



**Fundació**  
La Marató de TV3

20<sup>è</sup> SIMPOSIUM  
Enfermedades neurodegenerativas



# **ANÁLISIS DEL TRANSPORTE PROTEICO MEDIANTE TÉCNICAS DE SUPERRESOLUCIÓN PARA CARACTERIZAR LA NEURODEGENERACIÓN DE LA RETINA EN MODELOS ANIMALES E IPSC HUMANAS**

**Roser Gonzàlez Duarte**

Facultat de Biologia UB

**Pablo Loza Alvarez**

ICFO - Institut de Ciències Fotòniques

**Slaven Erceg**

Centro de Investigación Príncipe Felipe Valencia

## 1. Resumen

**Objetivo principal.** Las distrofias de retina son un grupo de patologías neurodegenerativas genéticamente muy heterogéneas que causan ceguera. Se conocen más de 200 genes que alteran la función de los conos y bastones, neuronas altamente especializadas, difíciles de cultivar *in vitro* y para las que no existen líneas celulares que reproduzcan sus características morfológicas y funcionales. Los fotorreceptores son células muy polarizadas en las que los mecanismos de transporte proteico son poco conocidos, en particular el transporte al cilio (un punto caliente mutacional), paso obligado para todas las proteínas de fotorrecepción y fototransducción hacia el segmento externo. Los estudios de proteómica y de tomografía crioelectrónica han supuesto un avance importante en el conocimiento del tráfico ciliar de los fotorreceptores. Aun así, sigue existiendo un vacío importante en la disección de la dinámica del transporte proteico en modelos de ratón y su traslación al contexto humano, así como en la dilucidación de los efectos de las mutaciones patogénicas. Este proyecto propone llenar este vacío conceptual estudiando dos genes causantes de distrofias de retina, *RD3* y *CERKL*, combinando el análisis de genes y mutaciones en ratones editados genéticamente, ratones transgénicos transitorios y en organoides retinales generados a partir de células humanas iPSC utilizando microscopía de alta resolución *in vivo* y en tejido fijado.

**Metodología.** Se propone combinar técnicas de edición genética, transgénesis transitoria en retina de ratón mediante electroporación *in vivo* de DNA, generación de fotorreceptores a partir de iPSC derivadas de pacientes humanos, y metodologías de análisis de imagen por microscopía de alta resolución: STED multicolor y microscopía de lámina de luz.

**Resultados esperados.** Elaboración de un mapa detallado del tráfico intracelular de RD3 y CERKL del fotorreceptor, para destacar los pasos clave, en muestras de tejido de ratón *in vivo* y en copas ópticas humanas *in vitro*; establecimiento de correlaciones genotipo-fenotipo en un panel de muestras de ratón y humanas, y cuantificación de las alteraciones causadas por estrés oxidativo ambiental, con el fin de identificar nuevas aproximaciones terapéuticas efectivas para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas de la retina.

## 2. Resultados

El presente proyecto ha proporcionado resultados relevantes respecto a la fisiopatología de la amaurosis congénita de Leber 12 (LCA12), una forma muy grave de la ceguera hereditaria, causada por mutaciones en el gen *RD3*. Nuestros resultados indican que las proteínas GCAP son sensores de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , que interferirían en las vías de autofagia de los fotorreceptores. Esperamos que esta conclusión pueda también extrapolarse a las alteraciones causadas por mutaciones en este gen, que causarían el cierre de canales de cGMP, causando así un decremento de  $Ca^{2+}$  y desregulando las células de la retina. El estudio de IMPDH1 también ha revelado una complejidad inesperada de la regulación de esta enzima *in vivo*. Los estudios continuarán para determinar el efecto de las mutaciones genéticas de pacientes en la actividad de esta enzima, en colaboración con cristalógrafos. Una conclusión importante del presente trabajo es que podrían diseñarse inhibidores específicos de la actividad enzimática de IMPDH1 como posible aproximación terapéutica para los pacientes con amaurosis congénita de Leber debida a mutaciones en este gen.

