, M. D., Manrao, E., Pavlenok, M., Niederweis, M., and Gundlach, J. H. (2010). Nanopore dna sequencing with mspa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(37):16060–16065.
- Deterre, P., Pfister, C., Bigay, J., and Chabre, M. (1987). The retinal phototransduction process: enzymatic cascade and regulation. *Biochimie*, 69(4):365–370.
- Dryja, T. and Li, T. (1995). Molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Human Molecular Genetics*, 4(suppl 1):1739–1743.
- Duncan, J., Bernstein, P., Birch, D., Fishman, G., Heon, E., Jacobson, S., Pennesi, M., Pierce, E., School, H., Stone, E., Trzupke, K., and Weleber, R. (2016). Recommendations on clinical assessment of patients with inherited retinal degenerations. *American Academy of Ophthalmology*.
- Ebert, S., Weigelt, K., Walczak, Y., Drobniak, W., Mauerer, R., Hume, D. A., Weber, B. H., and Langmann, T. (2009). Docosahexaenoic acid attenuates microglial activation and delays early retinal degeneration. *Journal of neurochemistry*, 110(6):1863–1875.
- Ehmann, D., Shahlaee, A., and Ho, A. C. (2016). Cell therapy for retinal disease. *Current opinion in ophthalmology*, 27(3):185–190.
- Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B., et al. (2009). Real-time dna sequencing from single polymerase molecules. *Science*, 323(5910):133–138.
- Eisenberger, T., Neuhaus, C., Khan, A. O., Decker, C., Preising, M. N., Friedburg, C., Bieg, A., Gliem, M., Issa, P. C., Holz, F. G., et al. (2013). Increasing the yield in targeted next-generation sequencing by implicating cnv analysis, non-coding exons and the overall variant load: the example of retinal dystrophies. *PLoS one*, 8(11):e78496.
- Eisenberger, T., Slim, R., Mansour, A., Nauck, M., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Decker, C., Dafinger, C., Ebermann, I., Bergmann, C., et al. (2012). Targeted next-generation sequencing identifies a homozygous nonsense mutation in *abhd12*, the gene underlying *pharc*, in a family clinically diagnosed with usher syndrome type 3. *Orphanet journal of rare diseases*, 7(1):59.
- El-Aziz, M. M. A., Barragan, I., O’Driscoll, C. A., Goodstadt, L., Prigmore, E., Borrego, S., Mena, M., Pieras, J. I., El-Ashry, M. F., Safieh, L. A., et al. (2008). *Eys*, encoding an ortholog of *drosophila* spacemaker, is mutated in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nature genetics*, 40(11):1285–1287.
- Ellingford, J. M., Barton, S., Bhaskar, S., Williams, S. G., Sergouniotis, P. I., O’Sullivan, J., Lamb, J. A., Perveen, R., Hall, G., Newman, W. G., et al. (2016). Whole genome sequencing increases molecular diagnostic yield compared with current diagnostic testing for inherited retinal disease. *Ophthalmology*, 123(5):1143–1150.
- Feng, Y., Zhang, Y., Ying, C., Wang, D., and Du, C. (2015). Nanopore-based fourth-generation dna sequencing technology. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 13(1):4–16.
- Fernandez-San Jose, P., Blanco-Kelly, F., Corton, M., Trujillo-Tiebas, M.-J., Gimenez, A., Avila-Fernandez, A., Garcia-Sandoval, B., Lopez-Molina, M.-I., Hernan, I., Carballo, M., Riveiro-Alvarez, R., and Ayuso, C. (2015a). Prevalence of rhodopsin mutations in autosomal dominant retinitis pigmentosa in spain: clinical and analytical review in 200 families. *Acta Ophthalmologica*, 93(1):e38–e44.

- Fernandez-San Jose, P., Corton, M., Blanco-Kelly, F., Avila-Fernandez, A., Lopez-Martinez, M. A., Sanchez-Navarro, I., Sanchez-Alcudia, R., Perez-Carro, R., Zurita, O., Sanchez-Bolivar, N., et al. (2015b). Targeted next-generation sequencing improves the diagnosis of autosomal dominant retinitis pigmentosa in spanish patients. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(4):2173–2182.
- Ferrari, S., Di Iorio, E., Barbaro, V., Ponzin, D., Sorrentino, F., and Parmeggiani, F. (2011). Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Current genomics*, 12(4):238–249.
- Fiskerstrand, T., Brahim, D. H.-B., Johansson, S., M'zahem, A., Haukanes, B. I., Drouot, N., Zimmermann, J., Cole, A. J., Vedeler, C., Bredrup, C., et al. (2010). Mutations in *abhd12* cause the neurodegenerative disease pharc: An inborn error of endocannabinoid metabolism. *The American Journal of Human Genetics*, 87(3):410–417.
- Fu, Q., Wang, F., Wang, H., Xu, F., Zaneveld, J. E., Ren, H., Keser, V., Lopez, I., Tuan, H.-F., Salvo, J. S., et al. (2013). Next-generation sequencing-based molecular diagnosis of a chinese patient cohort with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(6):4158–4166.
- Gambin, T., Akdemir, Z. C., Yuan, B., Gu, S., Chiang, T., Carvalho, C. M., Shaw, C., Jhangiani, S., Boone, P. M., Eldomery, M. K., et al. (2016). Homozygous and hemizygous cnv detection from exome sequencing data in a mendelian disease cohort. *Nucleic Acids Research*, page gkw1237.
- García-García, G., Aller, E., Jaijo, T., Aparisi, M. J., Larrieu, L., Faugère, V., Blanco-Kelly, F., Ayuso, C., Roux, A.-F., and Millán, J. M. (2014). Novel deletions involving the *ush2a* gene in patients with usher syndrome and retinitis pigmentosa. *Molecular vision*, 20:1398.
- García-Hoyos, M., Garcia-Sandoval, B., Cantalapiedra, D., Riveiro, R., Lorda-Sánchez, I., Trujillo-Tiebas, M. J., de Alba, M. R., Millan, J. M., Baiget, M., Ramos, C., et al. (2006). Mutational screening of the *rp2* and *rpgr* genes in spanish families with x-linked retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(9):3777–3782.
