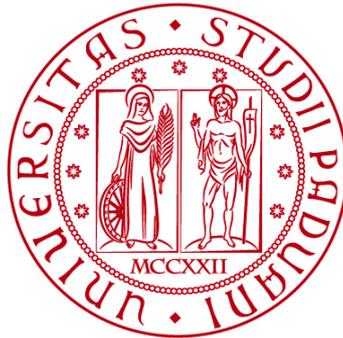


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**NUOVO MODELLO CELLULARE MURINO PER STUDI
MOLECOLARI IN VITRO SULLA RETINITE PIGMENTOSA**

**Tutor: Prof. Giovanni Vazza
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Chiara Modolo

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

SOMMARIO

<i>CAPITOLO 1: STATO DELL'ARTE</i>	1
1.1 Le malattie ereditarie della retina e la retinite pigmentosa.....	1
1.2 La retina e i fotorecettori.....	2
1.3 Il ruolo del cGMP e del calcio nella fototrasduzione	3
1.4 Le linee cellulari per lo studio delle malattie oculari	4
<i>CAPITOLO 2: APPROCCI SPERIMENTALI E RISULTATI</i>	5
2.1 Generazione e selezione di un nuovo clone	5
2.1.1 Costruzione del vettore retrovirale.....	5
2.1.2 Trasduzione delle cellule.....	5
2.1.3 Generazione della linea cellulare monoclonale e selezione del clone	6
2.2 La caratterizzazione delle cellule 661W-A11	7
2.2.1 RT-qPCR per l'analisi dell'espressione genica	7
2.2.2 Western Blot e Immunofluorescenza per l'analisi proteica	7
2.3 Simulazione della degenerazione in vitro dei fotorecettori	8
2.3.1 Pathway di morte cellulare cGMP-dipendenti	8
2.3.2 Induzione della degenerazione cellulare e saggio della vitalità cellulare.....	9
2.3.3 Determinazione della funzione dello Zaprinast.....	10
2.3.4 Coinvolgimento del calcio nella degenerazione cellulare e il diltiazem	11
2.3.5 Coinvolgimento della PKG nella degenerazione cellulare	12
2.4 Validazione del modello in vitro per lo screening farmaceutico	14
<i>CAPITOLO 3: DISCUSSIONE CRITICA</i>	16
3.1 Scelta del clone più adatto da sottoporre alle analisi.....	16
3.2 Il diltiazem e l'effetto neuroprotettivo	16
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	18

ABSTRACT

La retinite pigmentosa (RP) è una forma ereditaria di degenerazione della retina, caratterizzata dalla morte dei bastoncelli seguita dalla perdita dei coni. Le mutazioni in diversi geni legati alla malattia causano l'aumento dei livelli di cGMP e dell'afflusso di calcio.

In questo studio, è stato sviluppato un nuovo modello cellulare murino che permette di mimare la degenerazione dei fotorecettori in vitro per condurre studi molecolari sulla RP e sui farmaci neuroprotettivi. Quindi, le cellule 661W sono state geneticamente modificate per l'espressione stabile del fattore di trascrizione della leucine zipper della neuroretina. È stato poi selezionato il clone 661W-A11 in base all'espressione dei geni bersaglio di *Nrl*, in quanto hanno mostrato un aumento significativo dell'espressione dei geni specifici dei bastoncelli rispetto alle cellule 661W.

Per simulare la degenerazione dei fotorecettori è stato utilizzato lo Zaprinast che inibisce l'attività della fosfodiesterasi-6 e l'attivazione dei pathway apoptotici è stata confermata esaminando la ridotta vitalità cellulare, l'aumento intracellulare di cGMP e di calcio e l'attivazione della proteina chinasi G e delle calpaine.

In conclusione, le cellule 661W-A11 possono essere utilizzate come modello per gli studi molecolari sulla RP e per lo screening farmacologico ad alto rendimento.

CAPITOLO 1: STATO DELL'ARTE

1.1 Le malattie ereditarie della retina e la retinite pigmentosa

Le malattie ereditarie della retina (IRD, *Inherited Retinal Disease*) rappresentano un gruppo di malattie eterogeneo, sia dal punto di vista clinico che dal punto di vista genetico. Queste causano la perdita della vista, dovuta a una disfunzione o alla degenerazione dei fotorecettori o dell'epitelio pigmentato retinico. Le IRD hanno un'incidenza di 1:1380 individui e colpiscono 5,5 milioni di persone al mondo e coinvolgono più di 280 geni [1].

La forma ereditaria più comune è la retinite pigmentosa (RP), la quale rappresenta circa la metà dei casi di IRD. La RP è una malattia degenerativa e progressiva della retina che porta a una profonda perdita della vista o alla cecità.

Anche la RP è molto eterogenea e comprende diverse distrofie retiniche. La retinite pigmentosa non sindromica è causata da più di 3100 mutazioni identificate in oltre 70 geni che rendono conto delle diverse forme della patologia a trasmissione autosomica dominante, recessiva e X-linked. Anche le forme sindromiche sono causate da mutazioni in diversi geni, alcuni causano la sindrome di Usher, mentre altri geni sono associati alla sindrome di Bardet-Biedl. Oltre a questa varietà genetica, la retinite pigmentosa presenta anche un'eterogeneità fenotipica, in quanto i sintomi di diverse patologie si sovrappongono poiché colpiscono geni coinvolti nel medesimo pathway, e un'eterogeneità del quadro clinico, il quale può presentare differenze anche in individui che condividono la stessa mutazione nello stesso gene. Il quadro clinico prevede inizialmente il verificarsi della cecità notturna, la quale è seguita dalla perdita della visione periferica e successivamente anche di quella centrale. L'avanzamento della malattia è spiegabile analizzando la RP a livello cellulare. Infatti, è caratterizzata da una progressiva disfunzione e perdita dei fotorecettori: inizialmente si verifica la degenerazione dei bastoncelli, comportando la cecità notturna e la perdita della visione periferica, seguita dalla perdita dei coni che causa la perdita della visione centrale [2].

Concludendo, i geni responsabili della RP codificano proteine che rivestono un ruolo fondamentale nei processi vitali della neuroretina e una mutazione di un gene coinvolto in un punto specifico del pathway può compromettere l'intero sistema visivo. In particolar modo, in questo studio ci si è focalizzati sui geni espressi nei bastoncelli e coinvolti nel pathway della fototrasduzione. Infatti, tra i meccanismi molecolari che comportano la disfunzione e la morte dei fotorecettori, il più significativo è quello che implica l'aumento dei livelli di guanosin-monofosfato ciclico (cGMP) e dell'influsso di calcio: si parla infatti di morte cellulare cGMP-dipendente. Ad esempio, alcune mutazioni si possono verificare nei geni che codificano la fosfodiesterasi-6 (PDE6): in particolar modo possono venire colpiti i geni *PDE6A*, *PDE6B* e *PDE6G* (i quali codificano rispettivamente le subunità catalitiche α e β e le due subunità inibitorie γ della fosfodiesterasi) e in questa

situazione si verificano livelli elevati di cGMP che portano alla perdita del fotorecettore [3].

1.2 La retina e i fotorecettori

La neuroretina è un'unità fondamentale del tessuto nervoso centrale; si tratta di un tessuto neuronale la cui funzione primaria è la percezione della luce, il processamento di questo stimolo e la trasmissione dell'informazione nelle diverse parti del sistema nervoso [3]. La neuroretina è composta da sei tipologie di cellule neuronali e da tre tipologie di cellule gangliari ed è suddivisa in tre strati cellulari, separati tra loro da strati sinaptici. La neuroretina è appoggiata al di sopra dell'epitelio pigmentato retinico (EPR), il quale è fondamentale per la sopravvivenza dei fotorecettori, e insieme formano la retina. Infine, la retina è caratterizzata dall'esistenza di barriere emato-retiniche, le quali regolano gli scambi delle sostanze e rendono complicato l'utilizzo di farmaci.

I fotorecettori sono neuroni caratterizzati da un'estrema specializzazione cellulare e intervengono nello step iniziale della visione, convertendo lo stimolo luminoso in un segnale elettrico: più precisamente, lo stimolo luminoso viene trasmesso dai fotorecettori alle cellule bipolari e successivamente alle cellule gangliari. Queste cellule sono localizzate nella parte posteriore della retina, con i nuclei situati nello strato nucleare esterno della retina, e sono adiacenti all'EPR.

Nella retina sono presenti due tipologie di fotorecettori: i coni e i bastoncelli. I bastoncelli presentano una morfologia allungata ed esprimono la rodopsina, una molecola altamente sensibile ai fotoni e sono, per questo, più sensibili alla luce e lavorano quindi in condizioni di minor illuminazione, ma sono più lenti nella generazione di una risposta. I coni, invece, esprimono l'opsina che è deputata alla visione a colori e alla vista in condizioni più luminose ed è più veloce a rispondere allo stimolo.

I fotorecettori sono composti da cinque regioni: un segmento esterno, un cilio connettore, un segmento interno, una regione nucleare e una regione sinaptica. Il segmento esterno rappresenta la componente principale: in quanto contiene un compartimento specializzato nella ricezione della luce e nella conversione dello stimolo in segnale elettrico, nel processo della fototrasduzione. Inoltre, il segmento esterno si rinnova costantemente grazie all'EPR, il quale è coinvolto nella fagocitosi e nel riciclo della rodopsina.

Il segmento esterno dei bastoncelli è una struttura cilindrica costituita da una membrana plasmatica, le cui invaginazioni racchiudono una pila ordinata di dischi membranosi all'interno dei quali sono presenti la rodopsina (codificata dal gene *RHO*), la guanilato ciclasi (che catalizza la sintesi del cGMP), la transducina, la fosfodiesterasi (PDE6), i canali CNG (codificati dai geni *CNGA1* e *CNGB1*) e uno scambiatore $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}\text{-K}^+$. La vicinanza dei canali CNG alle altre proteine della fototrasduzione aumenta l'efficienza del pathway [4].

1.3 Il ruolo del cGMP e del calcio nella fototrasduzione

Come detto precedentemente, il pathway di fototrasduzione permette di trasmettere lo stimolo luminoso e di trasformarlo in un segnale elettrico, che dal nervo ottico arriva fino alla corteccia visiva, portando alla percezione dell'immagine.

La cascata di reazioni dipende fortemente dalla concentrazione dei secondi messaggeri: il cGMP e il Ca^{2+} . Per questo, le mutazioni che colpiscono i geni coinvolti in questo pathway causano la disregolazione di queste molecole, scatenando una serie di processi a valle che possono portare alla morte dei fotorecettori. In particolare, i geni coinvolti e che causano la retinite pigmentosa sono *RHO*, *CNGA1*, *CNGB1*, *PDE6A* e *PDE6B*.

La fototrasduzione coinvolge reazioni successive attivate dall'eccitazione di una molecola di rodopsina da parte di un fotone, che risultano in un segnale elettrico. Le rodopsine sono delle molecole recettrici accoppiate a proteine G e vengono attivate dalla luce in quanto contengono il gruppo prostetico retinale 11-cis, che in seguito all'assorbimento di luce viene trasformato in retinale tutto-trans. Questo passaggio implica un cambiamento conformazionale del recettore che si attiva ed è in grado di interagire con la transducina, una proteina G. Come conseguenza si verifica il classico meccanismo dei recettori accoppiati a proteine G: quindi, la transducina lega il GTP e la subunità α si stacca dalle subunità $\beta\gamma$ e interagisce con la fosfodiesterasi-6 (PDE6), la quale catalizza l'idrolisi del cGMP.

In condizioni di riposo, quindi al buio, la concentrazione di cGMP intracellulare è sufficiente ad attivare una certa frazione di canali CNG, circa il 3%. Questi canali sono dei canali cationici poco selettivi, che fanno passare sia sodio che calcio, situati nella membrana plasmatica dei bastoncelli, con un sito di legame per il cGMP nel lato intracellulare la cui sensibilità viene modulata da una calmodulina. Quindi, di fatto, in assenza di luce vi è una frazione di canali costantemente aperta, questo garantisce un flusso di sodio verso l'interno della cellula e la membrana dei bastoncelli risulta abbastanza depolarizzata: presenta un potenziale di membrana attorno a -30/-35 mV. Oltre ai canali CNG, sono presenti anche delle pompe che pompano il calcio e il sodio (e il potassio) all'esterno della cellula per riequilibrare le concentrazioni.

Quando arriva la luce, la rodopsina attiva la PDE6, il cGMP viene idrolizzato e la sua concentrazione diminuisce così come la frazione di canali CNG aperti. Questo determina un'iperpolarizzazione della cellula, non essendoci più un flusso entrante di sodio e calcio; la quale, a sua volta, porta alla cessazione del rilascio di glutammato nella sinapsi del fotorecettore. Inoltre, la chiusura dei CNGC abbassa la concentrazione del calcio nel segmento esterno stimolando la produzione di cGMP. Riassumendo, la regolazione dei livelli intracellulari di Ca^{2+} è importante per la sopravvivenza dei fotorecettori: esiste una regolazione a feedback per cui i canali CNG cGMP-dipendenti comportano l'ingresso di Ca^{2+} che a sua volta limita la sintesi di cGMP.

Il processo appena descritto è rappresentato in *Figura 1*.

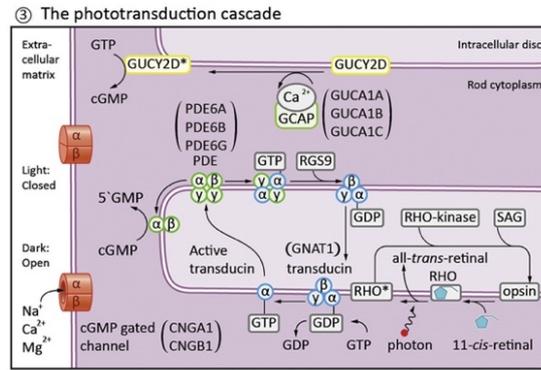


Figura 1. Descrizione schematica del pathway di fototrasduzione.
Adattata da Verbakel et al., "Non-syndromic retinitis pigmentosa" 2018

Durante il periodo in cui la rodopsina rimane attivata dal singolo fotone, questa interagisce con 500 molecole di proteina G. Queste molecole di transducina attivano, a loro volta, 500 PDE6; le quali canalizzano l'idrolisi di 105 molecole di cGMP. La concentrazione di cGMP all'interno della cellula diminuisce in modo tale da chiudere 250 CNGC e determinare un'iperpolarizzazione di 1 mV. Quindi, in ogni step della fototrasduzione, il segnale luminoso viene amplificato rendendo i bastoncelli molto sensibili ai fotoni.