Respecto al gen *CERKL*, han transcurrido más que quince años desde su identificación y todavía no se comprende la razón por la que mutaciones en este gen son causantes de ceguera hereditaria y muerte de los fotorreceptores. Hemos generado diferentes modelos de ratón para caracterizar la función de *CERKL* en la respuesta al estrés lumínico y oxidativo de la retina, tanto modelos celulares como de ratón, con edición génica y transgénesis transitoria, muy útiles para dilucidar algunas de las funciones fisiológicas de este gen, pero que no permiten mimetizar completamente los rasgos fenotípicos mostrados por los pacientes humanos. Por eso, la generación de organoides de retina a partir de fibroblastos derivados de células iPSC de un paciente que sufre la mutación más frecuente de *CERKL* y un control es uno de los logros más importantes del proyecto. En la actualidad seguimos estudiando estos organoides de retina en diferentes condiciones de estrés oxidativo y analizando su resiliencia, a través de varias metodologías, como por ejemplo microscopía de alta resolución, *3D imaging* y transcriptómica.

Por otra parte, todos los grupos del proyecto han desarrollado y consolidado metodologías avanzadas, tanto de desarrollo y diferenciación neuronal dentro de

organoides de retina humana, como de obtención y generación de imágenes para reconstrucción de volúmenes biológicos.

En conjunto, el proyecto ha avanzado, proporcionando resultados tanto de investigación básica, como de desarrollo tecnológico que podrá ser empleado en la resolución de otros retos biomédicos.

En resumen, los resultados más relevantes de este proyecto son:

1) Elaboración de un mapa detallado de interacciones proteicas y modificaciones de *RD3*, en cultivos celulares y retinas de ratón transgénicas transitorias.

2) Profundización en la función de *CERKL* en la protección de los fotorreceptores frente al estrés oxidativo, y demostración que se trata de una proteína muy dinámica. Hemos establecido modelos celulares, y generado nuevos modelos de ratón mediante el uso de técnicas de edición génica.

3) Obtención de imágenes de alta resolución del tráfico intracelular de estas proteínas, estableciendo nuevas vías para las proteínas estudiadas, desconocidas hasta el momento.

4) Gracias a la generación de organoides de retina, hemos creado un modelo humano que nos ha permitido comprobar que las células de retina de los pacientes humanos con mutaciones en *CERKL* sufren mayor estrés oxidativo y lumínico. Esta es una herramienta imprescindible para comprender las bases moleculares de la neurodegeneración de retina.

5) Un mejor conocimiento del uso de la microscopía de hojas de luz (*light sheet*) en el estudio de órganos neuronales en 3D.

En estos momentos todavía estamos trabajando y profundizando en todas estas nuevas herramientas y vías de conocimiento de la función de la retina, el órgano del sistema nervioso central encargado de la visión, y el órgano principalmente afectado en las dolencias hereditarias degenerativas de la retina. Creemos que el conocimiento

alcanzado va a permitir, en su momento, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de esta dolencia.

### 3. Relevancia y posible impacto futuro

La neurodegeneración de la retina y la mácula son las principales causas de la pérdida de visión en todo el mundo, con un inmenso impacto social y económico. Las distrofias hereditarias de la retina (IRD) son enfermedades minoritarias que afectan a 1:3.000 personas, causadas por mutaciones en más de 300 genes. Esta elevadísima heterogeneidad genética y clínica supone un reto considerable para el diagnóstico y consejo genético, así como para la práctica clínica y el tratamiento del paciente. La degeneración de los fotorreceptores debido a las mutaciones génicas conlleva la ceguera paulatina, todavía sin tratamiento, de los pacientes. Aun así, la medicina de precisión, basada en el desarrollo de nuevas terapias específicas para paciente y gen, abre una vía a tratamientos efectivos. A los pacientes y sus familias les preocupa la accesibilidad y eficacia del diagnóstico genético y de los tratamientos terapéuticos para parar la progresión o, incluso, curar las enfermedades neurodegenerativas de la retina. De momento, *Luxturna* es la primera terapia génica comercial para una IRD y ha sido recientemente aprobada para tratar exclusivamente a pacientes con dos mutaciones alélicas en el gen *RPE65*, pero en la actualidad se están desarrollando varias terapias génicas y celulares para otras patologías de la retina. Por tanto, es imperativo dilucidar la función fisiológica de los genes causantes como prerrequisito para diseñar una medicina de precisión para estas enfermedades tan graves.