- Gehrig, A., Langmann, T., Horling, F., Janssen, A., Bonin, M., Walter, M., Poths, S., and Weber, B. H. (2007). Genome-wide expression profiling of the retinoschisin-deficient retina in early postnatal mouse development. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(2):891–900.
- Gilissen, C., Hehir-Kwa, J. Y., Thung, D. T., van de Vorst, M., van Bon, B. W., Willemsen, M. H., Kwint, M., Janssen, I. M., Hoischen, A., Schenck, A., et al. (2014). Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*.
- Glöckle, N., Kohl, S., Mohr, J., Scheurenbrand, T., Sprecher, A., Weisschuh, N., Bernd, A., Rudolph, G., Schubach, M., Poloschek, C., et al. (2014). Panel-based next generation sequencing as a reliable and efficient technique to detect mutations in unselected patients with retinal dystrophies. *European Journal of Human Genetics*, 22(1):99–104.
- González-del Pozo, M., Méndez-Vidal, C., Bravo-Gil, N., Vela-Boza, A., Dopazo, J., Borrego, S., and Antinolo, G. (2014). Exome sequencing reveals novel and recurrent mutations with clinical significance in inherited retinal dystrophies. *PLoS one*, 9(12):e116176.
- Goodwin, S., McPherson, J. D., and McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6):333–351.
- Grossniklaus, H. E., Geisert, E. E., and Nickerson, J. M. (2015). Chapter twenty-two - introduction to the retina. In Hejtmancik, J. F. and Nickerson, J. M., editors, *Molecular Biology of Eye Disease*, volume 134 of *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, pages 383 – 396. Academic Press.
- Guadagni, V., Novelli, E., Piano, I., Gargini, C., and Strettoi, E. (2015). Pharmacological approaches to retinitis pigmentosa: a laboratory perspective. *Progress in retinal and eye research*, 48:62–81.
- Habibi, I., Chebil, A., Kort, F., Munier, F., Schorderet, D., and El Matri, L. (2015). Exome sequencing confirms *znf408* mutations as a cause of familial retinitis pigmentosa. *Acta Ophthalmologica*, 93(S255).
- Haer-Wigman, L., Newman, H., Leibur, R., Bax, N. M., Baris, H. N., Rizel, L., Banin, E., Massarweh, A., Roosing, S., Lefeber, D. J., et al. (2015). Non-syndromic retinitis pigmentosa due to mutations in the mucopolysaccharidosis type iiic gene, heparan-alpha-glucosaminide n-acetyltransferase (*hgsnat*). *Human molecular genetics*, page ddv118.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Hanchate, N. K., Kondoh, K., Lu, Z., Kuang, D., Ye, X., Qiu, X., Pachter, L., Trapnell, C., and Buck, L. B. (2015). Single-cell transcriptomics reveals receptor transformations during olfactory neurogenesis. *Science*, 350(6265):1251–1255.
- Hehir-Kwa, J. Y., Pfundt, R., and Veltman, J. A. (2015). Exome sequencing and whole genome sequencing for the detection of copy number variation. *Expert review of molecular diagnostics*, 15(8):1023–1032.
- Hehir-Kwa, J. Y., Wieskamp, N., Webber, C., Pfundt, R., Brunner, H. G., Gilissen, C., de Vries, B. B., Ponting, C. P., and Veltman, J. A. (2010). Accurate distinction of pathogenic from benign cnvs in mental retardation. *PLoS Comput Biol*, 6(4):e1000752.
- Henriksen, B. S., Marc, R. E., and Bernstein, P. S. (2014). Optogenetics for retinal disorders. *Journal of ophthalmic & vision research*, 9(3):374.
- Hodges, E., Xuan, Z., Balija, V., Kramer, M., Molla, M. N., Smith, S. W., Middle, C. M., Rodesch, M. J., Albert, T. J., Hannon, G. J., et al. (2007). Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing. *Nature genetics*, 39(12):1522–1527.
- Hrdlickova, R., Toloue, M., and Tian, B. (2017). Rna-seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 8(1).
- Huang, S. H., Pittler, S. J., Huang, X., Oliveira, L., Berson, E. L., and Dryja, T. P. (1995). Autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the  $\alpha$  subunit of rod cgmp phosphodiesterase. *Nature genetics*, 11(4):468–471.
- Huang, X.-F., Wu, J., Lv, J.-N., Zhang, X., and Jin, Z.-B. (2015). Identification of false-negative mutations missed by next-generation sequencing in retinitis pigmentosa patients: a complementary approach to clinical genetic diagnostic testing. *Genetics in Medicine*, 17(4):307–311.
- Humphries, P., Farrar, G. J., Kenna, P., and McWilliam, P. (1990). Retinitis pigmentosa: genetic mapping in x-linked and autosomal forms of the disease. *Clinical genetics*, 38(1):1–13.
- Iafraite, A. J., Feuk, L., Rivera, M. N., Listewnik, M. L., Donahoe, P. K., Qi, Y., Scherer, S. W., and Lee, C. (2004). Detection of large-scale variation in the human genome. *Nature genetics*, 36(9):949–951.
- Iuchi, S. (2001). Three classes of c 2 h 2 zinc finger proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(4):625–635.
- Jenuwein, T., Laible, G., Dorn, R., and Reuter, G. (1998). Set domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54(1):80–93.
- Jin, Z.-B., Mandai, M., Homma, K., Ishigami, C., Hiram, Y., Nao-i, N., and Takahashi, M. (2008). Allelic copy number variation in fscn2 detected using allele-specific genotyping and multiplex real-time pcrs. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(9):3799–3805.
- Jinda, W., Taylor, T. D., Suzuki, Y., Thongnoppakhun, W., Limwongse, C., Lertrit, P., Suriyaphol, P., Trinavarat, A., and Atchaneeyasakul, L.-o. (2014). Whole exome sequencing in thai patients with retinitis pigmentosa reveals novel mutations in six genes whole exome sequencing in thai rp patients. *Investigative ophthalmology & visual science*, 55(4):2259–2268.