Dopo la fototrasduzione il sistema ritorna allo stato di pre-attivazione.

1.4 Le linee cellulari per lo studio delle malattie oculari

Il fine di questo studio è quello di sviluppare un nuovo modello cellulare per poter svolgere studi molecolari in vitro sulla retinite pigmentosa, più precisamente per analizzare l'effetto dei farmaci contro la degenerazione dei bastoncelli colpiti dalla retinite pigmentosa. Come detto precedentemente, i fotorecettori sono dei neuroni post-mitotici che non sono perciò in grado di autorigenerarsi e quindi non è possibile generare una linea cellulare a partire da un fotorecettore adulto.

A questo scopo, sono state sviluppate delle procedure per la differenziazione in vitro di cellule retiniche staminali. Tra queste ci sono le cellule 661W che rappresentano una linea cellulare molto utilizzata per la ricerca sulle distrofie retiniche ereditarie. Queste cellule derivano da un progenitore dei fotorecettori proveniente da un tumore retinico di un topo transgenico: l'organismo esprimeva l'antigene T del virus vacuolizzante della scimmia (SV40) sotto il controllo trascrizionale del promotore della proteina di binding del retinolo degli interfotorecettori, espresso specificatamente nei coni e bastoncelli. Le cellule 661W presentano diverse qualità che le rendono un ottimo modello per lo studio della RP, difatti esprimono i geni dei precursori dei bastoncelli, crescono in monostrato ed è possibile indurre la differenziazione ed effettuare modifiche genetiche; nonostante ciò, è necessaria una linea cellulare con un'espressione maggiore di geni specifici per i bastoncelli per svolgere anche screening mirati di farmaci.

CAPITOLO 2: APPROCCI SPERIMENTALI E RISULTATI

2.1 Generazione e selezione di un nuovo clone

Lo scopo di questo studio era quello di ottenere un nuovo modello cellulare per poter condurre studi molecolari in vitro sulla retinite pigmentosa e svolgere analisi ad alto rendimento sui farmaci neuroprotettivi. A questo fine, è stata trasformata la linea cellulare 661W in modo tale che assumesse caratteristiche tipiche dei fotorecettori.

2.1.1 Costruzione del vettore retrovirale

Per poter fare questo è stato utilizzato il vettore pLXSN, un vettore retrovirale che permette la co-espressione di un gene di interesse e di un *marker* di resistenza alla neomicina per la selezione delle cellule trasdotte. Il gene *target* clonato in questo caso è il gene murino *NRL* (*neural retina leucine zipper*), che è stato inserito nel *multiple cloning site* tra i siti di restrizione EcoRI e XhoI. Il gene *NRL* fa parte della sottofamiglia Maf e la struttura del *binding domain* contiene un motivo a *leucine zipper*. Il gene codifica i fattori di trascrizione nucleari altamente espressi nella retina, preferenzialmente nei bastoncelli, e che agiscono durante lo sviluppo retinico e sono coinvolti nel differenziamento di questa tipologia di fotorecettori: modulano l'espressione dei geni specifici per i bastoncelli e inibiscono i geni per i coni attraverso l'attivazione di *NR2E3*. In particolare modo *NRL* agisce sui promotori di molti geni aumentandone l'espressione, tra i quali si distinguono la rodopsina e la subunità β della PDE6. Inoltre, mutazioni missenso in questo gene sono correlate con la forma autosomica dominante della retinite pigmentosa. In questo modo è stato quindi prodotto un retrovirus a replicazione incompetente, contenente il gene *NRL* e resistente alla neomicina. È stato utilizzato un retrovirus in quanto si può integrare stabilmente nel genoma in modo casuale ed è stato reso difettivo per la replicazione inserendo il cDNA del gene *target* all'interno delle sequenze codificanti le proteine necessarie per la propria replicazione.

2.1.2 Trasduzione delle cellule

Le cellule, quindi, sono state trasdotte e selezionate attraverso la resistenza alla neomicina. Inoltre, per verificare l'effettiva trasduzione sono state analizzate attraverso la RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) per controllare l'espressione degli mRNA di *NRL* e *RHO* (codificante la rodopsina). Sono state quindi confrontate le cellule trasdotte con le cellule originali e un controllo negativo privo del cDNA. La RT-PCR è una metodica che permette di convertire le molecole di RNA in DNA complementare (cDNA), attraverso l'utilizzo di una trascrittasi inversa (RT) e di amplificare il DNA ottenuto. I prodotti di amplificazione sono poi stati fatti correre in un gel elettroforesi e, come si può vedere in *Figura 2*, le cellule 661W trasdotte esprimevano correttamente i geni *NRL* e *RHO*, al contrario delle cellule 661W utilizzate come controllo. Inoltre, è stato

utilizzato il gene *RPS26*, codificante la proteina ribosomale S26, come controllo di riferimento.

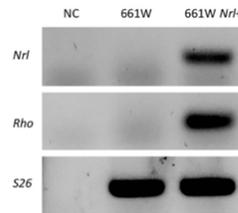


Figura 2. Risultati della corsa elettroforetica. Nel primo pozzetto è presente il controllo negativo (privo di cDNA, non è avvenuta la retrotrascrizione), nel secondo il cDNA delle cellule 661W e nel terzo il cDNA delle cellule trasdotte.

2.1.3 Generazione della linea cellulare monoclonale e selezione del clone

Dopo aver verificato il successo della trasduzione è stata ottenuta la linea cellulare monoclonale attraverso *limiting dilution*, una metodica che permette di generare dei cloni che mantengono stabile l'espressione del transgene, a partire da un *pool* di cellule policlonali. Questo è necessario poiché la trasduzione delle cellule effettuata con l'utilizzo di un retrovirus porta alla produzione di una popolazione eterogenea, all'interno della quale l'espressione del gene *target* potrebbe diminuire con il tempo a causa della pressione selettiva attuata dai cloni caratterizzati da un'espressione inferiore.

Successivamente, è stata osservata l'espressione di *NRL* anche nei singoli cloni, sempre attraverso RT-PCR, per poter selezionare quelli in cui almeno un *target* di *NRL* risultava up-regolato. Di tutti i cloni ottenuti, solamente 11 presentavano questa caratteristica e sono, perciò, stati sottoposti a ulteriori analisi di RT-PCR per poter selezionare i cloni migliori.

Solo 5 cloni confermavano l'espressione dei *targets* di *NRL* e di altri geni specifici dei bastoncelli (*RHO*, *GNATI*, *CNGB1*, *CNGA1*, *PDE6B*). Il risultato dell'amplificazione, visualizzato tramite elettroforesi rappresentata in Figura 3, mostra differenti espressioni dei geni specifici per i bastoncelli nei 5 diversi cloni: ad esempio, il gene codificante la subunità 1 α dei canali CNG è molto poco espresso nel clone B4, al contrario dei cloni A5 e B10 che invece mostrano una banda più marcata; inoltre, il clone A10 è caratterizzato da una bassa espressione dei geni codificanti la subunità α della transducina, le subunità 1 α e 1 β dei canali CNG e la subunità β della PDE.

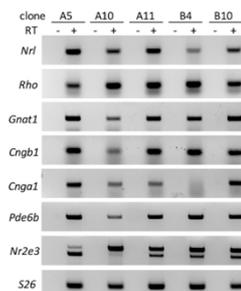


Figura 3. Corsa elettroforetica dei 5 cloni che confermano l'espressione dei targets di *NRL* e dei geni specifici per i bastoncelli. Per ogni clone è presente il controllo negativo (in cui non è avvenuta la retrotrascrizione dell'mRNA).

Infine, ognuno di questi cloni mostrava anche una differente capacità di propagazione in vitro; per questo è stato scelto solamente un clone: l'A11, caratterizzato da un'efficiente capacità di propagazione.

2.2 La caratterizzazione delle cellule 661W-A11

Dopo aver selezionato il clone 611W-A11, sono state svolte ulteriori analisi per caratterizzarlo al meglio e verificarne la similarità con i bastoncelli.

2.2.1 RT-qPCR per l'analisi dell'espressione genica

In primo luogo, tramite qPCR (PCR quantitativa o *Real-Time PCR*), sono stati quantificati i livelli di espressione di geni specifici sia per i bastoncelli che per i coni confrontando il clone 611W-A11 con le cellule di origine 611W. Come si può vedere nei grafici che riportano le espressioni relative dei geni, rappresentati nella *Figura 4*, il clone 661W-A11 mostra una maggiore espressione dei geni per i bastoncelli, soprattutto per i geni codificanti la RHO e la CNGB1. Mentre i geni specifici per i coni presentano un'espressione del tutto simile nelle due linee cellulari.

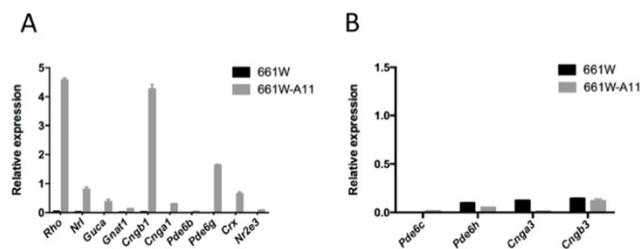


Figura 4. (A) Espressioni relative dei trascritti dei geni specifici per i bastoncelli nelle cellule 661W e 661W-A11. (B) Risultati dei trascritti dei geni specifici per i coni.

In tutte queste reazioni di PCR sono stati utilizzati diversi primer specifici per i geni dei bastoncelli e *targets* del fattore di trascrizione NRL, come la rodopsina, le subunità della transducina e dei canali CNG e la fosfodiesterasi.

2.2.2 Western Blot e Immunofluorescenza per l'analisi proteica

Secondariamente, i precedenti risultati relativi all'espressione dei geni specifici per i bastoncelli sono stati confermati anche dalle analisi svolte a livello proteico. Attraverso un'analisi di immunoblotting sono stati controllati i livelli di espressione della rodopsina, della subunità β della fosfodiesterasi-6 e della subunità $\alpha 1$ del canale CNG. In *Figura 5* sono riportati i risultati del Western blot, in cui è evidente la maggior espressione di queste proteine nel clone 661W-A11, rispetto alle cellule di riferimento 661W. Per la rilevazione dell'espressione sono stati utilizzati anticorpi specifici per le proteine di interesse: quindi, anti-RHO, anti-PDE6B e anti-GNAT1. La rilevazione del risultato è stata svolta in chemiluminescenza, quindi con l'utilizzo di un anticorpo secondario coniugato con un enzima e un substrato chemiluminescente. I risultati sono stati normalizzati attraverso l'utilizzo di

proteine *housekeeping*; quindi, con la vinculina, per quanto riguarda la RHO e la GNAT1, e con l' α -tubulina, per la PDE6B.

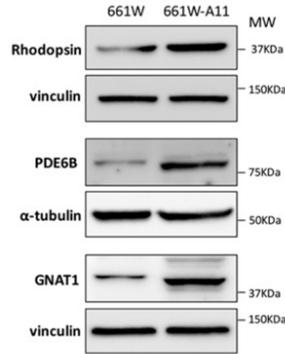


Figura 5. Western Blot delle proteine specifiche dei bastoncelli e delle proteine per la normalizzazione.

Invece, mediante un'analisi di immunofluorescenza (i cui risultati sono visibili nella Figura 6) sono state determinate le localizzazioni subcellulari di espressione di queste proteine. Inoltre, si è potuto evidenziare la struttura cellulare dei cloni selezionati i quali mostrano una morfologia allungata tipica dei bastoncelli. In questo esperimento è stata condotta un'immunofluorescenza indiretta, con l'utilizzo di due anticorpi: anticorpi primari, ognuno specifico per ciascuna proteina, e due anticorpi secondari, un anti-rabbit e un anti-mouse, coniugati con due fluorofori differenti.

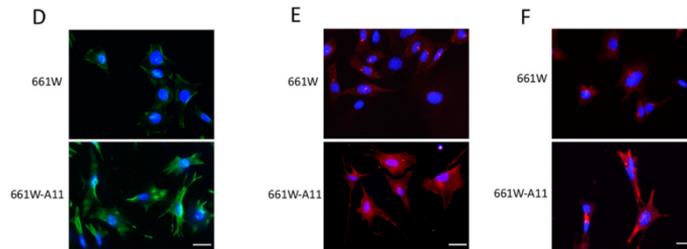


Figura 6. Immunofluorescenza delle proteine specifiche per i bastoncelli. (D) In verde è in evidenza la RHO. (E) In rosso, è presente la PDE6B. (F) In rosso, la GNAT1. I nuclei, marcati con il DAPI, sono visibili in blu.

2.3 Simulazione della degenerazione in vitro dei fotorecettori

2.3.1 Pathway di morte cellulare cGMP-dipendenti

Come detto precedentemente, tra i geni maggiormente colpiti da mutazioni e che causano la retinite pigmentosa è presente quello che codifica la fosfodiesterasi-6. Infatti, mutazioni *loss of function* in questo gene comportano il malfunzionamento dell'enzima, il quale non è più in grado di idrolizzare il cGMP, ed essendo la PDE6 altamente coinvolta nel processo della fototrasduzione questo comporta la degenerazione dei fotorecettori. Gli alti livelli di cGMP sono tossici per la cellula, in quanto causano l'attivazione di diversi target intracellulari che intervengono nella morte cellulare. I target principali del cGMP sono due: il messaggero può attivare la protein-chinasi cGMP-dipendente (PKG), la quale causa la fosforilazione di diverse proteine; oppure, può legare i canali CNG che si aprono permettendo

l'ingresso di calcio, il quale riveste un ruolo importante nella patogenesi della retinite pigmentosa. Entrambi questi pathway, sia che si presentino assieme che individualmente, possono condurre il fotorecettore alla morte.

2.3.2 Induzione della degenerazione cellulare e saggio della vitalità cellulare

Perciò, per simulare l'alterazione del funzionamento della PDE6, entrambe le linee cellulari, sia 661W che il clone 661W-A11, sono state trattate con lo Zaprinast: un inibitore delle PDE che presenta un effetto specifico sulla PDE6. È stata, quindi, condotta un'analisi sulla vitalità cellulare, basata sul saggio MTT, trattando le due linee cellulari con concentrazioni crescenti di Zaprinast.

