



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL

**ANÁLISIS GENÉTICO MOLECULAR DE LA RETINITIS PIGMENTARIA
EN DOS FAMILIAS QUE PRESENTAN DIFERENTES MODOS
DE HERENCIA MENDELIANA**

Alejandro J. Brea Fernández
Santiago de Compostela, 2008

El Profesor Doctor Ángel Carracedo Álvarez, Catedrático de Medicina Legal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral: “ANÁLISIS GENÉTICO MOLECULAR DE LA RETINITIS PIGMENTARIA EN DOS FAMILIAS QUE PRESENTAN DIFERENTES MODOS DE HERENCIA MENDELIANA” del licenciado en Biología D. Alejandro J. Brea Fernández ha sido realizada bajo su dirección, considerándola en condiciones para optar al Grado de Doctor y autorizándola para su presentación ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Santiago de Compostela a 30 de Abril de 2008.

Fdo. Prof. Dr. Ángel Carracedo Álvarez

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL

ANÁLISIS GENÉTICO MOLECULAR DE LA RETINITIS PIGMENTARIA
EN DOS FAMILIAS QUE PRESENTAN DIFERENTES MODOS
DE HERENCIA MENDELIANA

Memoria que presenta, para optar al grado de Doctor,

Alejandro J. Brea Fernández

Santiago de Compostela, Abril 2008

A Pequi y a nuestro hijo Alejandro

Ante los fenómenos que desfilan por los órganos sensoriales, la actividad del intelecto sólo puede ser verdaderamente útil y fecunda reduciéndose modestamente a observarlos, describirlos, compararlos y clasificarlos, según sus analogías y diferencias, para llegar después, por inducción, al conocimiento de sus condiciones determinantes y leyes empíricas.

Santiago Ramón y Cajal, *Los tónicos de la voluntad*.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Doctor Ángel Carracedo, que confió en mí y me concedió la oportunidad de comenzar mi formación investigadora, integrándome en uno de los grupos más destacados dentro de la comunidad científica. Durante este largo camino siempre ha guiado mi trabajo, iniciándome en el estudio de las enfermedades hereditarias. Me transmitió su pasión por la investigación, con sus atinados consejos y entusiasmo contagioso por hacer ciencia. Ha sido extraordinario haber podido aprender tantos nuevos conceptos y diferentes enfoques de alguien con una formación científica tan elevada como la suya. Gracias por haberme apoyado y comprendido en todo momento. Sin tu inestimable ayuda nunca habría conseguido terminar esta Tesis Doctoral.

A la Profesora Doctora Roser González, por haber admitido mi estancia en su laboratorio y hacerme partícipe de su enorme afán investigador. Desde el primer momento su fuerza y su energía me arrastraron hacia una intensa actividad investigadora, haciendo que las horas en el laboratorio transcurriesen como segundos. Gracias por haberme instruido en los análisis de ligamiento y cosegregación, así como por tu inestimable y continuo apoyo.

A la Profesora Doctora María Victoria Lareu, por sus productivos consejos sobre las PCRs complicadas y sobre los geles. Gracias por ser una continua fuente de ánimos durante todo este tiempo y por apoyarme en innumerables ocasiones.

A la Profesora Doctora Gemma Marfany, por sus oportunas observaciones, sus valiosos comentarios científicos y por compartir conmigo su gran experiencia. Gracias por tus recomendaciones en el diseño de primers y en la interpretación de los geles.

A la Doctora María José Blanco, por haberme puesto en contacto con las familias afectadas y por haberme cedido las muestras biológicas empleadas en esta Tesis Doctoral.

A las familias afectadas por Retinitis Pigmentaria que han participado desinteresadamente en este estudio.

A mis compañeros del laboratorio del Instituto de Medicina Legal, con los cuales he compartido muchas charlas constructivas sobre genética forense y poblacional durante el breve espacio de tiempo transcurrido entre el revelado de los geles y con los que he pasado buenos ratos.

A la sección de Genética Molecular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, por su buen trato y por hacerme sentir como uno más del grupo.

A todas aquellas personas que de algún modo han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A mi familia, por haberme inculcado que el esfuerzo vale la pena, por su ayuda, por su apoyo y por su cariño.

A Pequi y a nuestro hijo Alejandro, por estar incondicionalmente siempre a mi lado, a pesar de haberos descuidado durante las muchas horas en las que estaba en el laboratorio. Su cariño, alegría y comprensión siempre han aliviado todas las preocupaciones surgidas durante la realización de esta Tesis Doctoral. Gracias por apoyarme durante todo este tiempo y por recibirme con una sonrisa cuando llego a casa.