- Joly, S., Francke, M., Ulbricht, E., Beck, S., Seeliger, M., Hirrlinger, P., Hirrlinger, J., Lang, K. S., Zinkernagel, M., Odermatt, B., et al. (2009). Cooperative phagocytes: resident microglia and bone marrow immigrants remove dead photoreceptors in retinal lesions. *The American journal of pathology*, 174(6):2310–2323.
- Kadalayil, L., Rafiq, S., Rose-Zerilli, M. J., Pengelly, R. J., Parker, H., Oscier, D., Strefford, J. C., Tapper, W. J., Gibson, J., Ennis, S., et al. (2014). Exome sequence read depth methods for identifying copy number changes. *Briefings in bioinformatics*, page bbu027.
- Kalia, S. S., Adelman, K., Bale, S. J., Chung, W. K., Eng, C., Evans, J. P., Herman, G. E., Hufnagel, S. B., Klein, T. E., Korf, B. R., et al. (2016). Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (acmg sf v2. 0): a policy statement of the american college of medical genetics and genomics. *Genetics in Medicine*.



- Kamat, S. S., Camara, K., Parsons, W. H., Chen, D.-H., Dix, M. M., Bird, T. D., Howell, A. R., and Cravatt, B. F. (2015). Immunomodulatory lysophosphatidylserines are regulated by abhd16a and abhd12 interplay. *Nature chemical biology*, 11(2):164–171.
- Kanski, J. J. and Bowling, B. (2011). *Clinical ophthalmology: a systematic approach*. Elsevier Health Sciences.
- Karlstetter, M., Ebert, S., and Langmann, T. (2010). Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models. *Immunobiology*, 215(9):685–691.
- Kastner, S., Thiemann, I.-J., Dekomien, G., Petrasch-Parwez, E., Schreiber, S., Akkad, D. A., Gerding, W. M., Hoffjan, S., Güneş, S., Güneş, S., et al. (2015). Exome sequencing reveals agbl5 as novel candidate gene and additional variants for retinitis pigmentosa in five turkish familiesexome sequencing in rp patients. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(13):8045–8053.
- Ke, R., Mignardi, M., Hauling, T., and Nilsson, M. (2016). 4th generation of ngs technologies: Promise and consequences. *Human Mutation*.
- Khanna, H., Davis, E. E., Murga-Zamalloa, C. A., Estrada-Cuzcano, A., Lopez, I., den Hollander, A. I., Zonneveld, M. N., Othman, M. I., Waseem, N., Chakarova, C. F., et al. (2009). A common allele in rpgrip1l is a modifier of retinal degeneration in ciliopathies. *Nature genetics*, 41(6):739–745.
- Khateb, S., Hanany, M., Khalaileh, A., Beryozkin, A., Meyer, S., Abu-Diab, A., Turkey, F. A., Mizrahi-Meissonnier, L., Lieberman, S., Ben-Yosef, T., et al. (2016). Identification of genomic deletions causing inherited retinal degenerations by coverage analysis of whole exome sequencing data. *Journal of medical genetics*, 53(9):600–607.
- Kiser, P. D., Golczak, M., and Palczewski, K. (2013). Chemistry of the retinoid (visual) cycle. *Chemical reviews*, 114(1):194–232.
- Kozarewa, I., Armisen, J., Gardner, A. F., Slatko, B. E., and Hendrickson, C. (2015). Overview of target enrichment strategies. *Current protocols in molecular biology*, pages 7–21.
- Krivanek, O. L., Chisholm, M. F., Nicolosi, V., Pennycook, T. J., Corbin, G. J., Dellby, N., Murfitt, M. F., Own, C. S., Szilagy, Z. S., Oxley, M. P., et al. (2010). Atom-by-atom structural and chemical analysis by annular dark-field electron microscopy. *Nature*, 464(7288):571–574.
- Laird, P. W. (2010). Principles and challenges of genome-wide dna methylation analysis. *Nature Reviews Genetics*, 11(3):191–203.
- Lamari, F., Mochel, F., and Saudubray, J.-M. (2015). An overview of inborn errors of complex lipid biosynthesis and remodelling. *Journal of inherited metabolic disease*, 38(1):3–18.
- Lavezzo, E., Barzon, L., Toppo, S., and Palù, G. (2016). Third generation sequencing technologies applied to diagnostic microbiology: benefits and challenges in applications and data analysis. *Expert review of molecular diagnostics*, 16(9):1011–1023.
- Lelieveld, S. H., Spielmann, M., Mundlos, S., Veltman, J. A., and Gilissen, C. (2015). Comparison of exome and genome sequencing technologies for the complete capture of protein-coding regions. *Human mutation*, 36(8):815–822.
- Lelieveld, S. H., Veltman, J. A., and Gilissen, C. (2016). Novel bioinformatic developments for exome sequencing. *Human genetics*, 135(6):603–614.
- Li, J., Tang, J., Feng, Y., Xu, M., Chen, R., Zou, X., Sui, R., Chang, E. Y., Lewis, R. A., Zhang, V. W., et al. (2016). Improved diagnosis of inherited retinal dystrophies by high-fidelity pcr of orf15 followed by next-generation sequencing. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 18(6):817–824.
- Li, L., Nakaya, N., Chavali, V. R., Ma, Z., Jiao, X., Sieving, P. A., Riazuddin, S., Tomarev, S. I., Ayyagari, R., Riazuddin, S. A., et al. (2010). A mutation in znf513, a putative regulator of photoreceptor development, causes autosomal-recessive retinitis pigmentosa. *The American Journal of Human Genetics*, 87(3):400–409.
- Luan, B., Peng, H., Polonsky, S., Rossmagel, S., Stolovitzky, G., and Martyna, G. (2010). Base-by-base ratcheting of single stranded dna through a solid-state nanopore. *Physical review letters*, 104(23):238103.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Lupski, J. R. (2007). Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nature genetics*, 39:S43–S47.