L'MTT permette di analizzare la vitalità cellulare misurando l'attività metabolica delle cellule, per determinare, tra le altre applicazioni, la citotossicità dei farmaci. Si tratta di un saggio colorimetrico basato sull'utilizzo di MTT, il quale viene ridotto a formazano, ottenendo una soluzione di colore viola: più è scura la soluzione e maggiore è il numero di cellule metabolicamente attive. La vitalità cellulare viene quantificata misurando l'assorbanza della soluzione.

La vitalità delle cellule utilizzate come controllo (trattate con 0 μ M di Zaprinast) è stata settata al 100%; mentre per rilevare la morte cellulare nelle cellule 661W e 661W-A11 è stata scelta la minor concentrazione necessaria a determinare una diminuzione estremamente significativa ($p < 0.001$) della vitalità: 400 μ M. Nel grafico presente in *Figura 7*, sono visibili le percentuali relative alla vitalità cellulare alle differenti concentrazioni; in particolare a 400 μ M di Zaprinast per le cellule 661W si è osservata una riduzione della vitalità del 25%, mentre per le cellule 661W-A11 questa è stata del 30%.

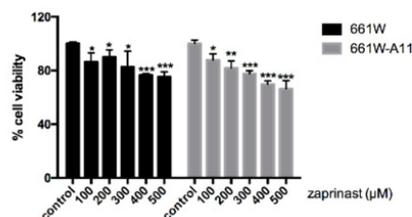


Figura 7. Saggio di vitalità cellulare basato sull'MTT. Il controllo è rappresentato dalle cellule trattate con 0 μ M di Zaprinast, la cui vitalità è stata settata al 100%.

È stato successivamente determinato l'effetto dell'esposizione a 400 μ M di Zaprinast per 24 ore attraverso il TUNEL assay.

Questa tecnica permette di identificare le cellule in apoptosi, attraverso l'utilizzo di una transferasi (TdT) che catalizza l'aggiunta di dUTPs marcati in prossimità delle rotture del DNA che avvengono durante il processo di apoptosi.

Anche in questo caso, sono state confrontate le cellule 661W e il clone 661W-A11, entrambi trattati con il controllo (DMSO) e lo Zaprinast. Nelle immagini riportate in alto in *Figura 8* sono visibili le cellule in apoptosi; mentre a destra è visibile la quantificazione delle cellule in apoptosi avvenuta contando le cellule in cui è avvenuto il *labeling* sul totale delle cellule presenti, individuate attraverso la marcatura del nucleo con il DAPI. Tra le cellule 661W solamente il 9% è andato

incontro a morte cellulare; mentre nel clone 661W-A11, la percentuale è salita al 14%.

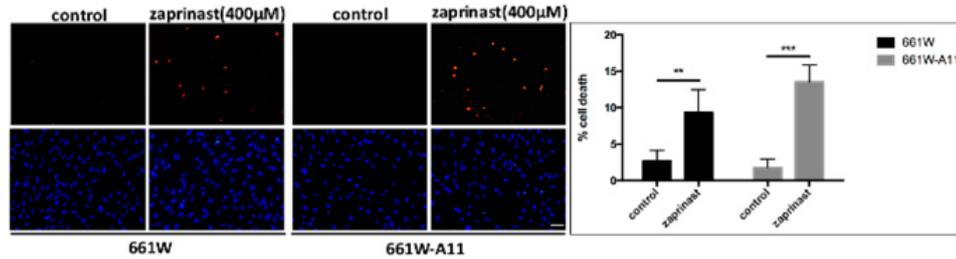


Figura 8. Saggio TUNEL per l'identificazione delle cellule in apoptosi. In alto, colorate in rosso, ci sono le cellule TUNEL+ in apoptosi; in basso sono evidenti i nuclei marcati con il DAPI. Le cellule utilizzate come controllo sono state tratta con il DMSO.

2.3.3 Determinazione della funzione dello Zaprinast

Successivamente, sono state calcolate le concentrazioni del calcio e del cGMP per dimostrare che lo Zaprinast permette effettivamente di mimare in vitro la degenerazione della PDE6; infatti, queste dovrebbero risultare in eccesso rispetto alle normali condizioni cellulari. Le concentrazioni delle molecole sono state analizzate mediante citometria a flusso.

I livelli di cGMP sono stati riscontrati con l'utilizzo di un anticorpo primario anti-cGMP, il quale lega specificatamente questo messaggero, e con un anticorpo secondario anti-sheep coniugato con il fluoroforo Alexa Fluor 488; mentre il calcio è stato marcato con il *marker* Fluo-4 AM. Sono state quindi confrontate le cellule 661W-A11 trattate con il controllo (DMSO) e i cloni trattati per 24h con 400μM di Zaprinast.

La citofluorimetria a flusso è una tecnica che permette di ottenere contemporaneamente diverse informazioni da una popolazione cellulare, anche eterogenea. Si utilizzano dei marker specifici (in questo caso per il cGMP e per il Ca^{2+}) con i quali è possibile rilevare la fluorescenza colpendo le cellule con un laser, che in questa situazione eccita le cellule con una lunghezza d'onda di 488 nm.

I risultati sono riportati negli istogrammi presenti nella *Figura 9*, in cui sono visibili le intensità medie di fluorescenza dei marcatori per il cGMP e per il Ca^{2+} che risultano essere più elevate nelle cellule trattate con lo Zaprinast rispetto al controllo.

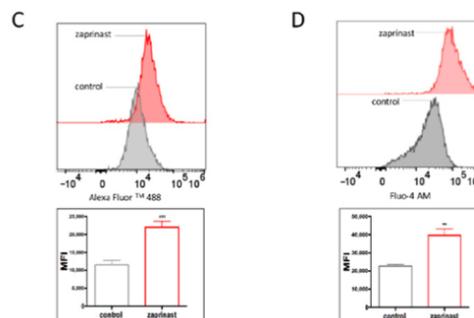


Figura 9. Citometria a flusso. (C) Differenza di concentrazione di cGMP nelle cellule utilizzate come controllo (trattate con il DMSO) e nelle cellule trattate con 400μM di Zaprinast. (D) Risultati riferiti al calcio, le due popolazioni le cellule sono state sottoposte alle stesse condizioni.

In conclusione, attraverso questi esperimenti è stato possibile affermare che lo Zaprinast blocca l'attività della PDE6 in quanto vi è un aumento significativo delle concentrazioni di calcio e di cGMP.

3.3.4 Coinvolgimento del calcio nella degenerazione cellulare e il diltiazem

Un altro potenziale bersaglio del cGMP è rappresentato dai canali CNG e il conseguente flusso di calcio all'interno della cellula, la cui regolazione della concentrazione intracellulare è fondamentale per la sopravvivenza dei neuroni.

Nei fotorecettori, in particolar modo, sono presenti due tipologie di canali attraverso cui il calcio entra nella cellula: i canali CNG e i canali del calcio voltaggio-dipendenti di tipo L (Cav1.4) (VGC). Gli unici canali che si trovano nel segmento esterno dei bastoncelli sono i canali cationici CGN dipendenti dal cGMP; nei bastoncelli questi canali sono formati dalle due subunità CNGA1 e CNGB1 e mutazioni in queste subunità causano la retinite pigmentosa. Inoltre, sono presenti i VGCC e il flusso del calcio attraverso questi controlla il rilascio delle vescicole contenenti il glutammato nei terminali sinaptici; per questo, le mutazioni che coinvolgono questi canali provocano una diminuzione nel rilascio sinaptico. Così come accade negli altri tessuti, anche nei fotorecettori i canali del calcio voltaggio dipendenti sono sensibili alle diidropiridine e alle benzodiazepine, come il diltiazem.

L'aumento delle concentrazioni di calcio che causano la degenerazione del fotorecettore può essere mediato dal cGMP che agisce direttamente sui canali CNG oppure indirettamente sui canali VGC. Inoltre, gli effetti neurotossici dell'azione della protein-chinasi cGMP-dipendente possono dipendere dai CNGC la cui conduttanza viene regolata dalla fosforilazione da parte della PKG.

A fronte di questo, il quesito seguente che si sono posti i ricercatori era quello di determinare come il calcio entra nella cellula e vi si accumula.

Per questo le cellule sono state trattate con lo Zaprinast e con il D-*cis*-diltiazem, un bloccante dei canali del calcio voltaggio-dipendenti di tipo L, e successivamente è stato quantificato il calcio intracellulare, sempre attraverso l'analisi di citometria a flusso marcando il calcio con il *marker* Fluo-4AM.

Quindi, una parte dei cloni 661W-A11 è stata pretrattata con il D-*cis*-diltiazem e poi stressata con lo Zaprinast. In questo caso, i risultati riportati nei grafici in *Figura 10* mostrano che vi è una diminuzione dell'ingresso di calcio all'interno delle cellule trattate con il diltiazem; il quale ritorna anche agli stessi livelli riscontrati nelle cellule trattate con il controllo.

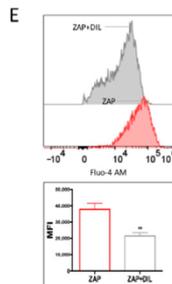


Figura 10. Citometria a flusso. Rilevazione di calcio nelle cellule trattate solamente con lo Zaprinast e nelle cellule trattate anche con il diltiazem.

Infine, è stata anche valutata l'attività della calpaina, la cui attività è correlata con l'aumento della concentrazione di calcio. Tramite un *Western Blot* sono stati osservati gli effetti della calpaina sul substrato di α II-spettrina che viene scissa. I risultati dell'*immunoblot*, visibili in Figura 11, evidenziano l'aumento dei frammenti di 145-150 kDa nelle cellule 661W-A11 trattate con lo Zaprinast, rispetto alle cellule trattate con il controllo (DMSO). La normalizzazione è avvenuta con l'utilizzo dell' α -tubulina.

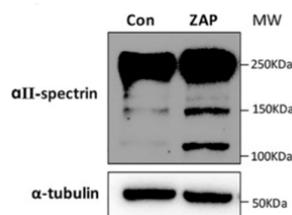


Figura 11. Western Blot degli effetti della calpaina sull' α II-spettrina. L' α -tubulina è stata utilizzata per la normalizzazione dei risultati.

3.3.5 Coinvolgimento della PKG nella degenerazione cellulare

Oltre all'accumulo di calcio, esiste anche un secondo pathway di morte cellulare, il quale coinvolge l'attivazione della protein-chinasi cGMP dipendente (PKG), rivestendo un ruolo importante nella morte cellulare.

Questa proteina è presente in tre isoforme differenti: PKG1 α , PKG1 β , PKG2; codificate da due geni: *PRKG1* e *PRKG2*. La chinasi fosforila i componenti dei canali ionici, delle proteine G-trimeriche e le proteine del citoscheletro che regolano le funzioni neuronali, oltre a quelle cardiovascolari e intestinali.

Paquet-Durant et al. nel loro studio [5] hanno esaminato il ruolo della PKG nella degenerazione dei bastoncelli in diversi modelli murini *rd1*, i quali presentano una mutazione nel gene *PDE6B* che rende la PDE6 non funzionante aumentando i livelli di cGMP. I ricercatori hanno riscontrato che l'azione della chinasi è necessaria e sufficiente per causare la degenerazione dei fotorecettori e inoltre la sua inattivazione ha mostrato un effetto neuroprotettivo.

La correlazione tra l'attivazione della PKG e la degenerazione retinica è stata dimostrata anche da Wang et al. [6], che hanno utilizzato un modello murino che presentava una mutazione *loss of function* nei geni codificanti i canali CNG e privo del gene *PRKG1*, dimostrando un rallentamento nella degenerazione dei bastoncelli.

I ricercatori Huang et al. hanno quindi controllato i livelli della proteina nei due diversi modelli cellulari. Mediante analisi di *gene expression*, attraverso una *Real-Time qPCR*, sono stati valutati i livelli dei trascritti delle tre isoforme della chinasi. Questi si sono rilevati maggiori nei cloni 661W-A11, rispetto alle cellule 661W, come si vede nei grafici in *Figura 12*; in particolar modo è stata dimostrata una maggiore espressione dei geni *PRKG1* e *PRKG2* nelle cellule 661W-A11.

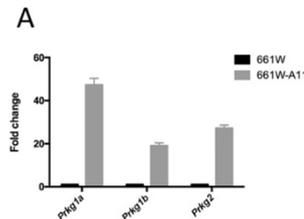


Figura 12. Real-Time qPCR. Confronto del fold change dell'espressione dei trascritti delle tre isoforme della PKG, delle cellule 661W e 661W-A11.

L'attivazione della PKG è stata successivamente verificata quantificando lo stato di fosforilazione di due *target* della proteina: la fosforilazione di VASP nella serina 239 e di RhoA nella serina 188. Per fare questo sono stati condotti degli esperimenti di immunoblotting sulle cellule 661W-A11 trattate con lo Zaprinst e comparate con le cellule non trattate. I risultati sono visibili nelle *Figure 13*: l'espressione dei *targets* della PKG è maggiore nelle cellule trattate con lo Zaprinst a dimostrazione della sua attivazione nei fotorecettori degenerati. I risultati sono stati normalizzati con la vinculina, per quanto riguarda la VASP fosforilata (P-VASP), e con l' α -tubulina, per la RhoA fosforilata (P-RhoA).

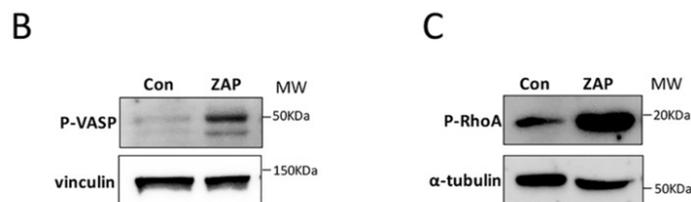


Figura 13. Western Blot dei target fosforilati della PKG. (B) Confronto tra la P-VASP del controllo (trattate con DMSO) e delle cellule trattate con lo Zaprinst; la vinculina è stata utilizzata per la normalizzazione. (C) Confronto tra la P-RhoA del controllo e delle cellule trattate; l' α -tubulina è stata utilizzata per la normalizzazione.

Per poter utilizzare lo Zaprinst nei modelli di degenerazione dei bastoncelli, era anche necessario dimostrare che induce la degenerazione dei fotorecettori in vitro allo stesso modo di come accade in vivo.

