



**Fundació**  
La Marató de TV3

20è SIMPOSIUM  
Malalties neurodegeneratives



# **ANÀLISI DEL TRANSPORT PROTEIC MITJANÇANT TÈCNIQUES DE SUPERRESOLUCIÓ PER CARACTERITZAR LA NEURODEGENERACIÓ DE LA RETINA EN MODELS ANIMALS I IPSC HUMANES**

**Roser Gonzàlez Duarte**

Facultat de Biologia UB

**Pablo Loza Alvarez**

ICFO - Institut de Ciències Fotòniques

**Slaven Erceg**

Centro de Investigación Príncipe Felipe Valencia

## 1. Resum

**Objectiu principal.** Les distròfies de retina són un grup de patologies neurodegeneratives genèticament molt heterogènies que causen ceguesa. Es coneixen més de 200 gens que alteren la funció dels cons i bastons, neurones altament especialitzades, difícils de cultivar *in vitro* i per a les quals no existeixen línies cel·lulars que reproduïxin les seves característiques morfològiques i funcionals. Els fotoreceptors són cèl·lules molt polaritzades en les quals els mecanismes de transport proteic són poc coneguts, particularment al cili (un punt calent mutacional), pas obligat cap al segment extern per a totes les proteïnes de fotorecepció i fototransducció. Els estudis de proteòmica i de tomografia crioelèctrica han suposat un avenç important en el coneixement del trànsit ciliar dels fotoreceptors. Tanmateix, continua existint un buit important en la dissecció de la dinàmica del transport proteic en models de ratolí i la seva translació al context humà, així com en la comprensió dels efectes de les mutacions patogèniques. Aquest projecte proposa omplir aquest buit conceptual estudiant dos gens causants de distròfies de retina, *RD3* i *CERKL*, combinant l'anàlisi de gens i mutacions tant en models de ratolí editats genèticament, ratolins transgènics transitoris en organoides generats a partir de cèl·lules humanes iPSC usant metodologies de microscòpia d'alta resolució *in vivo* i en teixit fixat.

**Metodologia.** Es proposa combinar tècniques d'edició genètica, transgènesi transitòria a retina de ratolí mitjançant electroporació *in vivo* de DNA, generació de fotoreceptors a partir d'iPSC de pacients humans, i metodologies d'anàlisi d'imatge obtingudes en microscòpia d'alta resolució: STED multicolor i microscòpia de capa de llum.

**Resultats esperats.** Elaborar un mapa detallat del trànsit intracel·lular d'*RD3* i *CERKL* del fotoreceptor, per destacar-ne els passos clau, en mostres de teixit viu murí i humà; establir correlacions genotip-fenotip en un panell de mostres de ratolí i humanes, i quantificar-ne les alteracions causades per estrès oxidatiu ambiental, a fi d'identificar noves aproximacions terapèutiques per a les malalties de neurodegeneració retinal.

## 2. Resultats

Aquest projecte ha proporcionat idees rellevants respecte de la fisiopatologia de l'amaurosi congènita de Leber 12 (LCA12), una forma molt greu de la ceguesa hereditària, causada per mutacions al gen *RD3*. Els nostres resultats indiquen que les proteïnes GCAP són sensors de la concentració intracel·lular de  $Ca^{2+}$ , que interferirien en les vies d'autofàgia dels fotoreceptors. Esperem que aquesta conclusió pugui també ser extrapolable a les alteracions causades per mutacions en aquest gen, que causarien el tancament de canals de cGMP, tot causant un decrement de  $Ca^{2+}$  i desregulant les cèl·lules de la retina. L'estudi d'IMPDH1 també ha revelat una complexitat inesperada de la regulació d'aquest enzim *in vivo*. Estem continuant els estudis per tal de determinar l'efecte de les mutacions genètiques de pacients en l'activitat de l'enzim, en col·laboració amb cristal·lògrafs. Una conclusió important d'aquesta feina és que es podrien dissenyar inhibidors específics de l'activitat enzimàtica com a possible aproximació terapèutica per als pacients amb amaurosi congènita de Leber deguda a mutacions en aquest gen.

Respecte de *CERKL*, han passat més de quinze anys des que va ser identificat, però encara no es coneix la raó per la qual mutacions en aquest gen són causa de ceguesa genètica i de la mort dels fotoreceptors. Hem generat diferents models de ratolí per caracteritzar la funció de *CERKL* en la resposta a l'estrès lumínic i oxidatiu de la retina, tant models cel·lulars com de ratolí, amb edició gènica i transgènesi transitòria, que són molt útils de dissecionar algunes de les funcions fisiològiques d'aquest gen, però que no permeten mimetitzar completament els trets fenotípics mostrats pels pacients humans. Per això la generació d'organoides de retina a partir de fibroblasts derivats de cèl·lules iPSC d'un pacient que pateix la mutació més freqüent de *CERKL* i un control és una de les fites més importants del projecte. Actualment continuem estudiant aquests organoides en diverses condicions d'estrès oxidatiu i analitzant la seva resiliència, per mitjà de diverses metodologies, com ara microscòpia d'alta resolució, *3D imaging* i transcriptòmica.

D'altra banda, tots els grups del projecte han desenvolupat i consolidat metodologies avançades, tant de desenvolupament i diferenciació neuronal dins d'organoides de retina, com d'obtenció i generació d'imatges per a reconstrucció de volums biològics.