- MacArthur, D., Manolio, T., Dimmock, D., Rehm, H., Shendure, J., Abecasis, G., Adams, D., Altman, R., Antonarakis, S., Ashley, E., et al. (2014). Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature*, 508(7497):469–476.
- MacLaren, R. E., Groppe, M., Barnard, A. R., Cottrill, C. L., Tolmachova, T., Seymour, L., Clark, K. R., During, M. J., Cremers, F. P., Black, G. C., et al. (2014). Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *The Lancet*, 383(9923):1129–1137.
- Mamanova, L., Coffey, A. J., Scott, C. E., Kozarewa, I., Turner, E. H., Kumar, A., Howard, E., Shendure, J., and Turner, D. J. (2010). Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nature methods*, 7(2):111–118.
- Mardis, E. R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in genetics*, 24(3):133–141.
- Marmor, M. F., Aguirre, G., Arden, G., Berson, E., Birch, D. G., Boughman, J. A., Carr, R., Chatrjian, G. E., Del Monte, M., Dowling, J., et al. (1983). Retinitis pigmentosa: a symposium on terminology and methods of examination. *Ophthalmology*, 90(2):126–131.
- Martin-Merida, I., Sanchez-Alcudia, R., Fernandez-San Jose, P., Blanco-Kelly, F., Perez-Carro, R., da Silva, L. R.-J., Almoguera, B., Garcia-Sandoval, B., Lopez-Molina, M. I., Avila-Fernandez, A., et al. (2017). Analysis of the prpf31 gene in spanish autosomal dominant retinitis pigmentosa patients: A novel genomic rearrangement analysis of the prpf31 gene: A novel genomic rearrangement. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(2):1045–1053.
- Masland, R. H. (2001). The fundamental plan of the retina. *Nature neuroscience*, 4(9):877–886.
- Matthijs, G., Souche, E., Alders, M., Corveleyn, A., Eck, S., Feenstra, I., Race, V., Sijm, A., Stur, M., Weiss, M., et al. (2016). Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *European Journal of Human Genetics*, 24(1):2–5.
- McLaughlin, M. E., Sandberg, M. A., Berson, E. L., and Dryja, T. P. (1993). Recessive mutations in the gene encoding the  $\beta$ -subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nature genetics*, 4(2):130–134.
- Méndez-Vidal, C., González-del Pozo, M., Vela-Boza, A., Santoyo-López, J., López-Domingo, F. J., Vázquez-Marouschek, C., Dopazo, J., Borrego, S., and Antiñolo, G. (2013). Whole-exome sequencing identifies novel compound heterozygous mutations in *ush2a* in spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa.
- Millán, J. M., Aller, E., Jaijo, T., Blanco-Kelly, F., Gimenez-Pardo, A., and Ayuso, C. (2011). An update on the genetics of usher syndrome. *Journal of ophthalmology*, 2011.
- Müller, B. and Peichl, L. (1989). Topography of cones and rods in the tree shrew retina. *Journal of Comparative Neurology*, 282(4):581–594.
- Murataeva, N., Straiker, A., and Mackie, K. (2014). Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *British journal of pharmacology*, 171(6):1379–1391.
- Musada, G. R., Syed, H., Jalali, S., Chakrabarti, S., and Kaur, I. (2016). Mutation spectrum of the *fzd-4*, *tspan12* and *znf408* genes in indian fevr patients. *BMC ophthalmology*, 16(1):90.
- Nakato, R. and Shirahige, K. (2016). Recent advances in chip-seq analysis: from quality management to whole-genome annotation. *Briefings in bioinformatics*, page bbw023.
- Nash, B. M., Wright, D. C., Grigg, J. R., Bennetts, B., and Jamieson, R. V. (2015). Retinal dystrophies, genomic applications in diagnosis and prospects for therapy. *Translational pediatrics*, 4(2):139.
- Navia-Paldanius, D., Savinainen, J. R., and Laitinen, J. T. (2012). Biochemical and pharmacological characterization of human  $\alpha/\beta$ -hydrolase domain containing 6 (*abhd6*) and 12 (*abhd12*). *Journal of lipid research*, 53(11):2413–2424.
- Neveling, K., Collin, R. W., Gilissen, C., van Huet, R. A., Visser, L., Kwint, M. P., Gijzen, S. J., Zonneveld, M. N., Wiskamp, N., de Ligt, J., et al. (2012). Next-generation genetic testing for retinitis pigmentosa. *Human mutation*, 33(6):963–972.

- Newman, E. and Reichenbach, A. (1996). The müller cell: a functional element of the retina. *Trends in neurosciences*, 19(8):307–312.
- Nicoletti, A., Wong, D. J., Kawase, K., Gibson, L. H., Yang-Feng, T. L., Richards, J. E., and Thompson, D. A. (1995). Molecular characterization of the human gene encoding an abundant 61 kda protein specific to the retinal pigment epithelium. *Human molecular genetics*, 4(4):641–649.
- Nikopoulos, K., Avila-Fernandez, A., Corton, M., Lopez-Molina, M. I., Perez-Carro, R., Bontadelli, L., Di Gioia, S. A., Zurita, O., Garcia-Sandoval, B., Rivolta, C., et al. (2015). Identification of two novel mutations in *cdhr1* in consanguineous spanish families with autosomal recessive retinal dystrophy. *Scientific reports*, 5:13902.
- Nishiguchi, K. M. and Rivolta, C. (2012). Genes associated with retinitis pigmentosa and allied diseases are frequently mutated in the general population. *PLoS One*, 7(7):e41902.
- Pabinger, S., Dander, A., Fischer, M., Snajder, R., Sperk, M., Efremova, M., Krabichler, B., Speicher, M. R., Zschocke, J., and Trajanoski, Z. (2014). A survey of tools for variant analysis of next-generation genome sequencing data. *Briefings in bioinformatics*, 15(2):256–278.
- Paloma, E., Hjelmqvist, L., Bayés, M., García-Sandoval, B., Ayuso, C., Balcells, S., and Gonzalez-Duarte, R. (2000). Novel mutations in the *tulp1* gene causing autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(3):656–659.