Con questo scopo i ricercatori hanno trattato i due modelli cellulari con due analoghi del cGMP che attivano la PKG: PA5 e PA6; il primo attiva specificatamente l'isoforma PKG2, mentre il secondo le isoforme PKG1 α e PKG1 β . Sono state svolte due analisi di vitalità cellulare basate sull'MTT trattando le cellule 661W e 661W-A11 con concentrazioni crescenti di PA5 e di PA6. Come si può vedere nei grafici nella *Figura 14*, la vitalità delle cellule 661W non è particolarmente compromessa dalla PKG; al contrario, i cloni 661W-A11 sono particolarmente sensibili all'attivazione della chinasi, che dimostra la sua tossicità.

Inoltre, è possibile osservare che la molecola PA6 ha un maggiore effetto nella morte di queste cellule, dimostrando un maggior coinvolgimento delle isoforme PKG1 α e PKG1 β .

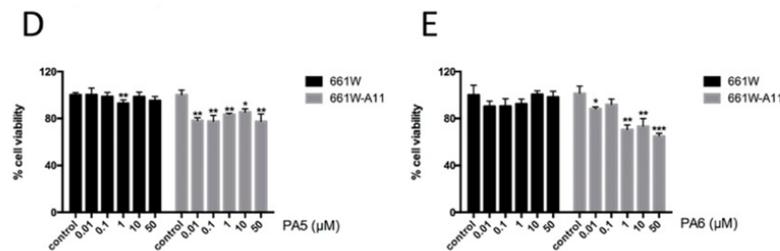


Figura 14. Test di vitalità cellulare basato sull'MTT. (D) Risultato delle cellule trattate con PA5. (E) Risultato delle cellule trattate con PA6. Il controllo è rappresentato dalle cellule trattate con H₂O, la cui vitalità è stata settata al 100%.

2.4 Validazione del modello in vitro per lo screening farmaceutico

In svariati studi precedenti sono stati analizzati gli effetti neuroprotettivi di differenti farmaci nei modelli di degenerazione retinica 661W e *rd1*. Sono stati infatti identificati i *targets* di alcune possibili strategie terapeutiche all'interno dei pathway che portano alla degenerazione dei fotorecettori.

Ad esempio, gli elevati livelli di calcio intracellulare sono tossici per i fotorecettori e perciò la riduzione della sua concentrazione può rappresentare una soluzione terapeutica. A questo scopo, il fattore dell'epitelio pigmentato retinico (PEDF), in particolare attraverso l'interazione del dominio 17-mer con il recettore PEDF-R, può diminuire la concentrazione di calcio nei primi passaggi del pathway di degenerazione e ritardare la morte dei fotorecettori. Queste molecole agiscono sulle pompe PMCA, situate nella membrana plasmatica, ne aumentano l'attività e favoriscono l'uscita di calcio dalla cellula. Inoltre, la diminuzione del calcio mediata dall'azione di PEDF contribuisce all'attenuazione delle calpaine; le quali si attivano sia in conseguenza all'aumento citosolico di calcio che in modo dipendente dal cGMP e dalla PKG. Anche le calpastatine proteggono in vivo i fotorecettori dalla degenerazione, in quanto sono degli inibitori delle calpaine. Infine, è stato dimostrato che anche CN03, una molecola analoga al cGMP, limita le attività della chinasi e dei canali CNG proteggendo i fotorecettori e ritardandone in modo significativo la degenerazione.

Per questo, questi farmaci sono stati tutti verificati anche nella nuova linea cellulare 661W-A11. È stata quindi confrontata la vitalità delle cellule trattate solamente con lo Zaprinst e dei cloni trattati anche con i farmaci neuroprotettivi e i risultati ottenuti da questi esperimenti confermano gli esiti dei precedenti studi svolti su modelli cellulari differenti.

Nel grafico rappresentato in *Figura 15A* sono presenti i risultati del *TUNEL assay* e vengono mostrate le percentuali di morte cellulare dei cloni 661W-A11 trattati con il controllo (DMSO) e delle cellule trattate con lo Zaprinst e con l'analogo di cGMP. È evidente il successo della molecola CN03 nel proteggere i cloni dalla

degenerazione cellulare in quanto presentano una percentuale di morte inferiore: questa è pari a circa il 10%, contro il 15% delle cellule non trattate con molecole neuroprotettive.

Nel grafico in *Figura 13B* sono riportate le percentuali di vitalità cellulare, valutate attraverso l'*MTT assay*, delle cellule trattate con la calpastatina e con PEDF confrontate con i cloni trattati con il controllo (sempre DMSO) e con lo Zaprinst. In questo caso, il 25% delle cellule trattate con lo Zaprinst va incontro a degenerazione; mentre i cloni trattati con le molecole con effetti neuroprotettivi presentano una vitalità cellulare che oscilla tra l'85% e il 95%.

In entrambi i casi, le cellule sono state trattate dapprima con diverse concentrazioni delle molecole indagate per i loro effetti neuroprotettivi e poi stressate con lo Zaprinst. Tutti i risultati ottenuti sono significativi in quanto il *p-value* è inferiore a 0.05.

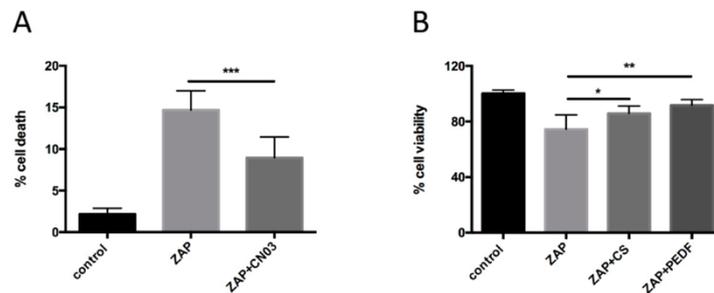


Figura 15. Risultati delle analisi sui farmaci con effetto neuroprotettivo. (A) Risultati del TUNEL assay sulle cellule trattate con il controllo (DMSO), con lo Zaprinst e con CN03. (B) Risultati dell'MTT assay condotto sul controllo (DMSO), sulle cellule trattate con lo Zaprinst e sulle cellule trattate anche con la calpastatina e con il fattore dell'epitelio pigmentato retinico; la vitalità delle cellule di controllo è stata settata al 100%.

CAPITOLO 3: DISCUSSIONE CRITICA

In questo studio è stata sviluppata una nuova linea cellulare che presenta caratteristiche specifiche dei bastoncelli e in cui può essere indotta l'attivazione dei pathway di morte cellulare. Ciò avviene attraverso l'inibizione della fosfodiesterasi-6, la quale provoca l'aumento dei livelli di cGMP e calcio.

Le cellule 661W-A11 possono quindi essere utilizzate come modello cellulare alternativo per gli studi in vitro della degenerazione dei bastoncelli nella RP, nelle altre malattie ereditarie della retina che coinvolgono un incremento di cGMP intracellulare e per l'identificazione di nuovi farmaci.

3.1 Scelta del clone più adatto da sottoporre alle analisi

I ricercatori, dopo aver ottenuto i singoli cloni, li hanno sottoposti ad analisi di RT-PCR per poter selezionare la cellula migliore per l'espressione dei geni specifici per i bastoncelli e coinvolti nel pathway di fototrasduzione: *RHO*, *GNAT1*, *CNGB1*, *CNGA1*, *PDE6B*. Per questo è stata controllata l'espressione di questi geni in 5 differenti cloni e come visibile nell'elettroforesi in *Figura 3*, i cloni A11 e B10 mostrano espressioni del tutto simili, fatta eccezione per il gene della subunità 1α dei canali CNG.

Nonostante l'espressione favorevole dei geni per la creazione di cellule con caratteristiche simili ai bastoncelli, non tutti i cloni si propagavano in modo efficiente in vitro: per questo è stato scelto solamente il clone A11. Comunque, sarebbe stato interessante svolgere le analisi sulla simulazione della degenerazione dei bastoncelli e, soprattutto, sull'efficacia dei farmaci neuroprotettivi su due tipologie di cloni differenti per poter confrontare i risultati ottenuti nelle diverse condizioni. Questo, inoltre, avrebbe permesso di correlare in modo preciso il fenotipo ottenuto in conseguenza all'utilizzo di determinate molecole, assicurando delle conclusioni più solide, eliminando la variabilità a cui può essere sottoposto il singolo clone: infatti, lo Zaprinas, il diltiazem e i farmaci con effetti neuroprotettivi potrebbero agire diversamente.

3.2 Il diltiazem e l'effetto neuroprotettivo

Un primo studio svolto da Frasson e colleghi [7], aveva suggerito l'utilizzo del D-*cis*-diltiazem per prevenire la degenerazione dei bastoncelli, causata dall'aumento della concentrazione di cGMP, in un mutante murino *rd1*. Il D-*cis*-diltiazem è un farmaco benzodiazepinico, già utilizzato per curare l'ipertensione, e che è in grado anche di permeare nella retina, bloccare i canali voltaggio dipendenti e interagire con i canali CNG. Fino ad allora, si pensava che l'unico target del D-*cis*-diltiazem, fossero i VGCC e che avesse, invece, solamente un'attività moderata sui CNGC. Quindi, i ricercatori assunsero che si potesse evitare la degenerazione dei fotorecettori bloccando i canali Cav1.4: il flusso di calcio che porta alla morte i fotorecettori è causato dall'attivazione dei CNGC che depolarizzano la cellula e di

conseguenza aumenta il flusso dello ione per via sinaptica attraverso i canali voltaggio dipendenti di tipo L.

Però, l'effetto neuroprotettivo del D-*cis*-diltiazem sui modelli per la RP rimane contraddittorio; in quanto, in studi successivi non è stato possibile riprodurre i medesimi effetti neuroprotettivi del D-*cis*-diltiazem.

Infatti, il diltiazem esiste in due enantiomeri: il D-*cis* e L-*cis*; il primo ha come target i VGCC, mentre il secondo colpisce i CNGC. Quindi, probabilmente, nello studio di Frasson et al. l'effetto neuroprotettivo era dato dal L-*cis*-diltiazem e non dall'enantiomero D-*cis*. A sostegno di questa ipotesi vennero svolti altri due studi condotti con modelli knock-out *rd1*:

- Nello studio condotto da Schon et al. [8], venne deletato il gene *Cacna1f*, codificante la subunità $\alpha 1$ dei canali cationici di tipo L, e non venne riscontrato alcun miglioramento nella vitalità dei fotorecettori: la delezione dei VGCC comporta solamente un ritardo nella degenerazione dei fotorecettori.
- Nello studio svolto da Paquet-Durand et al. [9] vennero inattivati i canali CNG, in quanto privi del gene *CNGB1*, e si verificò un miglioramento della vitalità dei bastoncelli. Infatti, in questa situazione il livello di cGMP rimane comunque elevato a causa della mutazione nella PDE6, ma la funzione e la morfologia dei fotorecettori migliora.

Perciò, comparando i dati ottenuti in questi due studi è lampante l'importanza dei canali CNG nella degenerazione dei fotorecettori, rispetto ai canali VGC. Questi risultati mostrano che l'inibizione dei CNGC è un valido approccio terapeutico per diminuire il flusso di calcio e limitare la morte dei fotorecettori legata ai livelli di cGMP. Inoltre, emerge come è preferibile bloccare entrambe le tipologie di canali per il calcio per generare effetti sinergici che possano rispondere al meglio alla degenerazione dei fotorecettori.

Anche in questo studio di Huang et al. le cellule 661W-A11 sono state trattate con il D-*cis*-diltiazem ed è stata osservata una diminuzione del flusso di calcio indotto dallo Zaprinast: questo dimostra che la maggior parte del calcio intracellulare nei bastoncelli passa attraverso i canali voltaggio-dipendenti di tipo L. Comunque, come detto precedentemente, l'enantiomero D-*cis* del farmaco interagisce blandamente anche con i canali CNG e quindi non è possibile escludere l'effetto del flusso di ioni attraverso di essi.

In conclusione, i ricercatori sostengono che comunque la via d'ingresso principale di calcio all'interno dei fotorecettori rimane rappresentata dai canali voltaggio dipendenti, poiché la diffusione del calcio nei bastoncelli è limitata dalla loro struttura: la diffusione del calcio dal segmento esterno (dove si trovano i canali CNG) al terminale sinaptico (dove avviene il rilascio di glutammato per la segnalazione sinaptica) è lenta e complicata.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Ben-Yosef, T. “*Inherited Retinal Diseases*” *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 13467 doi: 10.3390/ijms232113467
- [2] Daiger, S.P.; Sullivan, L.S.; Bowne, S.J. “*Genes and mutations causing retinitis pigmentosa*” *Clin. Genet.* 2013, 84, 132–141 doi: [10.1111/cge.12203](https://doi.org/10.1111/cge.12203)
- [3] Power, M.; Das, S.; Schütze, K.; Marigo, V.; Ekström, P.; Paquet-Durand, F. “*Cellular mechanisms of hereditary photoreceptor degeneration—Focus on cGMP*” *Prog. Retin. Eye Res.* 2020, 74, 100772 doi: 10.1016/j.preteyeres.2019.07.005
- [4] Molday, R.S.; Moritz, O.L. “*Photoreceptors at a glance*” *J. Cell Sci.* 2015, 128, 4039–4045 doi: 10.1242/jcs.175687
- [5] Paquet-Durand, F.; Hauck, S.M.; Van Veen, T.; Ueffing, M.; Ekström, P. “*PKG activity causes photoreceptor cell death in two retinitis pigmentosa models*” *J. Neurochem.* 2009, 108, 796–810 doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05822.x
- [6] Wang, T.; Tsang, S.H.; Chen, J. “*Two pathways of rod photoreceptor cell death induced by elevated cGMP*” *Hum. Mol. Genet.* 2017, 26, 2299–2306 doi: [10.1093/hmg/ddx121](https://doi.org/10.1093/hmg/ddx121)
- [7] Frasson, M.; Sahel, J.A.; Fabre, M.; Simonutti, M.; Dreyfus, H.; Picaud, S. “*Retinitis pigmentosa: Rod photoreceptor rescue by a calcium-channel blocker in the rd mouse*” *Nat. Med.* 1999, 5, 1183–1187, doi: 10.1038/13508
- [8] Schon, C., Paquet-Durand, F., Michalakis, S., “*Cav1.4 L-type calcium channels contribute to calpain activation in degenerating photoreceptors of rd1 mice*” *PLoS One* 11, 2016 doi: 10.1371/journal.pone.0156974
- [9] Paquet-Durand F, Beck S, Michalakis S, Goldmann T, Huber G, Muhlriedel R, et al. “*A key role for cyclic nucleotide gated (CNG) channels in cGMP-related retinitis pigmentosa*” *Hum Mol Genet.* 2011; 20 (5):941–7. doi: [10.1093/hmg/ddq539](https://doi.org/10.1093/hmg/ddq539)



Article

New In Vitro Cellular Model for Molecular Studies of Retinitis Pigmentosa

Li Huang ¹, Meltem Kutluer ¹, Elisa Adani ¹, Antonella Comitato ¹ and Valeria Marigo ^{1,2,*} 

¹ Department of Life Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Via G. Campi 287, 41125 Modena, Italy; 251360@studenti.unimore.it (L.H.); meltem.kutluer@unimore.it (M.K.); elisa.adani@unimore.it (E.A.); antonella.comitato@unimore.it (A.C.)