ÍNDICE

INDICE.....	XIII
ABREVIATURAS.....	XXI
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Diferenciación de la retina de vertebrados.....	3
I.1.1. Desarrollo del epitelio pigmentario de la retina.....	4
I.1.2. Desarrollo de la retina neural.....	5
I.1.3. Desarrollo de las células fotorreceptoras: los bastones y los conos.....	7
I.1.4. Desarrollo del espacio interfotorreceptor.....	9
I.2. Topografía de la capa de fotorreceptores de la retina.....	10
I.3. Histopatología y patología molecular de la Retinitis Pigmentaria.....	12
I.3.1. Aspectos genéticos de la RP.....	13
I.3.1.1. Modos de herencia de la RP.....	13
I.3.1.2. RP sintomática.....	16
I.3.2. Aspectos clínicos de la RP.....	16
I.3.3. Hallazgos anatomopatológicos en la RP.....	17
I.3.4. Mecanismo de muerte celular en la RP.....	20
I.4. Genes responsables de la RP.....	21
I.4.1. Fototransducción.....	22
I.4.1.1. Fase de activación de la fototransducción.....	25
I.4.1.1.1. Fotoisomerización: activación de la rodopsina.....	25
I.4.1.1.2. Activación de la transducina.....	27
I.4.1.1.3. Activación de la fosfodiesterasa.....	29
I.4.1.1.4. Cierre de los canales asociados a cGMP.....	29
I.4.1.2. Fase de inactivación de la fototransducción.....	32
I.4.1.2.1. Inactivación de la rodopsina.....	32
I.4.1.2.2. Inactivación de la transducina.....	33
I.4.1.2.3. Inactivación de la fosfodiesterasa.....	34
I.4.1.2.4. Apertura de los canales regulados por cGMP.....	35
I.4.1.3. Translocación de la transducina, la arrestina y la recoverina.....	36
I.4.1.4. Genes responsables de RP implicados en la fototransducción.....	38
I.4.1.4.1. Rodopsina (opsina de los bastones).....	38
I.4.1.4.2. Subunidad α de la fosfodiesterasa de cGMP, 6.....	39
I.4.1.4.3. Subunidad β de la fosfodiesterasa de cGMP, 6.....	39
I.4.1.4.4. Subunidad α de los canales regulados por cGMP de los bastones, 1.....	40
I.4.1.4.5. Subunidad β de los canales regulados por cGMP de los bastones, 1.....	41
I.4.1.4.6. Arrestina.....	42
I.4.1.4.7. Proteína activadora de la guanilato ciclasa, 1B.....	42
I.4.2. Metabolismo del retinol.....	43
I.4.2.1. Vías alternativas del ciclo de los retinoides.....	48

I.4.2.2. El ciclo de los retinoides en los conos.....	49
I.4.2.3. Genes responsables de RP implicados en el metabolismo del retinol	50
I.4.2.3.1. Lecitín Retinol Aciltransferasa.....	50
I.4.2.3.2. Proteína de 65 kDa específica del epitelio pigmentario de la retina.....	51
I.4.2.3.3. Proteína de unión al retinaldehído, 1.....	53
I.4.2.3.4. Transportador con una cassette de unión a ATP.....	53
I.4.2.3.5. Receptor acoplado a proteína G del epitelio pigmentario de la retina.....	55
I.4.3. Mantenimiento de la estructura de las células fotorreceptoras.....	56
I.4.3.1. Genes responsables de RP implicados en el mantenimiento de la estructura de los fotorreceptores.....	63
I.4.3.1.1. Periferina 2 / RDS.....	63
I.4.3.1.2. Proteína de membrana del segmento externo de los bastones, 1.....	64
I.4.3.1.3. Prolinina, 1.....	65
I.4.4. Factores de transcripción de los fotorreceptores	66
I.4.4.1. Genes responsables de RP implicados en la transcripción	67
I.4.4.1.1. Factor de transcripción de conos y bastones con caja homeótica de tipo Otx.....	67
I.4.4.1.2. Factor de transcripción neuroretinal con cremallera de leucina.....	68
I.4.4.1.3. Receptor nuclear de la su familia 2 grupo E3.....	69
I.4.5. Interacciones celulares.....	70
I.4.5.1. Genes responsables de RP implicados en interacciones celulares.....	75
I.4.5.1.1. Protooncogen c-MER receptor tirosín kinasa.....	75
I.4.5.1.2. Homólogo del gen <i>crumbs</i> de <i>Drosophila</i>	76
I.4.5.1.3. Usherina.....	77
I.4.6. Procesado del RNA mensajero.....	78
I.4.6.1. Genes responsables de RP implicados en el procesado de mRNA	79
I.4.6.1.1. Factor 3 de procesado de pre-mRNA.....	79
I.4.6.1.2. Factor 8 de procesado de pre-mRNA.....	80
I.4.6.1.3. Factor 31 de procesado de pre-mRNA.....	81
I.4.6.1.4. Proteína RP9 o proteína asociada a la kinasa PIM1.....	82
I.4.7. Transporte intracelular y citoesqueleto	83
I.4.7.1. Genes responsables de RP implicados en el transporte intracelular y el citoesqueleto..	87
I.4.7.1.1. Proteína similar a <i>tubby</i>	87
I.4.7.1.2. Regulador de GTPasa implicado en Retinitis Pigmentaria.....	89
I.4.7.1.3. Proteína RP1.....	92
I.4.7.1.4. Proteína RP2.....	93
I.4.7.1.5. Fascina retinal.....	95
I.4.8. Genes responsables de RP con función desconocida.....	96
I.4.8.1. Inosina 5' monofosfato deshidrogenasa 1	96
I.4.8.2. Anhidrasa carbónica IV.....	97
I.4.8.3. Proteína similar a ceramida kinasa	98
I.4.8.4. Semaforina 4A.....	100
I.4.8.5. Proteína rica en arginina y serina de unión a Topoisomerasa I.....	101

I.4.8.6. Homólogo de la proteína canina de degeneración progresiva de conos y bastones.....	102
I.4.9. Los loci huérfanos de la RP.....	103
I.4.9.1. RP6.....	103
I.4.9.2. RP22.....	103
I.4.9.3. RP23.....	104
I.4.9.4. RP24.....	104
I.4.9.5. RP25.....	104
I.4.9.6. RP28.....	105
I.4.9.7. RP29.....	105
I.4.9.8. RP32.....	105
I.4.9.9. RP33.....	106
I.4.9.10. RP34.....	106
II. OBJETIVOS.....	107
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	111
III.1. Familias del estudio	113
III.1.1. Construcción de árboles genealógicos.....	113
III.1.2. Familia 68.....	113
III.1.3. Familia R.....	115
III.2. Extracción de ácidos nucleicos.....	115
III.2.1. Recogida de las muestras	115
III.2.2. Extracción de DNA genómico.....	116
III.2.2.1. Método de extracción de DNA genómico con Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico a partir de sangre total.....	116
III.2.2.2. Método de extracción de DNA genómico con QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN) a partir de sangre total.....	117
III.2.2.3. Cuantificación del DNA.....	118
III.2.2.4. Conservación del DNA	119
III.2.3. Extracción de RNA.....	119
III.2.3.1. Obtención de la interfase de células blancas de cada individuo.....	119
III.2.3.2. Aislamiento del RNA de las células blancas	120
III.2.3.3. Conservación del RNA	121
III.3. Análisis de marcadores genéticos polimórficos.....	121
III.3.1. Análisis de marcadores microsatélites	121
III.3.1.1. Parámetros de selección de los STRs.....	122
III.3.1.2. Primera fase: exclusión de los loci y genes conocidos	122
III.3.1.2.1. Locus RP2.....	122
III.3.1.2.2. Locus RP3.....	123
III.3.1.2.3. Locus RP6.....	123