- Park, P. J. (2009). Chip-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nature Reviews Genetics*, 10(10):669–680.
- Parkkari, T., Haavikko, R., Laitinen, T., Navia-Paldanius, D., Ryttilahti, R., Vaara, M., Lehtonen, M., Alakurtti, S., Yli-Kauhaluoma, J., Nevalainen, T., et al. (2014). Discovery of triterpenoids as reversible inhibitors of  $\alpha/\beta$ -hydrolase domain containing 12 (*abhd12*). *PLoS one*, 9(5):e98286.
- Pearson, R., Funnell, A. P., and Crossley, M. (2011). The mammalian zinc finger transcription factor krüppel-like factor 3 (*klf3/bklf*). *IUBMB life*, 63(2):86–93.
- Peng, B., Xiao, J., Wang, K., So, K.-F., Tipoe, G. L., and Lin, B. (2014). Suppression of microglial activation is neuroprotective in a mouse model of human retinitis pigmentosa. *Journal of Neuroscience*, 34(24):8139–8150.
- Petersen, B.-S., Fredrich, B., Hoepfner, M. P., Ellinghaus, D., and Franke, A. (2017). Opportunities and challenges of whole-genome and-exome sequencing. *BMC genetics*, 18(1):14.
- Pieras, J. I., Barragán, I., Borrego, S., Audo, I., González-Del Pozo, M., Bernal, S., Baiget, M., Zeitz, C., Bhattacharya, S. S., and Antiñolo, G. (2011). Copy-number variations in *eyes*: a significant event in the appearance of *arrp*. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(8):5625–5631.
- Poultney, C. S., Goldberg, A. P., Drapeau, E., Kou, Y., Harony-Nicolas, H., Kajiwar, Y., De Rubeis, S., Durand, S., Stevens, C., Rehnström, K., et al. (2013). Identification of small exonic *cnv* from whole-exome sequence data and application to autism spectrum disorder. *The American Journal of Human Genetics*, 93(4):607–619.
- Pulido, J. S. (2002). *Retina, Choroid, and Vitreous*. Mosby Incorporated.
- Ramón y Cajal, S. (1893). *La retina des vertébrés*. Typ. de Joseph van In & Cie.
- Razin, S., Borunova, V., Maksimenko, O., and Kantidze, O. (2012). *Cys2his2* zinc finger protein family: classification, functions, and major members. *Biochemistry (Moscow)*, 77(3):217–226.
- Rhoads, A. and Au, K. F. (2015). Pacbio sequencing and its applications. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 13(5):278–289.
- Riera, M., Navarro, R., Ruiz-Nogales, S., Méndez, P., Burés-Jelstrup, A., Corcóstequi, B., and Pomares, E. (2017). Whole exome sequencing using ion proton system enables reliable genetic diagnosis of inherited retinal dystrophies. *Scientific Reports*, 7.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Riveiro-Alvarez, R., Lopez-Martinez, M.-A., Zernant, J., Aguirre-Lamban, J., Cantalapiedra, D., Avila-Fernandez, A., Gimenez, A., Lopez-Molina, M.-I., Garcia-Sandoval, B., Blanco-Kelly, F., et al. (2013). Outcome of *abca4* disease-associated alleles in autosomal recessive retinal dystrophies: retrospective analysis in 420 spanish families. *Ophthalmology*, 120(11):2332–2337.
- Rivolta, C., Sharon, D., DeAngelis, M. M., and Dryja, T. P. (2002). Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Human molecular genetics*, 11(10):1219–1227.
- Rizzo, S., Belting, C., Cinelli, L., Allegrini, L., Genovesi-Ebert, F., Barca, F., and Di Bartolo, E. (2014). The argus ii retinal prosthesis: 12-month outcomes from a single-study center. *American journal of ophthalmology*, 157(6):1282–1290.
- Roche, S. L., Wyse-Jackson, A. C., Gómez-Vicente, V., Lax, P., Ruiz-Lopez, A. M., Byrne, A. M., Cuenca, N., and Cotter, T. G. (2016). Progesterone attenuates microglial-driven retinal degeneration and stimulates protective fractalkine-cx3cr1 signaling. *PLoS one*, 11(11):e0165197.
- Roosing, S., van den Born, L. I., Sangermano, R., Banfi, S., Koenekoop, R. K., Zonneveld-Vrieling, M. N., Klaver, C. C., van Lith-Verhoeven, J. J., Cremers, F. P., den Hollander, A. I., et al. (2015). Mutations in *mfsd8*, encoding a lysosomal membrane protein, are associated with nonsyndromic autosomal recessive macular dystrophy. *Ophthalmology*, 122(1):170–179.
- Ruiz, A., Borrego, S., Marcos, I., and Antinolo, G. (1998). A major locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa on 6q, determined by homozygosity mapping of chromosomal regions that contain gamma-aminobutyric acid-receptor clusters. *The American Journal of Human Genetics*, 62(6):1452–1459.
- Sahel, J.-A. and Roska, B. (2013). Gene therapy for blindness. *Annual review of neuroscience*, 36:467–488.
- Salvo, J., Lyubasyuk, V., Xu, M., Wang, H., Wang, F., Nguyen, D., Wang, K., Luo, H., Wen, C., Shi, C., et al. (2015). Next-generation sequencing and novel variant determination in a cohort of 92 familial exudative vitreoretinopathy patients/next-generation sequencing/variant determination. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(3):1937–1946.
- Sánchez-Alcudia, R., Cortón, M., Ávila-Fernández, A., Zurita, O., Tatu, S. D., Pérez-Carro, R., Fernandez-San Jose, P., Lopez-Martinez, M. Á., del Castillo, F. J., Millan, J. M., et al. (2014). Contribution of mutation load to the intrafamilial genetic heterogeneity in a large cohort of spanish retinal dystrophies families/rd intrafamilial genetic heterogeneity. *Investigative ophthalmology & visual science*, 55(11):7562–7571.