² Center for Neuroscience and Neurotechnology, Via Campi 287, 41125 Modena, Italy

* Correspondence: valeria.marigo@unimore.it; Tel.: +39-059-205-5392

Abstract: Retinitis pigmentosa (RP) is an inherited form of retinal degeneration characterized by primary rod photoreceptor cell death followed by cone loss. Mutations in several genes linked to the disease cause increased levels of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and calcium ion influxes. The purpose of this project was to develop a new in vitro photoreceptor degeneration model for molecular studies of RP. 661W cells were genetically modified to stably express the neural retina leucine zipper (NRL) transcription factor. One clone (661W-A11) was selected based on the expression of *Nrl* target genes. 661W-A11 showed a significant increase in expression of rod-specific genes but not of cone-specific genes, compared with 661W cells. Zaprinast was used to inhibit phosphodiesterase 6 (PDE6) activity to mimic photoreceptor degeneration in vitro. The activation of cell death pathways resulting from PDE6 inhibition was confirmed by detection of decreased viability and increased intracellular cGMP and calcium, as well as activation of protein kinase G (PKG) and calpains. In this new in vitro system, we validated the effects of previously published neuroprotective drugs. The 661W-A11 cells may serve as a new model for molecular studies of RP and for high-throughput drug screening.

Keywords: 661W; rod photoreceptor; neuroprotection; retinal degeneration



Citation: Huang, L.; Kutluer, M.; Adani, E.; Comitato, A.; Marigo, V. New In Vitro Cellular Model for Molecular Studies of Retinitis Pigmentosa. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6440. <https://doi.org/10.3390/ijms22126440>

Academic Editor: Robert K. Koenekoop

Received: 7 May 2021
Accepted: 13 June 2021
Published: 16 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Retinitis pigmentosa (RP) is one form of inherited retinal degenerative disease (IRD) causing incurable blindness. It is characterized by the loss of retinal photoreceptor cells, the neurons specialized in converting light stimuli into electrical signals. Two types of photoreceptors are present in the human retina: rod photoreceptors expressing rhodopsin, which is very sensitive to photons, and cone photoreceptors, which express opsins for color vision and sight in daylight. The characteristics of photoreceptors make them unique, specialized cells in the human body [1]. RP is characterized by the primary loss of rods, followed by cone cell death. Inherited mutations in over 70 different genes are linked to RP and these genes are often expressed only in rod photoreceptors [2]. While a high number of different mutations can be detrimental to rod photoreceptors, some common molecular events characterize the progression of photoreceptor cell death and among these is the increase in cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels and in calcium influx [3–6]. Therapeutic approaches for the preservation of diseased photoreceptor cells face several challenges such as the high genetic heterogeneity [2], the impossibility of collecting biopsies from RP patients, the presence of a blood–retina barrier that hinders drug delivery [7] and the lack of an appropriate in vitro model for drug screening. This last issue relates to the fact that photoreceptor cells are postmitotic neurons and cannot regenerate themselves; thus, cell lines cannot be generated from adult photoreceptor cells. All these problems make the study of rod photoreceptors that undergo cell death in RP demanding.

Several retina cell lines exist for the study of inherited eye diseases [8–11]. However, photoreceptor cell lines are quite limited; examples are the human cell lines WERI-Rb1 and Y-79 [12–14]. The origin of these cell lines is retinoblastoma tumors. They are highly transformed with limited characteristics of rod photoreceptors, while expressing some rod-specific genes [15]. Procedures for in vitro differentiation of retinal stem cells into photoreceptors have been developed and have demonstrated that these cells are suitable for drug testing [16–18]. The drawback of this system is the high variability of primary cells that need to be isolated from murine eyes. 661W is the cell line mostly used by researchers working on the retina. This cell line was derived from an immortalized photoreceptor progenitor originating from retinal tumors in transgenic mice. The transgenic mice expressed simian virus 40 (SV40) T antigen under the transcriptional control of the human interphotoreceptor retinol-binding protein (*IRBP*) promoter, a gene expressed specifically in rod and cone photoreceptors [19]. The 661W cell line is considered a good cell model for the study of photoreceptor diseases because it expresses genes of photoreceptor precursors, with expression of some cone photoreceptor genes [20,21]. The expression of rod precursor genes, the growth as a monolayer and the possibility of inducing differentiation with specific treatments and to genetically modify these cells are characteristics that make this cell line a promising model for RP [22,23]. Nevertheless, a cell line with higher expression of rod photoreceptor-specific genes is necessary for the development of high-throughput in vitro drug screening systems for RP.

The regulation of gene expression by specific transcription factors during retinal histogenesis allows the progressive differentiation of the specific retinal cell types composing the retina [24]. One of the master genes during rod photoreceptor differentiation is *Nrl* (*neural retina-specific leucine*), which encodes the basic motif–leucine zipper (bZIP) transcription factor regulating rod-specific genes [25,26]. NRL, together with other two transcription factors, CRX (cone–rod homeobox protein) and NR2E3 (nuclear receptor subfamily 2, Group E, Member 3), acts as an activator for rod photoreceptor-specific genes [27–29]. The requirement of NRL for rod-specific differentiation was demonstrated by the cone-like features of photoreceptors that lack the *Nrl* gene and transformation of cones into rods upon *Nrl* misexpression in transgenic mice [30–32].

In this study, we developed a new in vitro model from 661W cells for the study of RP based on zaprinast treatment of rod-like cells. To induce the expression of rod-specific genes, 661W cells were genetically modified to stably express the NRL transcription factor. We present the molecular characterization of this new cell line and the validation of these cells as a new model for the study of retinal degeneration by mimicking the disease upon treatment with a phosphodiesterase 6 (PDE6) inhibitor, which raises intracellular cGMP. The validity of the cell line for high-throughput screening was confirmed by the effects of previously published neuroprotective drugs.

2. Results

2.1. Generation and Selection of One 661W Clone Expressing *Nrl*

Murine *Nrl* cDNA was cloned in the pLXSN vector, and a replication-incompetent retrovirus was produced and used for transduction of 661W cells. Transduced cells were selected based on their neomycin resistance and analyzed by PCR for expression of *Nrl* and *Rhodopsin* (*Rho*) genes (Figure 1A). After selecting single-cell clones by limiting dilution, *Nrl* expression was assessed on RNA extracted from each cell clone by RT-PCR. Among these, we selected clones in which at least one known *Nrl* target was upregulated. Five clones out of 11 were selected, and we confirmed the expression of the *Nrl* targets and other rod-specific genes, such as *Rho*, *G protein subunit alpha transducin 1* (*Gnat1*), *Cyclic nucleotide gated channel subunit beta 1* (*Cngb1*), *Cyclic nucleotide gated channel subunit alpha 1* (*Cnga1*), *Pde6b* and *Nr2e3* (Figure 1B). However, not all the clones could be efficiently propagated in vitro and, based on this parameter, we chose clone A11, which from now on will be called 661W-A11.

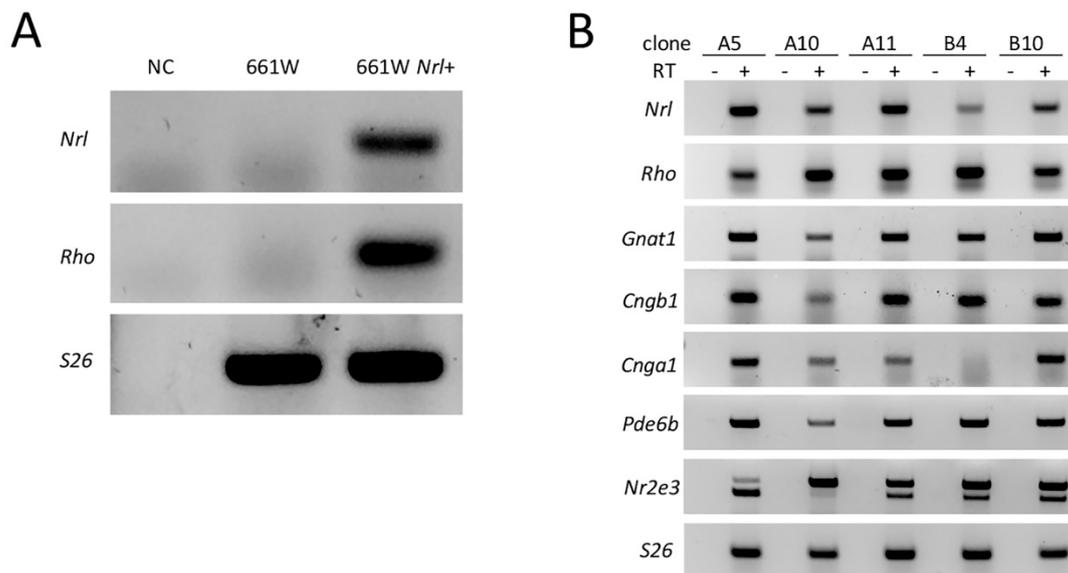


Figure 1. Generation and selection of *Nrl*-expressing 661W cells. **(A)** RT-PCR analysis of *Nrl* and *Rho* mRNA on 661W and 661W *Nrl*+ cells (bulk of retroviral transduced cells). *Ribosomal protein gene RPS26* (*S26*) was analyzed as a reference gene. Expression of *Nrl* and *Rho* was confirmed in 661W transduced cells but not 661W cells. NC: negative control without cDNA (retrotranscription –). **(B)** Five clones showed differential expression of rod-specific genes when analyzed by RT-PCR (RT – or +: retrotranscription – or +). *S26* was analyzed as a reference gene. The primers for *Nr2e3* also amplified a transcript variant with an intron inclusion reported in IMAGE:5357172. For *Nr2e3*, we evaluated only the lower molecular weight band corresponding to the spliced mRNA.

2.2. Characterization of 661W-A11 Cells

To further characterize the 661W-A11 clone, expression levels of several rod-specific genes and cone-specific genes were compared by real-time qPCR in the 661W-A11 and 661W cells (Figure 2A,B). We observed that 661W-A11 cells had a significant upregulation of rod-specific gene expression but a similar expression of cone-specific genes, compared with 661W cells. Immunoblotting and immunofluorescence confirmed at protein level that expression levels of rhodopsin, PDE6B and GNAT1 were increased in 661W-A11 compared with 661W cells (Figure 2C–F). The 661W-A11 cells displayed a more elongated morphology (Figure 2D–F) and had a slower replication rate compared with 661W. Based on this evidence, we confirmed that clone 661W-A11 acquired rod photoreceptor features rather than cone photoreceptor features.

2.3. Mimicking Photoreceptor Degeneration In Vitro

PDE6 loss of function mutations are found in patients affected by a recessive form of RP (RP40) [33], and this mutation causes an intracellular increase in cGMP, an influx of calcium in photoreceptors and activation of protein kinase G (PKG) and calpains [3]. In order to mimic the photoreceptor degeneration in 661W-A11 cells, a protocol based on treatment with zaprinast was developed. Zaprinast is an inhibitor of PDEs, specifically PDE6 and, to a lesser extent, PDE5 [34]. Scaling concentrations of zaprinast, starting from 100 μ M to 500 μ M, were applied to 661W and 661W-A11 cells. A dose response of dropped cell viability was observed in both cell types, with around 25% viability reduction detected on 661W and 30% on 661W-A11 when a concentration of either 400 μ M or 500 μ M was used (Figure 3A); 400 μ M was chosen for cell death detection. We determined that exposure to zaprinast for 24 h induced 9% cell death on 661W cells and 14% cell death on 661W-A11 cells, based on a TUNEL assay (Figure 3B).

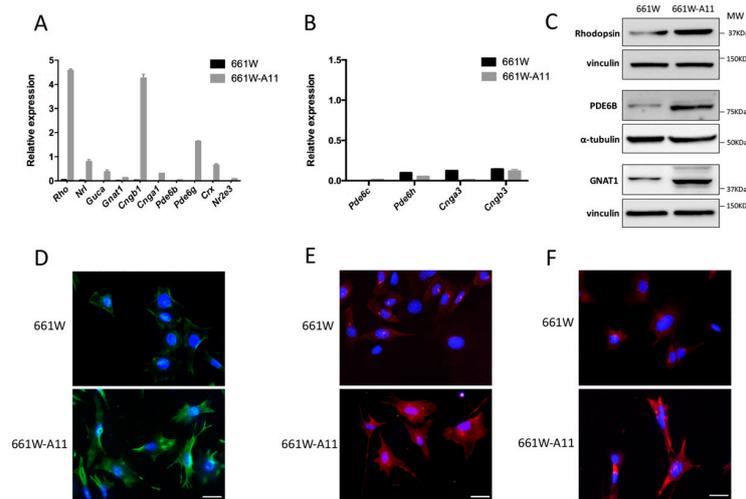


Figure 2. 661W-A11 cells express rod-specific genes and proteins. (A) Rod-specific mRNAs and (B) cone-specific mRNAs were analyzed by real-time qPCR. S26 was used as a reference gene. (C) Immunoblotting of rhodopsin, PDE6B and GNAT1 on 661W and 661W-A11 cells. Normalization with vinculin for rhodopsin and GNAT1 and with α -tubulin for PDE6B is shown below each analyzed protein. (D) Immunofluorescence analysis of rhodopsin (green) protein on 661W and 661W-A11 cells. (E) Immunofluorescence analysis of PDE6B (red) protein on 661W and 661W-A11 cells. (F) Immunofluorescence analysis of GNAT1 (red) protein on 661W and 661W-A11 cells. Nuclei were stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI); blue. Scale bar: 10 μ m.