III.3.1.2.4. Locus RP23	124
III.3.1.2.5. Locus RP24	124
III.3.1.2.6. Locus RP34	125
III.3.1.3. Segunda fase: Selección de STRs para acotamiento fino del locus RP24.....	125
III.3.1.4. Tercera fase: Selección de STRs para análisis de las regiones susceptibles de albergar un locus responsable de RP en el brazo largo del cromosoma X.....	125
III.3.1.4.1. Etapa I: análisis de la región subtelomérica del brazo largo	126
III.3.1.4.2. Etapa II: análisis de la región comprendida entre el centrómero y el locus RP24	126
III.3.1.4.3. Etapa III: análisis de la región Centrómero-RP24 ampliada en ambos extremos	126
III.3.1.4.4. Etapa IV: análisis de la región Centrómero-RP24 reampliada en su extremo 3'	126
III.3.1.5. Cuarta fase: Selección de STRs para análisis de las regiones susceptibles de albergar un locus responsable de RP en el brazo corto del cromosoma X.....	127
III.3.1.6. Quinta fase: análisis de 10 STRs del cromosoma X con un décaplex del IPATIMUP (Instituto de Inmunología y Patología Molecular de la Universidad de Oporto).....	127
III.3.2. Análisis de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs)	127
III.3.2.1. Parámetros de selección de SNPs.....	127
III.3.2.2. I Región: definida entre los marcadores DXS996 y DXS 1223.....	128
III.3.2.3. II Región: definida entre los marcadores DXS1224 y DXS 7163	128
III.3.2.4. III Región: definida entre los marcadores DXS1226 y DXS 9896.....	128
III.3.2.5. IV Región: definida entre los marcadores DXS9907 y DXS6679.....	129
III.3.2.6. V Región: definida entre los marcadores DXS1068 y DXS 988	129
III.3.2.7. VI Región: definida entre los marcadores DXS7132 y DXS 6800.....	129
III.3.2.8. VII Región: definida entre los marcadores DXS986 y DXS 1002	129
III.3.2.9. VIII Región: definida entre los marcadores DXS8045 y DXS 7423.....	129
III.3.3. Amplificación de STRs y SNPs por PCR.....	130
III.3.3.1. Diseño de los primers	130
III.3.3.2. Condiciones de amplificación.....	130
III.3.3.2.1. Termociclador	130
III.3.3.2.2.- Mezcla de reacción.....	130
III.3.3.2.3. Concentración de DNA	131
III.3.3.2.4. Programa de amplificación.....	131
III.3.3.2.5. Control de amplificación	131
III.3.4. Electroforesis y detección de los productos amplificados.....	132
III.3.4.1. Electroforesis vertical en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes.....	132
III.3.4.2. Electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes.....	133
III.3.4.3. Electroforesis capilar en secuenciador con primers marcados con FAM	134
III.3.5. Tinción de los geles	135
III.3.5.1 Tinción con Bromuro de Etidio	135
III.3.5.2. Tinción con nitrato de plata	136
III.3.6. Caracterización de los alelos.....	137
III.3.7. Reconstrucción de los haplotipos. Análisis de cosegregación	137

III.4. Análisis de genes responsables de RP autosómica recesiva	137
III.4.1. Array de genes de RP autosómica recesiva en plataforma SNPlex.....	138
III.4.2. Array de genes de RP autosómica recesiva en plataforma MassARRAY	142
III.4.3. Análisis de Cosegregación.....	145
III.5. Análisis Mutacional	146
III.5.1. Amplificación de los exones	146
III.5.1.1. Diseño de los primers.....	146
III.5.1.2. Mezcla de reacción.....	146
III.5.1.3. Programa de amplificación	146
III.5.1.4. Control de amplificación	147
III.5.2. Secuenciación directa de los exones amplificados.....	147
III.6. RT-PCRs y cDNAs.....	148
III.6.1. Diseño de los primers	148
III.6.2. Mezcla de reacción	149
III.6.3. Programa de amplificación.....	149
III.6.4. Control de amplificación.....	150
III.6.5. Secuenciación	150
III.7. Búsqueda por todo el genoma (<i>Whole Genome Scan</i>)	150
III.7.1. GeneChip® Human Mapping 250K NspI Array	150
III.7.2. Análisis de ligamiento.....	158
IV. RESULTADOS	161
IV.1. Capítulo I: Búsqueda del gen responsable de RP en la familia 68	163
IV.1.1. Análisis de marcadores microsatélites	165
IV.1.1.1. Primera fase: Exclusión de loci y genes conocidos	165
IV.1.1.1.1. Gen RP2 (Locus RP2)	165
IV.1.1.1.2. Gen RPGR (Locus RP3).....	166
IV.1.1.1.3. Locus RP6	166
IV.1.1.1.4. Locus RP23.....	167
IV.1.1.1.5. Locus RP24.....	168
IV.1.1.1.6. Locus RP34.....	169
IV.1.1.2. Segunda fase: Acotamiento fino del locus RP24.....	169
IV.1.1.3. Tercera fase: Análisis de las regiones susceptibles de albergar un locus responsable de RP en el brazo largo del cromosoma X.....	171
IV.1.1.3.1. Etapa I: análisis de la región subtelomérica del brazo largo	171
IV.1.1.3.2. Etapa II: análisis de la región comprendida entre el centrómero y el locus RP24.....	171
IV.1.1.3.3. Etapa III: análisis de la región centrómero-RP24 ampliada en ambos extremos	173
IV.1.1.3.4. Etapa IV: análisis de la región centrómero-RP24 reampliada en su extremo 3'	174
IV.1.1.4. Cuarta fase: análisis de las regiones susceptibles de albergar un locus responsable de RP en el brazo corto del cromosoma X.....	176