- Savinainen, J. R., Navia-Paldanius, D., and Laitinen, J. T. (2016). A sensitive and versatile fluorescent activity assay for *abhd12*. *Endocannabinoid Signaling: Methods and Protocols*, pages 179–189.
- Schadt, E. E., Turner, S., and Kasarskis, A. (2010). A window into third-generation sequencing. *Human molecular genetics*, 19(R2):R227–R240.
- Schuetz, E. and Thanos, S. (2004). Microglia-targeted pharmacotherapy in retinal neurodegenerative diseases. *Current drug targets*, 5(7):619–627.
- Sharon, D., Sandberg, M. A., Rabe, V. W., Stillberger, M., Dryja, T. P., and Berson, E. L. (2003). *Rp2* and *rpgr* mutations and clinical correlations in patients with x-linked retinitis pigmentosa. *The American Journal of Human Genetics*, 73(5):1131–1146.
- Shearer, A. E., Eppsteiner, R. W., Booth, K. T., Ephraim, S. S., Gurrola, J., Simpson, A., Black-Ziegelbein, E. A., Joshi, S., Ravi, H., Giuffre, A. C., et al. (2014). Utilizing ethnic-specific differences in minor allele frequency to recategorize reported pathogenic deafness variants. *The American Journal of Human Genetics*, 95(4):445–453.
- Shevach, E., Ali, M., Mizrahi-Meissonnier, L., McKibbin, M., El-Asrag, M., Watson, C. M., Inglehearn, C. F., Ben-Yosef, T., Blumenfeld, A., Jalas, C., et al. (2015). Association between missense mutations in the *bbs2* gene and nonsyndromic retinitis pigmentosa. *JAMA ophthalmology*, 133(3):312–318.
- Siemiakowska, A. M., Astuti, G., Arimadyo, K., den Hollander, A. I., Faradz, S., Cremers, F., and Collin, R. (2012). Identification of a novel nonsense mutation in *rpl1* that causes autosomal recessive retinitis pigmentosa in an indonesian family.

- Soto, J., Rodriguez-Antolin, C., Vallespín, E., de Castro Carpeño, J., and de Caceres, I. I. (2016). The impact of next-generation sequencing on the dna methylation-based translational cancer research. *Translational Research*, 169:1–18.
- Steele-Stallard, H. B., Stabej, P. L. Q., Lenassi, E., Luxon, L. M., Claustres, M., Roux, A.-F., Webster, A. R., and Bitner-Glindzicz, M. (2013). Screening for duplications, deletions and a common intronic mutation detects 35% of second mutations in patients with ush2a monoallelic mutations on sanger sequencing. *Orphanet journal of rare diseases*, 8(1):122.
- Stephen, J. R., Andrew P, S., Charles P, W., David, R. H., Srinivas, R. S., and Peter, W. (2014). *Retina* (5th edition).
- Sterling, P., Cohen, E., Freed, M. A., and Smith, R. G. (1987). Microcircuitry of the on-beta ganglion cell in daylight, twilight, and starlight. *Neuroscience Research Supplements*, 6:S269–S285.
- Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Hernandez-Benitez, R., Wu, J., Zhu, J., Kim, E. J., Hatanaka, F., Yamamoto, M., Araoka, T., Li, Z., et al. (2016). In vivo genome editing via crispr/cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, 540(7631):144–149.
- Tattini, L., D’Aurizio, R., and Magi, A. (2015). Detection of genomic structural variants from next-generation sequencing data. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3:92.
- Thiesen, H.-J. and Bach, C. (1993). Dna recognition of c2h2 zinc-finger proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 684(1):246–249.
- Tingaud-Sequeira, A., Raldúa, D., Lavie, J., Mathieu, G., Bordier, M., Knoll-Gellida, A., Rambeau, P., Couprie, I., André, M., Malm, E., et al. (2017). Functional validation of abhd12 mutations in the neurodegenerative disease pharc. *Neurobiology of disease*, 98:36–51.
- Urtubia Vicario, C. (1999). *Neurobiología de la visión*, volume 51. Universitat Politècnica de Catalunya. Iniciativa Digital Politècnica.
- Van Cauwenbergh, C., Van Schil, K., Cannoodt, R., Bauwens, M., Van Laethem, T., De Jaegere, S., Steyaert, W., Sante, T., Menten, B., Leroy, B. P., et al. (2016). arrey: a customized platform for high-resolution copy number analysis of coding and noncoding regions of known and candidate retinal dystrophy genes and retinal noncoding rnas. *Genetics in Medicine*.
- van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., and Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics*, 30(9):418–426.
- van Huet, R. A., Pierrache, L., Meester-Smoor, M. A., Klaver, C., van den Born, L. I., Hoyng, C. B., de Wijs, I. J., Collin, R. W., Hoefslot, L. H., and Klevering, B. J. (2015). The efficacy of microarray screening for autosomal recessive retinitis pigmentosa in routine clinical practice.
- van Wijk, E., Pennings, R. J., te Brinke, H., Claassen, A., Yntema, H. G., Hoefslot, L. H., Cremers, F. P., Cremers, C. W., and Kremer, H. (2004). Identification of 51 novel exons of the usher syndrome type 2a (ush2a) gene that encode multiple conserved functional domains and that are mutated in patients with usher syndrome type ii. *The American Journal of Human Genetics*, 74(4):738–744.
- Voelkerding, K. V., Dames, S. A., and Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical chemistry*, 55(4):641–658.
- Wang, F., Li, H., Xu, M., Li, H., Zhao, L., Yang, L., Zaneveld, J. E., Wang, K., Li, Y., Sui, R., et al. (2015). A homozygous missense mutation in neurod1 is associated with nonsyndromic autosomal recessive retinitis pigmentosamissense mutation in neurod1 associated with arrp. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(1):150–155.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009). Rna-seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10(1):57–63.
- Wert, K. J., Lin, J. H., and Tsang, S. H. (2014). General pathophysiology in retinal degeneration. In *Cell-Based Therapy for Retinal Degenerative Disease*, volume 53, pages 33–43. Karger Publishers.