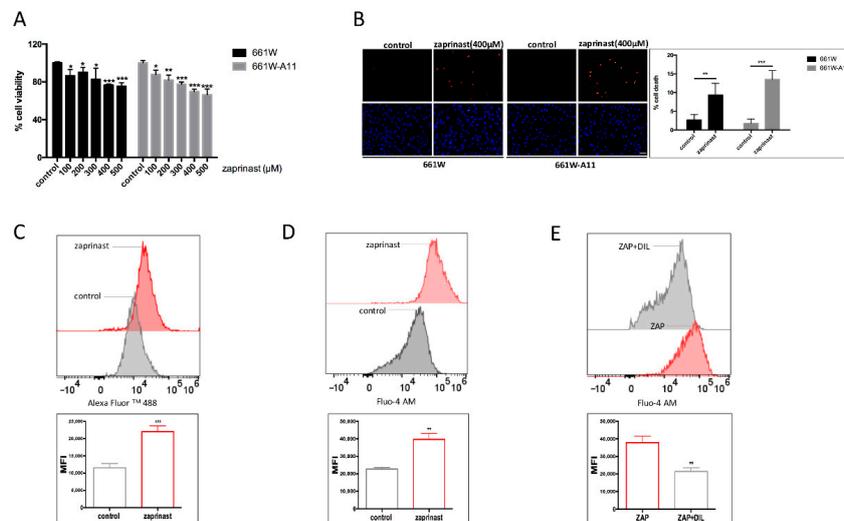


Figure 3. Effect of PDE6B inhibition by zaprinast treatment. (A) Cell viability assay, based on MTT, after treatment with scaling concentrations of zaprinast on 661W and 661W-A11 cells. Values of cells treated with the vehicle (0 μ M, control) were set as 100% cell viability. (B) TUNEL assay detected dying cells (upper panels, red) in zaprinast-treated 661W and 661W-A11 cells; nuclei were stained with DAPI (lower panels, blue). Control shows cells treated with the vehicle (DMSO). Scale bar: 40 μ m. On the right-hand side, quantifications of the TUNEL⁺ cells are reported. (C) Increased cGMP levels were detected by flow cytometry using an antibody (anti-cGMP) and a secondary antibody labeled with Alexa Fluor 488 in zaprinast-treated versus untreated 661W-A11 cells. Control: cells treated with the vehicle (DMSO); zaprinast: cells treated with 400 μ M zaprinast for 24 h. (D) Increased Ca²⁺ levels were detected by flow cytometry staining with Fluo-4 AM in zaprinast-treated versus untreated 661W-A11 cells. Control: cells treated with the vehicle (DMSO); zaprinast: cells treated with 400 μ M zaprinast for 24 h. (E) Decreased Ca²⁺ levels were detected by flow cytometry in zaprinast (+)-*cis* diltiazem-treated versus zaprinast-treated 661W-A11 cells. ZAP: cells treated with 400 μ M zaprinast for 24 h; ZAP+DIL: cells pretreated with 50 μ M (+)-*cis* diltiazem for 2 h and then treated with 400 μ M zaprinast and 50 μ M (+)-*cis* diltiazem for 24 h; MFI: mean fluorescence intensity. Statistical comparison: Student's unpaired two-tailed *t*-test; * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001.

To demonstrate that this condition could mimic the PDE6 loss of function in 661W-A11 cells, as found in retinal degeneration, we evaluated changes in cGMP and Ca^{2+} levels. cGMP was analyzed by flow cytometry using an antibody specifically binding cGMP, and intracellular calcium was assessed by Fluo-4 AM staining. The effect of zaprinast on blocking the PDE6 enzyme was demonstrated by the statistically significant increase in cGMP and in intracellular calcium (Figure 3C,D).

With the aim of determining the mechanism underlying calcium influx, we exposed zaprinast-treated 661W-A11 to a blocker of L-type voltage gated calcium channels, (+)-*cis* diltiazem. We determined that (+)-*cis* diltiazem could interfere with the zaprinast-induced calcium influx (Figure 3E).

To investigate activation of PKG in this in vitro model, we first analyzed the gene expression of different PKG isoforms, and found higher mRNA levels of *Prkg1a*, *Prkg1b* and *Prkg2* genes, encoding for the isoforms PKG1 α , PKG1 β and PKG2, respectively, in 661W-A11 when compared with 661W cells (Figure 4A). PKG activation was evaluated by analyzing the phosphorylation status of two different targets: phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) at Serine 239 and phosphorylation of the Ras homolog family member A (RhoA) at Serine 188. VASP is a protein associated with the cytoskeleton and Serine 239 is one of the main PKG-dependent phosphorylation sites in VASP [35]. Immunoblotting showed that phosphorylated VASP and phosphorylated RhoA were readily detectable in the zaprinast-treated 661W-A11 cells, indicating activation of PKG (Figure 4B,C).

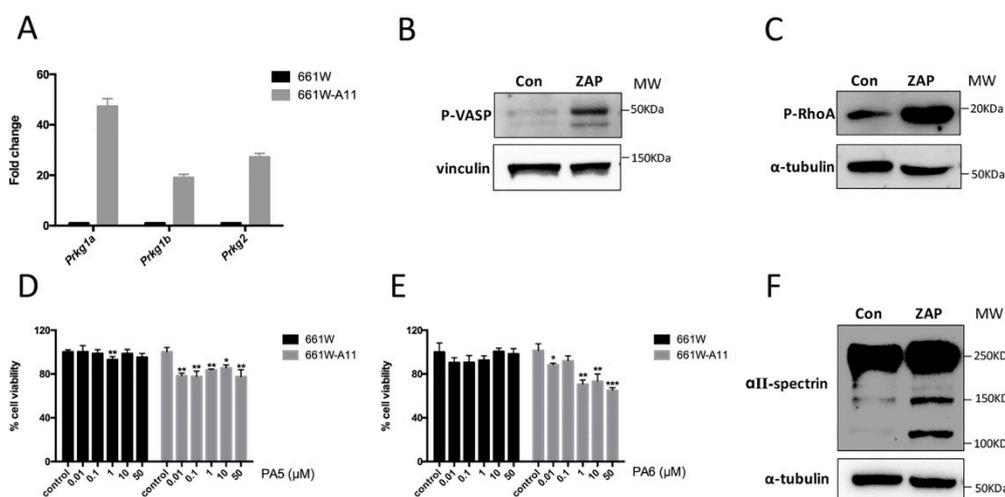


Figure 4. Activation of PKG and calpain proteases in 661W-A11. (A) Real-time qPCR analysis of *Prkg1a*, *Prkg1b* and *Prkg2* mRNA in 661W-A11 cells compared with 661W cells. (B,C) Immunoblotting of phosphorylated VASP (P-VASP) and phosphorylated RhoA (P-RhoA) on control (Con: vehicle-treated) and zaprinast-treated (ZAP) 661W-A11 cells. (D,E) Cell viability assay, based on MTT, after treatment with increasing doses of PA5 (D) and PA6 (E). Values of 661W and 661W-A11 cells treated with the vehicle (H_2O) were set as 100% cell viability. (F) Western blot analysis of the effects of αII -spectrin on the control and zaprinast-treated groups shows an increase in the 145–150 kDa fragments resulting from calpain cleavage and of the 120 kDa fragment resulting from caspase cleavage. Con: cells treated with DMSO; ZAP: cells treated with 400 μM zaprinast for 24 h. Statistical comparison: Student's unpaired two-tailed *t*-test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

These results suggested that increased cGMP could activate PKG but, in order to determine if zaprinast treatment could be a valuable model for retinal degeneration, we assessed if activation of PKG was correlated with cell death, similar to what can be found in the degenerating retina [36]. To this end, we treated the 661W-A11 as well as 661W cells with increasing concentrations of PA5 and PA6, two cGMP analogs that we previously published as PKG activators [37]. These PKG analogs present different activation constants for the different PKG isoforms, i.e., PA5 targets mostly PKG2 rather than PKG1, and PA6 strongly activates PKG1 α and PKG1 β rather than PKG2 [37]. We found that only the

661W-A11 cells were sensitive to both activators (Figure 4D,E), confirming that triggering PKG activity is a toxic event for rod-like cells such as 661W-A11 cells.

Previous studies correlated increased intracellular calcium with calpain protease activity [38–40]. The activation of calpain proteases was thus evaluated by assessing the cleavage of α II-spectrin, a substrate for calpains. An increased amount of the 145–150 kDa fragments of α II-spectrin derived from calpain cleavage was observed in 661W-A11 cells after zaprinast treatment (Figure 4F).

2.4. Validation of the In Vitro Model for Drug Screening

Different drugs have been reported to have a neuroprotective effect in retinal degeneration models [41]. Recombinant human pigmented epithelium-derived factor (PEDF) protein was shown to decrease intracellular calcium and photoreceptor cell death in mouse models of retinal degeneration [23,42]. Similarly, calpastatin peptide, which is an endogenous calpain inhibitor, was reported to protect photoreceptors from cell death when administered in vivo [40]. Moreover, the cGMP inhibitor analog CN03 was shown to limit the activity of PKG and CNGC (cyclic nucleotide-gated ion channel), and to protect photoreceptors from degeneration [18].

The neuroprotective effects of the abovementioned drugs were tested in 661W-A11 cells, and the percentage of cell death or cell viability was analyzed after zaprinast treatment with or without the neuroprotective drugs. The data confirmed that zaprinast treatment increased cell death and decreased cell viability compared with the control. CN03, calpastatin peptide and PEDF confirmed their neuroprotective effects on the newly developed photoreceptor cell model (Figure 5A,B).

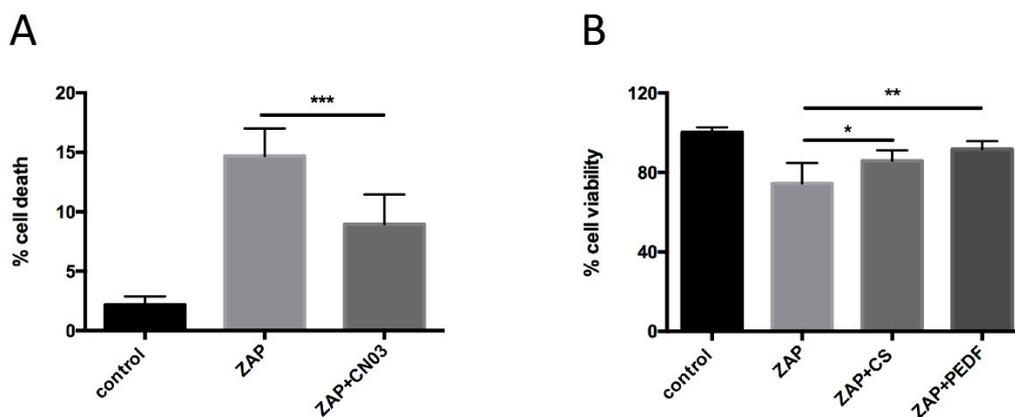


Figure 5. Validation of the in vitro model for drug screening. (A) A TUNEL assay was used to determine the percentage of cell death in 661W-A11. (B) Cell viability was assessed by MTT assay. The values of cells treated with the vehicle (DMSO, control) were set as 100% cell viability. ZAP: cells treated with 400 μ M zaprinast; ZAP+CN03 or CS or PEDF: cells were pretreated with 50 μ M CN03 or 20 μ M calpastatin peptide (CS) or 10 nM PEDF for 2 h before being stressed with 400 μ M zaprinast in the presence of the neuroprotective compounds. Statistical comparison: Student's unpaired two-tailed *t*-test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3. Discussion

A growing number of studies have suggested that the cGMP-dependent activation of intracellular targets drives photoreceptor cell death in a variety of IRD forms. Many mutation-caused retinal dystrophies, including RP and Leber congenital amaurosis (LCA), are known to be associated with cGMP-dependent photoreceptor cell death [6,43]. The dysregulation of cGMP, typically its high levels, may trigger downstream processes that are toxic to photoreceptors [44]. Here, we developed a cell line displaying rod-specific features and showed that upon PDE6 inhibition, which elevated cGMP and calcium levels, cell death pathways previously described in rodent models of RP were activated [3]. While we cannot rule out the possibility that not all the cell death mechanisms were mirrored

in this in vitro model, we can confirm that the 661W-A11 cell line could be used as an in vitro model for the study of rod photoreceptor cell death in RP and other IRDs linked to increased intracellular cGMP. This limitation of the in vitro model presented here needs to be pondered when using this system for high-throughput screening.

The link between calcium influx and photoreceptor cell death has already been established in retinal degeneration. It is hypothesized that high levels of cGMP lead to calcium influx through CNGC and that excessive calcium triggers photoreceptor cell death [45]. Two major channels for calcium influx are found in photoreceptors: the CNGC in the photoreceptors' outer segment, and the voltage-gated calcium channels in the photoreceptor cells' body [46]. When (+)-*cis* diltiazem, a benzothiazepine drug known to target the L-type voltage gated channel, was applied to 661W-A11 cells, we observed a decrease in zaprinast-induced calcium influx. The neuroprotective effect of (+)-*cis* diltiazem on RP models is quite contradictory: an early study showed that (+)-*cis* diltiazem was able to prevent rod degeneration in a *rd1* mutant mouse, and some studies confirmed these data but other ones were unable to reproduce its protective effects [47–49]. In our model, we could observe a reduction in intracellular calcium upon (+)-*cis* diltiazem exposure, suggesting that the calcium entered mainly through the L-type channel. However, (+)-*cis* diltiazem has also a moderate effect on CNGC [50], so we cannot exclude the possibility of calcium influx from CNGC, as we showed the expression of mRNA encoding the CNGC subunits in the cells. We favor the first hypothesis because transport and diffusion of Ca^{2+} between outer segment, harboring the CNGC, and the inner segment, containing the photoreceptor cytoplasm, appears to be limited in the retina. L-type calcium channels are, in fact, the main pathway of Ca^{2+} entrance from the extracellular space in photoreceptor cells [51].