IV.1.1.5. Quinta fase: análisis con el décaplex del IPATIMUP.....	178
IV.1.2. Análisis de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs).....	178
IV.1.2.1. Región I, acotada por DXS996 y DXS1223	178
IV.1.2.2. Región II, acotada por DXS1224 y DXS 7163.....	179
IV.1.2.3. Región III, acotada por DXS1226 y DXS 9896	179
IV.1.2.4. Región IV, acotada por DXS9907 y DXS 6679.....	180
IV.1.2.5. Región V, acotada por DXS1068 y DXS988	180
IV.1.2.6. Región VI, acotada por DXS7132 y DXS 6800.....	180
IV.1.2.7. Región VII, acotada por DXS986 y DXS 1002	180
IV.1.2.8. Región VIII, acotada por DXS8045 y DXS 7423	181
IV.1.3. Reconstrucción de los haplotipos a partir de los genotipos	181
IV.1.4. Análisis de genes responsables de arRP: array de plataforma MassARRAY	183
IV.1.5. <i>Whole Genome Scan</i> : GeneChip® Human Mapping 250K NspI Array	185
IV.1.5.1. Análisis de ligamiento <i>Two-point</i>	185
IV.1.5.2. Análisis de ligamiento <i>Multipoint</i>	186
IV.2. Capítulo II: Búsqueda del gen responsable de RP en la familia R	203
V. DISCUSIÓN	227
Búsqueda del gen responsable de RP en la familia 68	229
Exclusión de loci y genes conocidos de la XIRP	230
Búsqueda de un nuevo locus en el cromosoma X.....	231
Análisis de genes responsables de arRP en la familia 68.....	233
Análisis de ligamiento de todo el genoma	235
Análisis de ligamiento paramétrico <i>Two-point</i>	237
Análisis de ligamiento paramétrico <i>Multipoint</i>	238
Búsqueda del gen responsable de RP en la familia R	241
Análisis mutacional del gen <i>MERTK</i>	242
Efecto de la mutación IVS16+1G>T	242
Mecanismos de degradación del mRNA alterado	246
Efecto de la mutación en la proteína	246
VI. CONCLUSIONES.....	249
VII. ANEXO.....	253
VIII. BIBLIOGRAFÍA	261