- Wortmann, S. B., Espeel, M., Almeida, L., Reimer, A., Bosboom, D., Roels, F., de Brouwer, A. P., and Wevers, R. A. (2015). Inborn errors of metabolism in the biosynthesis and remodelling of phospholipids. *Journal of inherited metabolic disease*, 38(1):99–110.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Wright, A. F., Chakarova, C. F., El-Aziz, M. M. A., and Bhattacharya, S. S. (2010). Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nature Reviews Genetics*, 11(4):273–284.
- Xu, M., Yamada, T., Sun, Z., Eblimit, A., Lopez, I., Wang, F., Many, H., Xu, S., Zhao, L., Li, Y., et al. (2016). Mutations in *pomgnt1* cause non-syndromic retinitis pigmentosa. *Human molecular genetics*, page ddw022.
- Xu, Y., Guan, L., Shen, T., Zhang, J., Xiao, X., Jiang, H., Li, S., Yang, J., Jia, X., Yin, Y., et al. (2014). Mutations of 60 known causative genes in 157 families with retinitis pigmentosa based on exome sequencing. *Human genetics*, 133(10):1255–1271.
- Yoshimura, H., Hashimoto, T., Murata, T., Fukushima, K., Sugaya, A., Nishio, S.-y., and Usami, S.-i. (2015). Novel *abhd12* mutations in pharc patients the differential diagnosis of deaf-blindness. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, 124(1 suppl):77S–83S.
- Young, R. W. and Bok, D. (1969). Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *The Journal of cell biology*, 42(2):392–403.
- Zazo-Seco, C., Wesdorp, M., Feenstra, I., Pfundt, R., Hehir-Kwa, J. Y., Lelieveld, S. H., Castelein, S., Gilissen, C., de Wijs, I. J., Admiraal, R. J., et al. (2017). The diagnostic yield of whole-exome sequencing targeting a gene panel for hearing impairment in the netherlands. *European Journal of Human Genetics*, 25(3):308–314.
- Zhang, F., Gu, W., Hurles, M. E., and Lupski, J. R. (2009). Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annual review of genomics and human genetics*, 10:451–481.
- Zhao, L., Wang, F., Wang, H., Li, Y., Alexander, S., Wang, K., Willoughby, C. E., Zaneveld, J. E., Jiang, L., Soens, Z. T., et al. (2015a). Next-generation sequencing-based molecular diagnosis of 82 retinitis pigmentosa probands from northern ireland. *Human genetics*, 134(2):217–230.
- Zhao, L., Zabel, M. K., Wang, X., Ma, W., Shah, P., Fariss, R. N., Qian, H., Parkhurst, C. N., Gan, W.-B., and Wong, W. T. (2015b). Microglial phagocytosis of living photoreceptors contributes to inherited retinal degeneration. *EMBO molecular medicine*, 7(9):1179–1197.
- Zhao, X., Palczewski, K., and Ohguro, H. (1995). Mechanism of rhodopsin phosphorylation. *Biophysical chemistry*, 56(1-2):183–188.

## Clave de abreviaturas

---

2-AG	2-araquidonoilglicerol
aCGH	Comparative Genomic Hybridization array
ACHM	Acromatopsia
AV	Agudeza visual
adRP	Retinosis Pigmentaria autosómica dominante
arRP	Retinosis Pigmentaria autosómica recesiva
CSNB	Ceguera nocturna estacionaria congénita
CNVs	Copy Number Variations
CV	Campo visual
DCB	Distrofia Conos-Bastones
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DM	Distrofia Macular
DR	Distrofias de Retina
EPR	Epitelio Pigmentario de la Retina
ERG	Electrorretinograma
GDP	Guanosin difosfato
GMP <sub>c</sub>	Guanosin monofosfato cíclico
GTP	Guanosin trifosfato
HRM	High Resolution Melting
LCA	Amaurosis congénita de Leber
LOH	Loss of Heterozygosity
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
NGS	Next-Generation Sequencing
OCT	Tomografía de coherencia óptica
PCR	Polymerase Chain Reaction
RP	Retinosis Pigmentaria
sRP	Retinosis Pigmentaria esporádica
SSCP	Single Stranded Conformational Polymorphism
TES	Targeted Sequencing
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing
xLRP	Retinosis Pigmentaria ligada al cromosoma X





# Anexo I

---

## TABLA ANEXO

Listado de genes descritos como causa de retinosis pigmentaria no sindrónica (*RetNet Marzo 2017*)



Gen	Herencia	Función de la proteína	Frecuencia global estimada	Otros fenotipos asociados
<i>ABCA4</i>	Recesiva	Metabolismo retiniano	2-5%	DCB(ar);DM(ar)
<i>AGBL5</i>	Recesiva	ND	ND	
<i>ARL2BP</i>	Recesiva	Mantenimiento fotorreceptores	ND	
<i>ARL3</i>	Dominante	ND	ND	
<i>ARL6</i>	Recesiva	Proteína transmembrana	<1%	Sind(ar)