Activation of PKGs plays a role in cell death in several neuronal cell types [52], and studies have demonstrated that cGMP-dependent overactivation of PKG acts as an important cell death mechanism in photoreceptor degeneration [36]. In mammals, two different genes encode PKG: *PRKG1* for the isoforms PKG1 α and PKG1 β , and *PRKG2* for PKG2 [53]. Their expression in the retina was demonstrated and the correlation with retinal degeneration was shown in a CNGC loss-of-function mouse model in which the knock-out of *Prkg1* led to sustained rod cell survival [54]. PKG expression has been demonstrated in the retina and PKG activity was characterized in 661W cells [55–57]. In 661W-A11, we demonstrated increased expression of *Prkg1* and *Prkg2* genes. The key role of PKG in the cell death mechanism was confirmed with PKG stimulation, which was demonstrated to be detrimental to the cells, and by PKG activation upon intracellular cGMP increase. Interestingly, 661W-A11 cells exhibited low tolerance to PA5, which preferentially activates PKG2. PA6, which acts preferentially on PKG1, was less effective. Several studies have shown that specific activation of PKG2 interferes with proliferation and triggers proapoptotic effects in cancer cell lines [58–61]. Until now, not much has been known about the role of different PKG isoforms in photoreceptors; thus the identification of PKG substrates and their downstream pathways would significantly accelerate the identification of new targets in IRD drug development.

In summary, 661W-A11 cells may serve as an alternative cell model for studying the cGMP-dependent PKG activation in photoreceptor cell death and for high-throughput drug screening.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Culture, Genetic Modification and Treatments

661W cells were cultured in low glucose (1 mg/mL) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 22320022 Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, purchased from Thermo Fisher Scientific (Rodano, Italy).

Isolation of single-cell clones: 661W cells were transduced with a replication-incompetent retrovirus expressing NRL. The retrovirus was generated by cloning murine *Nrl* cDNA

(accession number: L14935) between the *EcoRI* and *XhoI* restriction sites of the pLXSN vector for the production of a retrovirus also expressing the neomycin resistance gene. Transduced cells were selected by treatment with G418, and clones were generated by limiting dilution. RNA extracted from single-cell clones was retrotranscribed and *Nr1* expression was evaluated by RT-PCR (see below).

Next, 20,000 cells were seeded onto glass coverslips coated with 3 µg/mL laminin in 24-well plates or 6000 cells per well in 96-well plates. The following day, cells were treated for 2 h with a medium containing either 10 nM PEDF (a kind gift from S.P. Becerra) or 20 µM calpastatin peptide (208902 Calbiochem) or 50 µM CN03 (P 007 Biolog, Bremen, Germany) or 50 µM (+)-*cis*-diltiazem (D2521 Sigma, Milan, Italy), and then stressed with 400 µM zaprinast (Z0878 Sigma) for 24 h, or by adding an equal volume of DMSO as a control. For PA5 and PA6 treatments, cells were treated with different drug concentrations for 24 h or by adding an equal volume H₂O as a control.

4.2. RT-PCR and Real-Time qPCR

Total RNA was extracted from cells using the RNeasy Mini Kit (74104 Qiagen, Milan, Italy) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 3 µg of RNA using the Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (04379012001 Roche). PCR was performed with 1 µL cDNA using specific primers (Table 1) under the following conditions: 30 s at 94 °C, 30 s at 60 °C and 30 s at 72 °C for 35 cycles. Amplified products were analyzed by electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Real-time qPCR was carried out with the Universal SYBR Green Supermix (1725120 Bio-Rad, Segrate, Italy) using 1 µL cDNA on the CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad) under the following conditions: 30 s at 95 °C, and 39 cycles of 5 s at 95 °C and 30 s at 60 °C; the relative gene expression level was calculated using the ribosomal protein gene *RPS26* as a reference. The primers used for quantitative PCR are listed in Table 1.

Table 1. Primers used for RT-PCR and real-time PCR.

	Forward Primer	Reverse Primer
<i>RPS26</i>	5'-AAGTTTGTCATTCGGAACATT-3'	5'-GATCGATTCCTAACAACCTTG-3'
<i>Rho</i>	5'-AATCTCGAGGGCTTCTTTGC-3'	5'-CCACGTAGCGCTCAATGGC-3'
<i>Nr1</i>	5'-GCTACTATTAGGGAGCCC-3'	5'-GCAGCTGCCGGTTCA-3'
<i>Gnat1</i>	5'-GAGCCTCAGAATACCAGCTC-3'	5'-GGCACATATCCTGGAGTCAC-3'
<i>Cngb1</i>	5'-TCTGGCTCCTCATGGATTAC-3'	5'-TGATGTCCCCGCCTTTGAC-3'
<i>Cnga1</i>	5'-CAACTGGACGATGATTATTGC-3'	5'-TCACTAGCAGCCCTT-3'
<i>Pde6b</i>	5'-GGAGAGGACTGTCTTGGATC-3'	5'-GAGCTCAGCTGCTTTGTTCC-3'
<i>Nr2e3</i>	5'-TCCCACAGAGTTTGCTGC-3'	5'-CTCCACGTGCTCAGGATCCT-3'
<i>Nr2e3</i> *	5'-GAAACACGAGCCCTGAAGGA-3'	5'-GGGAGCAGGAGGCAATTT-3'
<i>Guca1a</i>	5'-TGCATAGACAGGGACGAGC-3'	5'-GCACTCATGGATGAGTCGC-3'
<i>Pde6g</i>	5'-ATCCCTGGAATGGAAGGCC-3'	5'-TAAATGATGCCATACTGGGC-3'
<i>Crx</i>	5'-TAAGATCAATCTGCCTGAGTC-3'	5'-GCTGTTGCTGTTTCTGCTGC-3'
<i>Pde6c</i>	5'-GTGGAGTCCCGGAGAAGC-3'	5'-GTCCTGATGGTGTACAGTGC-3'
<i>Pde6h</i>	5'-CAGTTCAAGAGCAAGCCTCC-3'	5'-TTCCCAGGGACAGATGACC-3'
<i>Cnga3</i>	5'-GCTGGTTCGAGCCCGGAC-3'	5'-CCAGCTTGAAGTGCAAGGTC-3'
<i>Cngb3</i>	5'-TGGAAGCCAGCTCTCAGAC-3'	5'-CTCTGGGGTTTGAAAGAAAAC-3'
<i>Prkg1a</i>	5'-GCGTTCGGGAAGTTCACTAA-3'	5'-GCCACAATCTCCTGGATCTG-3'
<i>Prkg1b</i>	5'-CTTCTACCCCAAGAGCCAC-3'	5'-ACAATCTCCTGGATCTGTGACAG-3'
<i>Prkg2</i>	5'-CCTGACATTTTCATCCGGAGG-3'	5'-TTCCGTCACCTTACGGAGAG-3'

* Primers used only for real-time qPCR.

4.3. Immunofluorescence and TUNEL Assay

Cells were seeded onto glass coverslips in a 24-well plate at a density of 2×10^4 cells/well. After incubation, cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 2% paraformaldehyde (PFA) for 10 min. For immunofluorescence, cells were blocked and permeabilized with 3% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Triton X-100 in PBS for

1 h at room temperature. After incubation with primary antibodies in PBS overnight at 4 °C, cells were washed 5 times with PBS and incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. For nuclear staining, cells were stained with 0.1 µg/mL DAPI. Slides were mounted with Mowiol 4–88 and observed using the Zeiss Axio Imager A2 fluorescence microscope. The primary antibodies used were as follows: anti-rhodopsin (1D4, MAB5356 Sigma, 1:100), anti-PDE6B (ab5663 Abcam, Cambridge, UK 1:100) and anti-GNAT1 (SAB4501223 Sigma, 1:300). Secondary antibodies were used as follows: anti-mouse Alexa Fluor 488 (A11001 ThermoFisher, Rodano, Italy, 1:1000), anti-rabbit Alexa Fluor 568 (A11011 ThermoFisher, 1:1000). Cell death was detected by a TUNEL assay using the In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (12156792910 Roche, Monza, Italy), according to the manufacturer's instructions. For each replicate, images of 10 different fields were acquired (139.51 µm × 105.21 µm), and dead cell quantification was performed by counting all TUNEL-labeled cells in each field and dividing this by the total number of cells, based on the nuclear DAPI staining. The average cell death percentage from at least 3 biological replicates was plotted using GraphPad Prism.

4.4. Flow Cytometry Analysis of cGMP and Calcium

Cells were detached, collected by centrifugation at 300× g for 5 min and fixed with cold 2% PFA at room temperature for 20 min. After washing with PBS and centrifugation, cells were resuspended in a permeabilization buffer (0.1% Triton X-100 in PBS) and incubated for 20 min at room temperature. After centrifugation, cells were incubated with a blocking buffer (3% BSA in PBS) for 30 min. Cells were then incubated with the cGMP primary antibody (Jan de Vente and Harry Steinbusch, Maastricht University, The Netherlands, 1:500) for 30 min at room temperature. After rinsing the cells 3 times with PBS, cells were resuspended in the anti-sheep Alexa Fluor 488 secondary antibody (A11015 ThermoFisher, 1:1000) and incubated for 30 min at room temperature. Cells were washed 3 times with PBS and resuspended in 500 µL of PBS. For the analysis of intracellular calcium levels, cells were incubated with 1 µM Fluo-4 AM (F14201 ThermoFisher) at 37 °C for 30 min in Hank's Balanced Salt solution (HBSS, 14170112 ThermoFisher) in the dark. After incubation, cells were washed twice with HBSS and once with PBS. Cells were detached by treatment with Accutase (SCR005 Millipore, Milano, Italy), collected by centrifugation at 300× g for 5 min at room temperature and resuspended in 500 µL of PBS. Cells were immediately analyzed using the Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer. Fluorescence was measured at an excitation wavelength of 488 nm; mean fluorescence intensity and fluorescence-positive cells were calculated from 3 biological replicates. Throughout the whole analysis, channel gain and voltage were maintained unvaried.

4.5. Western Blotting

For detection of rhodopsin, PDE6B and GNAT1, cells were lysed with a buffer containing 1× PBS, 17mM CHAPS and 1% protease inhibitor. Equivalent amounts of protein extracts (40 µg) were resolved by SDS-PAGE, and immunoblotting was performed following standard procedures. For detection of P-VASP, P-RhoA and αII-spectrin, cells were lysed in a lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM NaH₂PO₄, 1 mM DTT, 1% protease inhibitor and 1% phosphatase inhibitor). Equivalent amounts of protein extracts (20 µg) were resolved by SDS-PAGE, and immunoblotting was performed following standard procedures. The antibodies used for Western blotting were as follows: anti-rhodopsin (1D4, MAB5356 Sigma, 1:1000), anti-PDE6B (ab5663 Abcam, 1:500), anti-GNAT1 (SAB4501223 Sigma, 1:1000), anti-vinculin (V4139 Sigma, 1:10,000), anti-α-tubulin (T6199 Sigma, 1:2000), anti-αII-spectrin (AA6, BML-FG6090 Enzo Life, 1:2000), anti-P-VASP (S239, 0047-100/VASP-16C2 Nanotools 1:2000) and anti-P-RhoA (ser188) (S188, ab32046 Abcam 1:1000). The detection was based on a chemiluminescent substrate (Clarity Max Western ECL Substrate 170-5062 Bio-Rad) and images were acquired by a ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, Segrate, Italy).

4.6. MTT Assay

Cells were cultured on a 96-well plate at a density of 6000 cells/well. After treatment with the corresponding drugs, the medium was aspirated and the cells in each well were incubated with 50 μ L of 1 mg/mL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) in the culture medium for 90 min at 37 °C. After supernatant removal, the purple formazan crystals were dissolved in 100 μ L of isopropanol. The plate was shaken for 10 min and optical density (OD) was measured at 570 nm using a microplate reader (Labsystems Multiskan MCC/340, Fisher Scientific, Rodano, Italy). The average absorbance from at least 3 biological replicates was plotted using GraphPad Prism.

4.7. Statistical Analysis

Data from each experiment, obtained from at least 3 biological replicates, were presented as means \pm SD. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 7 (GraphPad software, San Diego, CA, USA), and each dataset was analyzed by an unpaired Student's *t*-test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Author Contributions: Conceptualization, V.M.; methodology, L.H., E.A. and A.C.; software, not applicable; validation, L.H., M.K., E.A. and V.M.; formal analysis, L.H., M.K. and E.A.; investigation, L.H., M.K., E.A. and V.M.; resources, V.M.; data curation, L.H., M.K., E.A. and V.M.; writing—original draft preparation, L.H., M.K., E.A. and V.M.; writing—review and editing, L.H., M.K., E.A. and V.M.; visualization, L.H. and E.A.; supervision, V.M.; project administration, V.M.; funding acquisition, V.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by European Union (transMed, MSCA-ITN-2017-765441) and the Telethon Foundation (GGP19113).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Supporting results can be requested from the corresponding author; they are currently stored in a laboratory-owned archive, which will be made open later.

Acknowledgments: The authors acknowledge the Cell Lab facility of the University of Modena and Reggio Emilia for providing cell culture assistance. The authors thank M. Montanari for technical help with the flow cytometry, Muayyad Al-Ubaidi (University of Oklahoma) for the 661W cell line and S.P. Becerra for the recombinant PEDF.