ABREVIATURAS

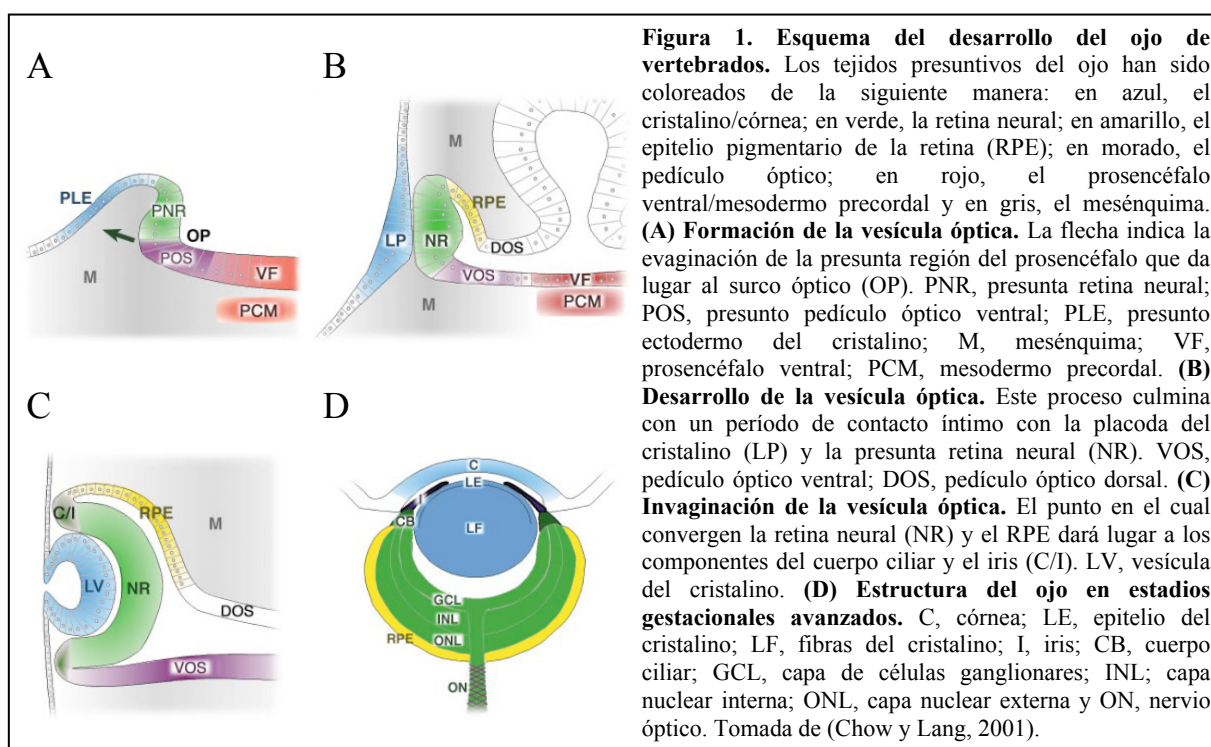
ad:	Autosómico dominante
AMD:	Degeneración macular atrófica (<i>Atrophic Macular Degeneration</i>)
ar:	Autosómico recesivo
ARAT:	Acil-CoA-retinol aciltransferasa
ARMD:	Degeneración macular asociada a la edad (<i>Age-Related Macular Degeneration</i>)
AVMD:	Distrofia macular viteliforme del adulto (<i>Adult Vitelliform Macular Dystrophy</i>)
BD:	Distrofia de Bothnia (<i>Bothnia Dystrophy</i>)
CACD:	Distrofia coroidea areolar central (<i>Central Areolar Choroidal Dystrophy</i>)
cGMP:	Guanidín Monofosfato cíclico
cM:	CentiMorgan
CNG:	Canales catiónicos regulados por cGMP (<i>Cyclic Nucleotide-Gated channel</i>)
COD:	Distrofia de los conos (<i>Cone Dystrophy</i>)
CORD:	Distrofia de conos y bastones (<i>Cone-Rod Dystrophy</i>)
CPRD:	Degeneración pigmentaria agrupada de la retina (<i>Clumped Pigmentary Retinal Degeneration</i>)
CRBP:	Proteína celular de unión al retinol (<i>Cellular Retinol Binding Protein</i>)
CS:	Esclerosis coroidea (<i>Choroidal Sclerosis</i>)
CSNB:	Ceguera nocturna estacionaria congénita (<i>Congenital Stationary Night Blindness</i>)
CSRD:	Distrofia retinal infantil severa (<i>Childhood-onset Severe Retinal Dystrophy</i>)
DAG:	Diacilglicerol
digRP:	RP digénica
EORD:	Distrofia Retinal de inicio temprano (<i>Early-Onset Retinal Dystrophy</i>)
ESCS:	Síndrome de incremento de conos S (<i>Enhanced S-Cone Syndrome</i>)
FFM:	<i>Fundus flavimaculatus</i>
FISH:	Hibridación <i>in situ</i> por fluorescencia (<i>Fluorescence in situ hybridation</i>)
G*:	G α _t -GTP activada
GARP:	Proteína rica en ácido glutámico (<i>Glutamic Acid-Rich Protein</i>)
GC:	Guanilato ciclasa
GCAP:	Proteína activadora de la guanilato ciclasa (<i>Guanylate Cyclase Activating Protein</i>)
GFS:	Síndrome de Goldmann-Favre (<i>Goldmann-Favre Syndrome</i>)
GPCRs:	Receptores acoplados a proteína G (<i>G Protein-Coupled Receptors</i>)
GRK1:	Rodopsín kinasa
GTP:	Guanosina 5'-trifosfato
INL:	Capa nuclear interna (<i>Inner Nuclear Layer</i>)

IRBP:	Proteína interfotorreceptora de unión a retinoides (<i>Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein</i>)
Kb:	Kilobase
LCA:	Amaurosis congénita de Leber (<i>Leber Congenital Amaurosis</i>)
LWS:	Sensible a longitud de onda larga (<i>Long Wavelength-Sensitive</i>)
Mb:	Megabase
MD:	Distrofia macular (<i>Macular Dystrophy</i>)
mRNA:	RNA mensajero
mtDNA	DNA mitocondrial
NFRCD:	Distrofia de conos y bastones de Newfoundland (<i>Newfoundland Rod-Cone Dystrophy</i>)
pb:	Par de bases
PCOD:	Distrofia progresiva de los conos (<i>Progressive Cone Dystrophy</i>)
PDE*:	Fosfodiesterasa activada
PE:	Fosfatidiletanolamina
PKA:	Proteín kinasa dependiente de cAMP
PLC:	Fosfolipasa C
PPCRA:	Atrofia corioretinal paravenosa pigmentaria (<i>Pigmented Paravenous Chorioretinal Atrophy</i>)
PPRPE:	Preservación Para-Arteriolar del RPE (<i>Para-Arteriolar Preservation of the RPE</i>)
PTK:	Proteín tirosín kinasa
PTP:	Proteín tirosín fosfatasa
R*:	Rodopsina activada
REC:	Recoverina
REST:	Partícula de almacenamiento de éster de retinil (<i>Retinyl Ester Storage Particle</i>)
RP:	Retinitis Pigmentaria
RPA:	Retinitis <i>punctata albescens</i>
RPE:	Epitelio Pigmentario de la Retina (<i>Retinal Pigment Epithelium</i>)
rpm:	Revoluciones por minuto
SDS:	Dodecil sulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SNP:	Polimorfismo de un único nucleótido (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
snRNP:	Ribonucleoproteína nuclear (<i>Small Nuclear Ribonucleoprotein</i>)
STGD:	Enfermedad de Stargardt (<i>Stargardt Disease</i>)
STR:	Repetición corta en tandem (<i>Short Tandem Repeat</i>)
SWS:	Sensible a longitud de onda corta (<i>Short Wavelength-Sensitive</i>)
USH:	Síndrome de Usher (<i>Usher Syndrome</i>)
XI:	Ligado al cromosoma X
λ_{\max}:	Máxima absorción

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Diferenciación de la retina de vertebrados