En este contexto, todos los genes y proteínas que hemos estudiado en el presente proyecto causan distrofias de la retina heredadas (IRD), patologías visuales muy graves. Mutaciones en el gen *RD3* causan una ceguera infantil precoz (la amaurosis congénita de Leber) y mutaciones en *IMPDH1* y *CERKL* causan retinitis pigmentosa, caracterizada por la neurodegeneración progresiva, primero de bastones y después de conos. A pesar de que la asociación de estos genes a las patologías de la retina son indiscutibles, su función fisiológica y el efecto de las mutaciones patogénicas a la función y homeostasis de los fotorreceptores son muy poco conocidas. Nuestro proyecto ha combinado metodologías muy avanzadas, tanto en generación de modelos de retina (mediante modelos de ratón generados por edición génica, y transgénicos

transitorios de retina; modelos de retina humanos a partir de organoides obtenidos a partir de células iPSC de pacientes) como de obtención de imágenes de alta resolución (mediante microscopía tridimensional y microscopía de lámina de luz), que nos han permitido avanzar en la caracterización de la función de genes en el transporte proteico y la respuesta a diferentes tipos de estrés lumínico y oxidativo en la retina. Solo a través de la disección cuidadosa de la función fisiológica de los genes causantes (como por ejemplo *RD3*, *IMPDH1* y *CERKL*) y de las alteraciones causadas por sus mutaciones patogénicas, podremos diseñar aproximaciones terapéuticas más efectivas y elaborar protocolos de medicina de precisión para tratar a los pacientes de estas patologías de la retina en el futuro.

#### 4. Bibliografía científica generada

##### GRUPO 1

De Castro-Miró M, Tonda R, Escudero-Ferruz P, Andrés R, Mayor-Lorenzo A, Castro J, Ciccio M, Hidalgo DA, Rodríguez-Ezcurra JJ, Farrando J, Pérez-Santonja JJ, Cormand B, Marfany G, González-Duarte R.

*Novel Candidate Genes and a Wide Spectrum of Structural and Point Mutations Responsible for Inherited Retinal Dystrophies Revealed by Exome Sequencing.*  
PLoS One 11:e0168966 (2016)

López-Begines, Plana-Bonamaisó and Méndez.

*Molecular determinants of Guanylate Cyclase Activating Protein subcellular distribution in photoreceptor cells of the retina.*  
Scientific Reports vol. 8:2903 (2018)

De Castro-Miró, M.; Tonda R.; Marfany G, Casaroli-Marano RP, González-Duarte R.

*Novel mutations in the choroideremia gene and multi-Mendelian phenotypes in Spanish families.*  
British Journal Ophthalmology 102:1378-86 (2018)

Trigueros S, Domènech EB, Toulis V, Marfany G.

*In Vitro Gene Delivery in Retinal Pigment Epithelium Cells by Plasmid DNA-Wrapped Gold Nanoparticles.* Genes 10, pii: E289 (2019).

Mirra S, Marfany G.

*Mitochondrial gymnastics in retinal cells: a resilience mechanism against oxidative stress and neurodegeneration.*

Adv Exp Med Biol. (en prensa)

*CERKL, a retinitis pigmentosa gene, is relevant for retinal cell resilience to light and oxidative stress.*

Manuscrito en preparación.

*Characterization of a new murine model for CERKL*

Manuscrito en preparación.

## **GRUPO 2**

Omar E. Olarte, Jordi Andilla, Emilio J. Gualda, and Pablo Loza-Alvarez.

*Light-sheet microscopy: a tutorial*, Adv. Opt. Photon. 10, 111-179 (2018)

D. Artigas, D. Merino, C. Polzer, P. Loza-Alvarez,

*Sub-diffraction discrimination with polarization-resolved two-photon excited fluorescence microscopy*, Optica 4, 911-918 (2017)

Merino D, Mallabiabarrena A, Andilla J, Artigas D, Zimmermann T, Loza-Alvarez P.

*STED imaging performance estimation by means of Fourier transform analysis.*

Biomed Opt Express. 8:2472-2482 (2017)

*Optimised light-sheet imaging of human retina organoids*

En preparación.

## **GRUPO 3**

Aranzazu Bolinches-Amorós, Marian León, Gemma Marfany, Roser Gonzalez, Slaven Erceg, Dunja Lukovic.

*Generation of iPSC lines from retinitis pigmentosa patient with mutation in CERKL and healthy sibling.*

Stem Cell Research (en prensa).

*Identification of retinal cell types in iPSC-derived 3D retinal organoids by LSM*

Manuscrito en preparación.