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

References

1. Molday, R.S.; Moritz, O.L. Photoreceptors at a glance. *J. Cell Sci.* **2015**, *128*, 4039–4045. [[CrossRef](#)]
2. Daiger, S.P.; Sullivan, L.S.; Bowne, S.J. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clin. Genet.* **2013**, *84*, 132–141. [[CrossRef](#)]
3. Power, M.; Das, S.; Schütze, K.; Marigo, V.; Ekström, P.; Paquet-Durand, F. Cellular mechanisms of hereditary photoreceptor degeneration—Focus on cGMP. *Prog. Retin. Eye Res.* **2020**, *74*, 100772. [[CrossRef](#)]
4. Paquet-Durand, F.; Ekström, P.; Marigo, V. CHAPTER 3. Modulation of Calcium Overload and Calpain Activity. In *Drug Discovery*; Royal Society of Chemistry (RSC): London, UK, 2018; pp. 48–60.
5. Marigo, V.; Ekström, P.; Schwede, F.; Rentsch, A.; Paquet-Durand, F. Chapter 6 Modulation of cGMP-signalling to Prevent Retinal Degeneration. In *Therapies for Retinal Degeneration: Targeting Common Processes*; The Royal Society of Chemistry: London, UK, 2019; pp. 88–98.
6. Paquet-Durand, F.; Marigo, V.; Ekström, P. RD Genes Associated with High Photoreceptor cGMP-Levels (Mini-Review). *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**, *1185*, 245–249.
7. Himawan, E.; Ekström, P.; Buzgo, M.; Gaillard, P.; Stefánsson, E.; Marigo, V.; Loftsson, T.; Paquet-Durand, F. Drug delivery to retinal photoreceptors. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 1637–1643. [[CrossRef](#)]
8. Krishnamoorthy, R.R.; Agarwal, P.; Prasanna, G.; Vopat, K.; Lambert, W.; Sheedlo, H.J.; Pang, I.H.; Shade, D.; Wordinger, R.J.; Yorio, T.; et al. Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **2001**, *86*, 1–12. [[CrossRef](#)]
9. Nabi, I.R.; Mathews, A.P.; Cohen-Gould, L.; Gundersen, D.; Rodriguez-Boulan, E. immortalization of polarized rat retinal pigment epithelium. *J. Cell Sci.* **1993**, *104*, 37–49. [[CrossRef](#)]
10. Roque, R.S.; Agarwal, N.; Wordinger, R.J.; Brun, A.-M.; Xue, Y.; Huang, L.C.; Nguyen, L.P.; Shay, J.W. Human Papillomavirus-16 E6/E7 Transfected Retinal Cell Line Expresses the Müller Cell Phenotype. *Exp. Eye Res.* **1997**, *64*, 519–527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

11. Araki, K.; Ohashi, Y.; Sasabe, T.; Kinoshita, S.; Hayashi, K.; Yang, X.Z.; Hosaka, Y.; Aizawa, S.; Handa, H. Immortalization of rabbit corneal epithelial cells by a recombinant SV40-adenovirus vector. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1993**, *34*, 2665–2671.
12. Bogenmann, E.; Lochrie, M.; Simon, M. Cone cell-specific genes expressed in retinoblastoma. *Science* **1988**, *240*, 76–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bernstein, S.L.; Kutty, G.; Wiggert, B.; Albert, D.M.; Nickerson, J.M. Expression of retina-specific genes by mouse retinoblastoma cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1994**, *35*, 3931–3937.
14. McFall, R.C.; Sery, T.W.; Makadon, M. Characterization of a new continuous cell line derived from a human retinoblastoma. *Cancer Res.* **1977**, *37*, 1003–1010. [[PubMed](#)]
15. Di Polo, A.; Farber, D.B. Rod photoreceptor-specific gene expression in human retinoblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 4016–4020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ballios, B.G.; Clarke, L.; Coles, B.L.K.; Shoichet, M.S.; Van Der Kooy, D. The adult retinal stem cell is a rare cell in the ciliary epithelium whose progeny can differentiate into photoreceptors. *Biol. Open* **2012**, *1*, 237–246. [[CrossRef](#)]
17. Demontis, G.C.; Aruta, C.; Comitato, A.; De Marzo, A.; Marigo, V. Functional and molecular characterization of rod-like cells from retinal stem cells derived from the adult ciliary epithelium. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e33338. [[CrossRef](#)]
18. Vighi, E.; Trifunovic, D.; Veiga-Crespo, P.; Rentsch, A.; Hoffmann, D.; Sahaboglu, A.; Strasser, T.; Kulkarni, M.; Bertolotti, E.; Heuvel, A.V.D.; et al. Combination of cGMP analogue and drug delivery system provides functional protection in hereditary retinal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E2997–E3006. [[CrossRef](#)]
19. Alubaidi, M.R.; Font, R.L.; Quiambao, A.B.; Keener, M.J.; I Liou, G.; Overbeek, P.; Baehr, W. Bilateral retinal and brain tumors in transgenic mice expressing simian virus 40 large T antigen under control of the human interphotoreceptor retinoid-binding protein promoter. *J. Cell Biol.* **1992**, *119*, 1681–1687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Tan, E.; Ding, X.-Q.; Saadi, A.; Agarwal, N.; Naash, M.I.; Al-Ubaidi, M.R. Expression of Cone-Photoreceptor-Specific Antigens in a Cell Line Derived from Retinal Tumors in Transgenic Mice. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **2004**, *45*, 764–768. [[CrossRef](#)]
21. Wheway, G.; Mitchison, H.M.; Genomics England Research Consortium. Opportunities and Challenges for Molecular Understanding of Ciliopathies-The 100,000 Genomes Project. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 127. [[CrossRef](#)]
22. Comitato, A.; Spampinato, C.; Chakarova, C.; Sanges, D.; Bhattacharya, S.S.; Marigo, V. Mutations in splicing factor PRPF3, causing retinal degeneration, form detrimental aggregates in photoreceptor cells. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16*, 1699–1707. [[CrossRef](#)]
23. Comitato, A.; Subramanian, P.; Turchiano, G.; Montanari, M.; Becerra, S.P.; Marigo, V. Pigment epithelium-derived factor hinders photoreceptor cell death by reducing intracellular calcium in the degenerating retina. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 1–13. [[CrossRef](#)]
24. Cepko, C.L. The roles of intrinsic and extrinsic cues and bHLH genes in the determination of retinal cell fates. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1999**, *9*, 37–46. [[CrossRef](#)]
25. Swaroop, A.; Xu, J.Z.; Pawar, H.; Jackson, A.; Skolnick, C.; Agarwal, N. A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 266–270. [[CrossRef](#)]
26. Rehemtulla, A.; Warwar, R.; Kumar, R.; Ji, X.; Zack, D.J.; Swaroop, A. The basic motif-leucine zipper transcription factor Nrl can positively regulate rhodopsin gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 191–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Mitton, K.P.; Swain, P.K.; Chen, S.; Xu, S.; Zack, D.J.; Swaroop, A. The leucine zipper of NRL interacts with the CRX homeodomain. A possible mechanism of transcriptional synergy in rhodopsin regulation. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 29794–29799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Cheng, H.; Khanna, H.; Oh, E.C.; Hicks, D.; Mitton, K.; Swaroop, A. Photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 functions as a transcriptional activator in rod photoreceptors. *Hum. Mol. Genet.* **2004**, *13*, 1563–1575. [[CrossRef](#)]
29. Kim, J.-W.; Yang, H.-J.; Brooks, M.J.; Zelinger, L.; Karakulah, G.; Gotoh, N.; Boleda, A.; Gieser, L.; Giuste, F.; Whitaker, D.T.; et al. NRL-Regulated Transcriptome Dynamics of Developing Rod Photoreceptors. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 2460–2473. [[CrossRef](#)]
30. Mears, A.J.; Kondo, M.; Swain, P.K.; Takada, Y.; Bush, R.A.; Saunders, T.; Sieving, P.A.; Swaroop, A. Nrl is required for rod photoreceptor development. *Nat. Genet.* **2001**, *29*, 447–452. [[CrossRef](#)]
31. Oh, E.C.T.; Khan, N.; Novelli, E.; Khanna, H.; Strettoi, E.; Swaroop, A. Transformation of cone precursors to functional rod photoreceptors by bZIP transcription factor NRL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 1679–1684. [[CrossRef](#)]
32. Daniele, L.L.; Lillo, C.; Lyubarsky, A.L.; Nikonov, S.S.; Philp, N.; Mears, A.J.; Swaroop, A.; Williams, D.S.; Pugh, E.N. Cone-like Morphological, Molecular, and Electrophysiological Features of the Photoreceptors of the Nrl Knockout Mouse. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **2005**, *46*, 2156–2167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. McLaughlin, M.E.; Sandberg, M.A.; Berson, E.L.; Dryja, T.P. Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* **1993**, *4*, 130–134. [[CrossRef](#)]
34. Zhang, X.; Feng, Q.; Cote, R.H. Efficacy and Selectivity of Phosphodiesterase-Targeted Drugs in Inhibiting Photoreceptor Phosphodiesterase (PDE6) in Retinal Photoreceptors. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **2005**, *46*, 3060–3066. [[CrossRef](#)]
35. Deguchi, A.; Soh, J.-W.; Li, H.; Pamukcu, R.; Thompson, W.J.; Weinstein, I.B. Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) phosphorylation provides a biomarker for the action of exisulind and related agents that activate protein kinase G. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 803–809.
36. Paquet-Durand, F.; Hauck, S.M.; Van Veen, T.; Ueffing, M.; Ekström, P. PKG activity causes photoreceptor cell death in two retinitis pigmentosa models. *J. Neurochem.* **2009**, *108*, 796–810. [[CrossRef](#)]

37. Vighi, E.; Rentsch, A.; Henning, P.; Comitato, A.; Hoffmann, D.; Bertinetti, D.; Bertolotti, E.; Schwede, F.; Herberg, F.W.; Genieser, H.-G.; et al. New cGMP analogues restrain proliferation and migration of melanoma cells. *Oncotarget* **2018**, *9*, 5301–5320. [[CrossRef](#)]
38. Comitato, A.; Schirotti, D.; Montanari, M.; Marigo, V. Calpain Activation Is the Major Cause of Cell Death in Photoreceptors Expressing a Rhodopsin Misfolding Mutation. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *57*, 589–599. [[CrossRef](#)]
39. Comitato, A.; Schirotti, D.; La Marca, C.; Marigo, V. Differential Contribution of Calcium-Activated Proteases and ER-Stress in Three Mouse Models of Retinitis Pigmentosa Expressing P23H Mutant RHO. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**, *1185*, 311–316. [[CrossRef](#)]
40. Paquet-Durand, F.; Sanges, D.; McCall, J.; Silva, J.; Van Veen, T.; Marigo, V.; Ekström, P. Photoreceptor rescue and toxicity induced by different calpain inhibitors. *J. Neurochem.* **2010**, *115*, 930–940. [[CrossRef](#)]
41. Marigo, V.; Kutluer, M.; Huang, L. Targeting molecular pathways for the treatment of inherited retinal degeneration. *Neural Regen. Res.* **2020**, *15*, 1784–1791. [[CrossRef](#)]
42. Kenealey, J.; Subramanian, P.; Comitato, A.; Bullock, J.; Keehan, L.; Polato, F.; Hoover, D.; Marigo, V.; Becerra, S.P. Small Retinoprotective Peptides Reveal a Receptor-binding Region on Pigment Epithelium-derived Factor. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 25241–25253. [[CrossRef](#)]
43. Ramamurthy, V.; Niemi, G.A.; Reh, T.A.; Hurley, J.B. Leber congenital amaurosis linked to AIPL1: A mouse model reveals destabilization of cGMP phosphodiesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13897–13902. [[CrossRef](#)]
44. Lolley, R.N.; Farber, D.B.; Rayborn, M.E.; Hollyfield, J.G. Cyclic GMP accumulation causes degeneration of photoreceptor cells: Simulation of an inherited disease. *Science* **1977**, *196*, 664–666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Fox, D.A.; Poblens, A.T.; He, L. Calcium Overload Triggers Rod Photoreceptor Apoptotic Cell Death in Chemical-Induced and Inherited Retinal Degenerations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *893*, 282–285. [[CrossRef](#)]
46. Van Hook, M.J.; Nawy, S.; Thoreson, W.B. Voltage- and calcium-gated ion channels of neurons in the vertebrate retina. *Prog. Retin. Eye Res.* **2019**, *72*, 100760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Frasson, M.; Sahel, J.A.; Fabre, M.; Simonutti, M.; Dreyfus, H.; Picaud, S. Retinitis pigmentosa: Rod photoreceptor rescue by a calcium-channel blocker in the rd mouse. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 1183–1187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Sanges, D.; Comitato, A.; Tammara, R.; Marigo, V. Apoptosis in retinal degeneration involves cross-talk between apoptosis-inducing factor (AIF) and caspase-12 and is blocked by calpain inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 17366–17371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Barabas, P.; Peck, C.C.; Krizaj, D. Do Calcium Channel Blockers Rescue Dying Photoreceptors in the Pde6b rd1 Mouse? *Adv. Exp. Med. Biol.* **2010**, *664*, 491–499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Hart, J.; Wilkinson, M.F.; Kelly, M.E.; Barnes, S. Inhibitory action of diltiazem on voltage-gated calcium channels in cone photoreceptors. *Exp. Eye Res.* **2003**, *76*, 597–604. [[CrossRef](#)]
51. Krizaj, D.; Copenhagen, D.R. Calcium regulation in photoreceptors. *Front. Biosci.* **2002**, *7*, d2023–d2044. [[CrossRef](#)]
52. Hofmann, F.; Feil, R.; Kleppisch, T.; Schlossmann, J. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 1–23. [[CrossRef](#)]
53. ørstavik, S.; Natarajan, V.; Taskén, K.; Jahnsen, T.; Sandberg, M. Characterization of the Human Gene Encoding the Type I α and Type I β cGMP-Dependent Protein Kinase (PRKG1). *Genomics* **1997**, *42*, 311–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wang, T.; Tsang, S.H.; Chen, J. Two pathways of rod photoreceptor cell death induced by elevated cGMP. *Hum. Mol. Genet.* **2017**, *26*, 2299–2306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Roy, A.; Groten, J.; Marigo, V.; Tomar, T.; Hilhorst, R. Identification of Novel Substrates for cGMP Dependent Protein Kinase (PKG) through Kinase Activity Profiling to Understand Its Putative Role in Inherited Retinal Degeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Wheway, G.; Nazlamova, L.; Turner, D.; Cross, S. 661W Photoreceptor Cell Line as a Cell Model for Studying Retinal Ciliopathies. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 308. [[CrossRef](#)]
57. Gamm, D.M.; Barthel, L.K.; Raymond, P.A.; Uhler, M.D. Localization of cGMP-Dependent Protein Kinase Isoforms in Mouse Eye. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2000**, *41*, 2766–2773.
58. Hoffmann, D.; Rentsch, A.; Vighi, E.; Bertolotti, E.; Comitato, A.; Schwede, F.; Genieser, H.-G.; Marigo, V. New dimeric cGMP analogues reduce proliferation in three colon cancer cell lines. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *141*, 61–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Wu, Y.; Cai, Q.; Li, W.; Cai, Z.; Liu, Y.; Li, H.; Pang, J.; Chen, Y. Active PKG II inhibited the growth and migration of ovarian cancer cells through blocking Raf/MEK and PI3K/Akt signaling pathways. *Biosci. Rep.* **2019**, *39*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Tuttle, T.R.; Mierzwa, M.L.; Wells, S.I.; Fox, S.R.; Ben-Jonathan, N. The cyclic GMP/protein kinase G pathway as a therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* **2016**, *370*, 279–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Wu, Y.; Yuan, M.; Su, W.; Zhu, M.; Yao, X.; Wang, Y.; Qian, H.; Jiang, L.; Tao, Y.; Wu, M.; et al. The constitutively active PKG II mutant effectively inhibits gastric cancer development via a blockade of EGF/EGFR-associated signalling cascades. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2018**, *10*, 1758834017751635. [[CrossRef](#)]