El interés por la anatomía, la función y el desarrollo del ojo humano se remonta a los tiempos de Aristóteles. No existía verdadera constancia de cómo se desencadenaban los hechos que conducían a la formación del ojo hasta que, en el siglo XVII, Steno y Malpighi describieron por primera vez la fisura coroidea (O'Rahilly, 1975). En la actualidad, este proceso es conocido desde las primeras divisiones del cigoto, apareciendo su primera manifestación a los 18 días de gestación (Figura 1). En este estadio embrionario, se distinguen dos surcos poco profundos a cada lado del cerebro anterior, los denominados surcos neurales. Hacia los 22 días –cuando el embrión posee 8 pares de somitas y aproximadamente 2 mm. de longitud total– aparecen el primordio y el surco óptico en el surco neural de cada lado del prosencéfalo. Dos días más tarde, el neuroporo rostral se cierra y se producen sendas evaginaciones del cerebro anterior a través de estos surcos originando las vesículas ópticas. Estas vesículas entran en contacto con el ectodermo superficial induciendo en él los cambios necesarios para la formación del cristalino. Así, sobre el día 28, se identifica el disco retinal en la pared de la vesícula óptica y el disco del cristalino en el ectodermo de superficie. Posteriormente, se produce la invaginación del disco retinal, el cual arrastra tras de sí a la vesícula óptica dando lugar a la formación de las cúpulas ópticas de pared doble. La capa interna y la externa de la pared doble están separadas por el espacio intrarretiniano que desaparece poco después haciendo que las dos capas se yuxtapongan. A lo largo del proceso de desarrollo del ojo, ambas capas sufrirán varios cambios que darán lugar a la formación de la retina neural a partir de la capa interna y del epitelio pigmentario de la retina a partir de la externa.



I.1.1. Desarrollo del epitelio pigmentario de la retina

Entre la quinta y la sexta semana de gestación, el presunto epitelio pigmentario de la retina (RPE) está constituido por una capa pseudoestratificada de células epiteliales columnares, caracterizadas por poseer un citoplasma denso, un núcleo oval y los primeros gránulos de pigmento (Kolb, 2003). El acúmulo progresivo de estos gránulos de pigmento (melanina) hace que este epitelio adopte una tonalidad oscura, motivo por el cual esta capa recibe el nombre de capa pigmentaria de la retina. La función de los gránulos de pigmento es absorber los fotones extraviados para evitar que sean reflejados hacia los fotorreceptores, lo que ocasionaría una imagen borrosa.

Hacia la séptima semana, se observan plegamientos basales y laterales de la membrana plasmática y formación de microvilli en la parte apical de las células del RPE. Una semana después las células poligonales del RPE se reordenan en un epitelio cúbico simple, cuyas superficies celulares basales se unen a la membrana basal de una capa rica en colágeno, la membrana de Bruch. Esta membrana separa el RPE de los capilares coroideos que serán utilizados como fuente principal de nutrientes y vía de intercambio de productos de desecho a través de plegamientos basales de las membranas de las células del RPE. De este modo, se produce el paso de moléculas –como el retinol– desde la vasculatura coroidea hasta el espacio interfotorreceptor, mediante proteínas de unión a retinoides que actúan como transportadoras.

Durante este estadio embrionario el RPE se mantiene en contacto con la presunta retina neural a través de uniones gap y de uniones de la *zonulae adherentes* (Hageman y Johnson, 1991). Además, existe una íntima relación entre los segmentos externos de las células fotorreceptoras y el RPE, ya que este último desempeña un papel importante en la formación del material necesario para constituir los discos lamelares (O'Rahilly, 1975). El numeroso microvilli apical de las células del RPE se proyectará en el espacio interfotorreceptor y establecerá una íntima asociación con los segmentos externos de los fotorreceptores. Esta asociación facilitará la fagocitosis y digestión de los paquetes de membranas eliminados por el proceso de renovación de los segmentos externos de los fotorreceptores, contribuyendo al correcto funcionamiento de los mismos.

En la etapa adulta la mayoría de las células del RPE humano poseen un único núcleo, con la excepción de las células de la más externa periferia que pueden ser multinucleadas. Las dimensiones de estas células varían con la excentricidad, siendo altas y delgadas cerca de la fovea y anchas en la periferia. En las células del RPE se observa una clara polarización, ya que las superficies basales y apicales presentan notables diferencias en cuanto a su ultraestructura, su composición lipídica y su composición proteica (Marmorstein, 2001). Cada célula del RPE presenta tres zonas claramente diferenciadas: la región basal (próxima a la membrana de Bruch) que contiene al núcleo y esta libre de pigmentación; la región apical, que contiene los gránulos de pigmento y el retículo endoplasmático liso; y el fino microvilli que se extiende desde la superficie apical y se interdigita con los segmentos externos de los fotorreceptores (Lamb y Pugh, 2004). La evidente polarización de JAM-C (*Junction*

Adhesion Molecule C) hacia la parte apical de las células de Müller y el microvilli del RPE podría estar relacionada con procesos de adhesión celular. JAM-C mantendría la asociación entre el RPE y las células de Müller con los fotorreceptores, facilitando el intercambio de metabolitos indispensables para el correcto funcionamiento de estos últimos. Probablemente, la expresión de JAM-C en el espacio interfotorreceptor se deba a la participación en la adhesión del RPE con la matriz interfotorreceptora y/o las células de Müller con la matriz interfotorreceptora (Daniele *et al.*, 2007).

I.1.2. Desarrollo de la retina neural

El desarrollo de la capa interna de la cúpula óptica o retina neural resulta más complejo que el del RPE. En un principio, esta capa de retina indiferenciada está compuesta por células neuroepiteliales que abarcan todo su grosor, desde la membrana limitante interna hasta la limitante externa. Ambas membranas limitantes aparecen durante el período propiamente embrionario, es decir, las primeras ocho semanas de gestación. Y así, mientras que la limitante interna surge como membrana basal en la superficie interna de la retina neural, la limitante externa aparece como un entramado de terminales de células de Müller y los segmentos internos de los fotorreceptores.