En conjunt, el projecte ha avançat i proporcionat resultats tant de recerca bàsica, com de desenvolupament tecnològic que podrà ser emprat en la resolució d'altres reptes biomèdics.

En resum, els resultats més rellevants d'aquest projecte són:

1) Elaboració d'un mapa detallat d'interaccions proteiques i modificacions d'*RD3*, en cultius cel·lulars i retines de ratolí transgèniques de forma transitòria.

2) Aprofundiment en la funció de *CERKL* en la protecció dels fotoreceptors davant de l'estrès oxidatiu, i demostració que és una proteïna molt dinàmica. Hem establert models cel·lulars, i generat nous models de ratolí mitjançant l'ús de tècniques d'edició gènica.

3) Obtenció d'imatges d'alta resolució del trànsit intracel·lular d'aquestes proteïnes i establiment de noves vies per a les proteïnes estudiades, desconegudes fins ara.

4) Gràcies a la generació d'organoides retinals, creació d'un model humà que ens ha permès comprovar que les cèl·lules de retina dels pacients humans amb mutacions en *CERKL* pateixen major estrès oxidatiu i lumínic. Aquesta és una eina imprescindible per a comprendre les bases moleculars de la neurodegeneració a la retina.

5) Un millor coneixement de l'ús de la microscòpia de fulls de llum (*light sheet*) en l'estudi d'òrgans neuronals en 3D.

En aquests moments encara estem treballant i aprofundint en totes aquestes noves eines i vies de coneixement de la funció de la retina, l'òrgan del sistema nerviós central encarregat de la visió, i l'òrgan principalment afectat en les malalties hereditàries degeneratives de la retina. Creiem que el coneixement assolit permetrà al seu moment de desenvolupar noves estratègies terapèutiques per al tractament d'aquesta malaltia.

### 3. Rellevància i possible impacte futur

La neurodegeneració de la retina i la màcula són les principals causes de la pèrdua de la visió a tot el món, amb un impacte social i econòmic immens. Les distròfies hereditàries de la retina (IRD) són malalties rares que afecten 1:3.000 persones, causades per mutacions en més de 300 gens. Aquesta elevadíssima heterogeneïtat genètica i clínica suposa un repte considerable per al diagnòstic i consell genètic, així com per a la pràctica clínica i el tractament del pacient. La degeneració dels fotoreceptors a causa de les mutacions gèniques acaba comportant la ceguesa progressiva, de moment sense tractament, dels pacients. Tot i això, la medicina de precisió, basada en el desenvolupament de noves teràpies específiques per pacient i gen, obra una finestra a tractaments efectius. Als pacients i les seves famílies els preocupa l'accessibilitat i eficàcia del diagnòstic genètic i dels tractaments terapèutics per tal de parar la progressió o, fins i tot, curar les malalties neurodegeneratives de la retina. De moment, *Luxturna* és la primera teràpia gènica comercial per a una IRD i ha estat recentment aprovada per tractar exclusivament pacients que portin dues mutacions al·lèliques al gen *RPE65*, però actualment s'estan desenvolupant diverses teràpies gèniques i cel·lulars per a altres malalties de la retina. Per tant, és imperatiu conèixer molt millor la funció fisiològica dels gens causants, com a prerequisit per dissenyar una medicina de precisió per a aquestes malalties tan greus.

En aquest context, tots els gens i les proteïnes que hem estudiat en aquest projecte causen distròfies retinals heretades (IRD), desordres visuals molt greus. Mutacions al gen *RD3* causen una ceguesa infantil precoç (l'amaurosi congènita de Leber) i mutacions a *IMPDH1* i *CERKL* causen retinitis pigmentosa, caracteritzada per la neurodegeneració progressiva, primer de bastons i després de cons. Tot i que l'associació d'aquests gens a les patologies de la retina són indiscutibles, la seva funció fisiològica i l'efecte de les mutacions patògenes a la funció i homeòstasi dels fotoreceptores són molt poc conegudes. El nostre projecte combina metodologies molt avançades, tant en generació de models de retina (mitjançant models de ratolí generats per edició gènica, i transgènics transitoris de retina; models de retina humans a partir d'organoides obtinguts de cèl·lules iPSC de pacients) com d'obtenció d'imatges d'alta resolució (mitjançant microscòpia tridimensional i microscòpia de làmina de llum), que ens han permès avançar en la caracterització de la funció de gens en el transport proteic i la resposta a diferents tipus d'estrès lumínic i oxidatiu a la retina. Només a través de la dissecció acurada de la funció fisiològica dels gens causants (com

ara *RD3*, *IMPDH1* i *CERKL*) i de les alteracions causades per les seves mutacions patogèniques, podem dissenyar aproximacions terapèutiques més efectives i elaborar protocols de medicina de precisió per tractar als pacients d'aquestes malalties de la retina en el futur.

#### 4. Bibliografia científica generada

##### GRUP 1

De Castro-Miró M, Tonda R, Escudero-Ferruz P, Andrés R, Mayor-Lorenzo A, Castro J, Cicciooli 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 premsa)

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

Manuscrit en preparació.

*Characterization of a new murine model for CERKL*

Manuscrit en preparació.

## **GRUP 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 preparació.

## **GRUP 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 premsa).

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

Manuscrit en preparació