<i>BBS1</i>	Recesiva	ND	<1%	Sind(ar)
<i>BBS2</i>	Recesiva	ND	<1%	Sind(ar)
<i>BEST1</i>	Dominante y Recesiva	Canal iónico	<1%/<1%	DM(ad); Ret(ad)
<i>C2orf71</i>	Recesiva	ND	<1%	
<i>C8orf37</i>	Recesiva	ND	<1%	DCB(ar);Sind(ar)
<i>CA4</i>	Dominante	ND	<1%	
<i>CERKL</i>	Recesiva	Señalización celular	3-4% (España)	DCB(ar)
<i>CLRN1</i>	Recesiva	Mantenimiento fotorreceptores	<1%	
<i>CNGA1</i>	Recesiva	Fototransducción	1-2%	
<i>CNGB1</i>	Recesiva	Fototransducción	<1% (2-5% España)	
<i>CRB1</i>	Recesiva	Mantenimiento tisular	6-7% (España)	LCA(ar);Ret(ad)
<i>CRX</i>	Dominante	Factor de transcripción	1%	LCA(ad);DCB(ad)
<i>CYP4V2</i>	Recesiva	Metabolismo retiniano	ND	Ret(ar)
<i>DHDDS</i>	Recesiva	Mantenimiento fotorreceptores	<1%	
<i>DHX38</i>	Recesiva	<i>Splicing</i>	ND	
<i>EMC1</i>	Recesiva	ND	ND	
<i>EYS</i>	Recesiva	Señalización celular	10-30% (España)	
<i>FAM161A</i>	Recesiva	Mantenimiento tisular	<1%	
<i>FSCN2</i>	Dominante	Estructura celular	<1% (3% Japón)	DM(ad)
<i>GPR125</i>	Recesiva	ND	ND	
<i>GUCA1B</i>	Dominante	Fototransducción	<1% (4-5% Japón)	DM(ad)
<i>HGSNAT</i>	Recesiva	ND	ND	Sind(ar)
<i>HK1</i>	Recesiva	ND	ND	
<i>IDH3B</i>	Recesiva	Ciclo ácido cítrico	<1%	
<i>IFT140</i>	Recesiva	Transporte cilio conector	<1%	LCA(ar); Sind(ar)
<i>IFT172</i>	Recesiva	Transporte cilio conector	ND	Sind(ar)
<i>IMPDH1</i>	Dominante	Regulación crecim. celular	2-3%	LCA(ad)
<i>IMPG2</i>	Recesiva	Estructura celular	<1%	
<i>KIAA1549</i>	Recesiva	ND	ND	
<i>KIZ</i>	Recesiva	División celular	<1%	
<i>KLHL7</i>	Dominante	Ubiquitinación	1-2%	
<i>LRAT</i>	Recesiva	Metabolismo retiniano	<1%	LCA(ar)
<i>MAK</i>	Recesiva	Estructura celular	<1%	
<i>MERTK</i>	Recesiva	Proteína transmembrana	<1%	
<i>MVK</i>	Recesiva	Metabolismo retiniano	ND	Ret(ar)
<i>NEK2</i>	Recesiva	División celular	ND	
<i>NEUROD1</i>	Recesiva	Factor de transcripción	ND	
<i>NR2E3</i>	Dominante y Recesiva	Factor de transcripción	1-2%/<1%	Ret(ar)
<i>NRL</i>	Dominante y Recesiva	Mantenimiento tisular	<1%/<1%	
<i>OFD1</i>	Ligada al chrX	Desarrollo tisular	ND	Sind(x1)
<i>PDE6A</i>	Recesiva	Fototransducción	2-5%	
<i>PDE6B</i>	Recesiva	Fototransducción	2-8%	
<i>PDE6G</i>	Recesiva	Fototransducción	<1%	
<i>POMGNT1</i>	Recesiva	Metabolismo retiniano	ND	
<i>PRCD</i>	Recesiva	ND	<1%	
<i>PROM1</i>	Recesiva	Estructura celular	<1%	DCB(ad);DM(ad);Re
<i>PRPF3</i>	Dominante	<i>Splicing</i>	1%	
<i>PRPF31</i>	Dominante	<i>Splicing</i>	5-10%	
<i>PRPF4</i>	Dominante	<i>Splicing</i>	ND	
<i>PRPF6</i>	Dominante	<i>Splicing</i>	<1%	
<i>PRPF8</i>	Dominante	<i>Splicing</i>	2-3%	
<i>PRPH2</i>	Dominante	Mantenimiento fotorreceptores	5-10%	DCB(ad);DM(ad)
<i>RBP3</i>	Recesiva	Metabolismo retiniano	<1%	
<i>RDH12</i>	Dominante	Fototransducción	ND	LCA(ar)
<i>RGR</i>	Recesiva	Metabolismo retiniano	<1%	
<i>RHO</i>	Dominante y Recesiva	Fototransducción	20-30%/<1%	
<i>RLBP1</i>	Recesiva	Metabolismo retiniano	<1%	Ret(ar)
<i>ROM1</i>	Dominante	Estructura celular	<1%	
<i>RP1</i>	Dominante y Recesiva	Mantenimiento tisular	6-7%/4-5% (España)	
<i>RP1L1</i>	Recesiva	Mantenimiento tisular	<1%	DM(ad)
<i>RP2</i>	Ligada al chrX	Mantenimiento tisular	10-20%	
<i>RP9</i>	Dominante	<i>Splicing</i>	<1%	
<i>RPE65</i>	Dominante y Recesiva	Metabolismo retiniano	<1%/2-5%	LCA(ar)
<i>RPGR</i>	Ligada al chrX	Transporte cilio conector	70-90%	DCB(x1);DM(x1)
<i>SAG</i>	Recesiva	Fototransducción	2-3% (Japón)	
<i>SEMA4A</i>	Dominante	Mantenimiento tisular	<1% (3-4% Pakistán)	DCB(ad)
<i>SLC7A14</i>	Recesiva	ND	-2%	
<i>SNRNP200</i>	Dominante	<i>Splicing</i>	1-2%	
<i>SPATA7</i>	Recesiva	ND	<1%	LCA(ar)
<i>SPP2</i>	Dominante	ND	ND	
<i>TOPORS</i>	Dominante	Ubiquitinación	1%	
<i>TRNT1</i>	Recesiva	ND	ND	Sind(ar)
<i>TTC8</i>	Recesiva	Proteína transmembrana	<1%	Sind(ar)
<i>TULP1</i>	Recesiva	Mantenimiento tisular	<1%	LCA(ar)
<i>USH2A</i>	Recesiva	Estructura celular	10-15%	Sind(ar)
<i>ZNF513</i>	Recesiva	Factor de transcripción	<1%	

ND:no definido; ar:autosómica recesiva; ad: autosómica dominante; xl: ligada al chrX. LCA: amaurosis congénita de Leber; DCB: distrofia conos-bastones; DM: distrofia macular; Sind: Retinopatía sintromica; Ret: Otras retinopatías. Modificada de *Nash et al, 2015*.