Aquellas células que constituyen los cuatro quintos posteriores de la capa interna de la cúpula óptica (porción óptica de la retina), y que bordean el espacio intrarretiniano, se diferenciarán en los elementos fotorreceptores: conos y bastones (Sadler, 2004). Adyacente a la capa fotorreceptora de reciente aparición surge la capa del manto, la cual –al igual que sucede en el cerebro– origina las neuronas y las células de sostén que conforman las capas nuclear externa, nuclear interna y la de células ganglionares. Ajena a estos procesos, la quinta parte anterior de la capa interna de la cúpula óptica (porción ciega de la retina) permanece como una capa de una célula de espesor. Sin embargo, en etapas posteriores, se dividirá en la porción irídea de la retina, que formará la capa interna del iris, y la porción ciliar de la retina, que participará en la formación del cuerpo ciliar. Mientras todo esto sucede, la región situada entre la cúpula óptica y el epitelio superficial suprayacente es ocupada por mesénquima laxo. En este tejido, aparecerán los músculos esfínter y dilatador de la pupila que se desarrollarán a partir del ectodermo subyacente de la cúpula óptica.

En la etapa adulta, el iris está formado por la capa externa pigmentaria y la capa interna no pigmentada de la cúpula óptica, así como por una capa de tejido conectivo muy vascularizado. La porción ciliar de la retina presenta pliegues sobresalientes y está cubierta en su exterior por una capa de mesénquima que forma el músculo ciliar. Internamente está unida con el cristalino a través de una red de fibras elásticas denominada zónula o ligamento suspensorio del cristalino. La contracción del músculo ciliar modifica la tensión del ligamento y regula la curvatura del cristalino, proporcionando el enfoque adecuado de la imagen sobre la retina.

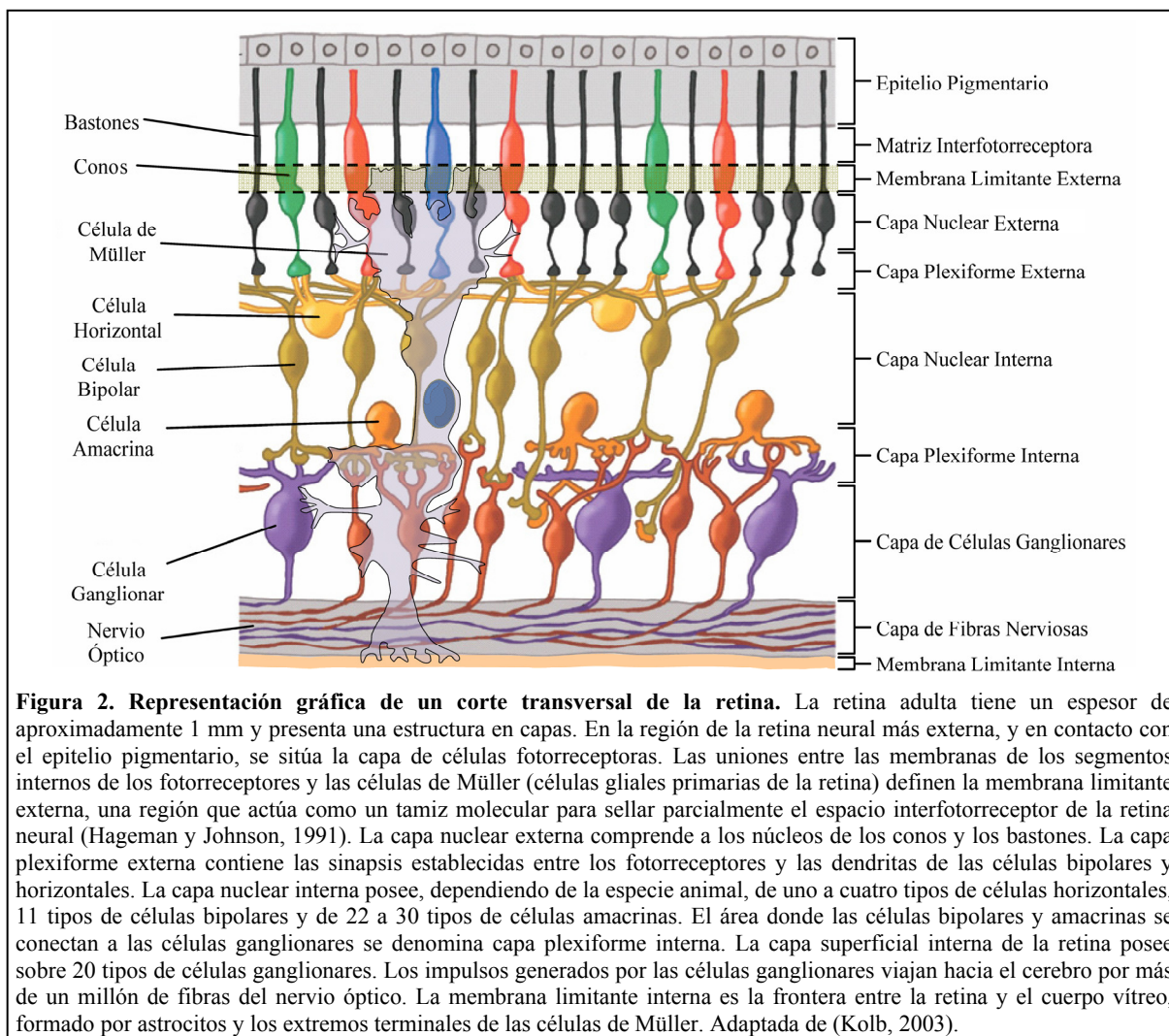
A las seis semanas de gestación, se evidencian las capas neuroblásticas interna y externa que surgen de las zonas proliferativa y primitiva de la capa interna de la cúpula óptica. Ambas capas

neuroblásticas comienzan a separarse a partir de una región temporal de la zona marginal conocida como la capa de fibras transitoria o de Chievitz (Smelser *et al.*, 1973), que no está presente en mamíferos no Primates. Además de todas estas capas, en la superficie de la capa interna de la cúpula óptica se encuentra una capa fibrosa que alberga los axones de las neuronas de las capas más profundas. Las fibras nerviosas de esta zona convergen hacia el pedículo óptico, introduciéndose por la fisura coroidea para poder llegar a las áreas ópticas del cerebro, dando lugar a la formación del nervio óptico.

Hacia la decimosexta semana se pueden observar procesos de células cercanos a la superficie interna de la retina, recubiertos por una lámina basal continua (O'Rahilly, 1975). Los axones de las células ganglionares comienzan entonces a interponerse entre los procesos de células, pero no entrarán en contacto directo con la superficie vítrea hasta el estadio de 30 mm. (octava semana). Cuando el feto alcanza este estadio, las fibras radiales se extienden entre los grupos de axones de la capa de fibras nerviosas y se expanden hacia la superficie vítrea para formar un escudo completo entre la capa de fibras nerviosas y el cuerpo vítreo. Las fibras radiales (o de Müller) aparecen durante el período propiamente embrionario y están relacionadas con la lámina basal de la superficie vítrea. Entre el estadio de 50 mm. y el de 83 mm., las fibras radiales se disponen externamente en relación a sus cuerpos celulares, que contienen núcleos oscuros y angulares, y se sitúan en la capa de células ganglionares. En el estadio de 120 mm. las fibras radiales que se extienden externamente se encuentran entre los conos y los bastones.

Al final del período propiamente embrionario, la retina comprende la capa pigmentaria, la futura membrana limitante externa, la zona proliferativa, la capa neuroblástica externa, la capa de fibras transitoria, la capa neuroblástica interna, la capa de fibras nerviosas y la membrana limitante interna. De hecho, antes de alcanzar la mitad del período prenatal ya pueden ser reconocidas todas las capas de la retina adulta (Figura 2). Esta configuración espacial de las capas ubica a las células fotorreceptoras en la parte más externa de la retina neural y, en consecuencia, obliga a los estímulos luminosos a atravesar casi todas las capas de la retina antes de alcanzar a los conos y a los bastones. Esta organización estructural está justificada por la necesidad de que las membranas de los fotorreceptores estén en contacto físico con el RPE, puesto que este es el proveedor de una molécula esencial para la fototransducción: el retinal o vitamina A (Kolb, 2003).

La diferenciación macular propiamente dicha, tiene lugar desde el octavo mes de vida intrauterina hasta el cuarto mes después del nacimiento. Algo similar ocurre con la fovea, identificada hacia la semana 22 como una zona de la capa de fotorreceptores que solamente contiene conos y una inusual delgada capa de células ganglionares. Durante el desarrollo de la retina, los procesos de diferenciación surgen inicialmente en la fovea y se extienden desde la parte central a la periférica como una onda (Bumsted O'Brien *et al.*, 2003). Después del nacimiento, la fovea continúa desarrollándose, no logrando su completa diferenciación hasta el tercer o cuarto año postnatal (Hageman y Johnson, 1991).



I.1.3. Desarrollo de las células fotorreceptoras: los bastones y los conos

La mayoría de las células que constituyen la retina adulta, si no todas, surgen de una misma célula precursora totipotencial y se van diferenciando a lo largo del proceso de desarrollo en un orden evolutivamente conservado (Morrow *et al.*, 1998). De este modo, en torno a la décima semana de gestación, se produce la diferenciación de las células fotorreceptoras en las capas más externas de la retina neural, aunque su identificación resulta francamente dificultosa (Hageman y Johnson, 1991). Transcurridas dos semanas, los conos ya son fácilmente reconocibles por su aspecto alargado y ligeramente oval, y por su gran acumulación yuxtannuclear de retículo endoplasmático liso. Sin embargo, habrá que esperar hasta la decimoquinta semana del desarrollo embrionario para que los bastones puedan ser correctamente identificados.

A las doce semanas se establecen sinapsis entre los pedículos de los conos y la capa plexiforme externa. No obstante, la formación de sinapsis en los bastones no sucede hasta las

dieciocho semanas de gestación. Durante la semana quince los segmentos internos de los bastones se extienden entre la membrana limitante externa de forma adyacente a los conos, formando el cuerpo basal del cilio de conexión y asociándose a las fibras radiculares. Finalmente, a las veinticuatro semanas, ambos tipos de células fotorreceptoras están correctamente polarizadas y poseen diferentes segmentos internos que se extienden unos 2 μm dentro de la membrana limitante externa.

A las dieciséis semanas comienzan a desarrollarse unos rudimentarios segmentos externos de los conos, presentes en gran número y rellenos de espirales de estructuras tubulares. Inicialmente, la mayoría de los segmentos externos solamente presentan túbulos ciliares originados a partir del cuerpo basal, pero poco después se formarán los precursores tubulares de los sacos lamelares por invaginación de la membrana plasmática. Por tal motivo, en la semana veinticuatro se evidencia un acúmulo de discos de membranas en la mayoría de los segmentos externos de los conos. No sucede lo mismo con los bastones, ya que a las veintiocho semanas de gestación aún contienen una mezcla de discos uniformes y aleatoriamente orientados que no se asemejarán a los segmentos externos de los

bastones adultos hasta la semana treinta y seis. En torno a esta semana, la retina fetal presenta una gran similitud con la del adulto y se comprueba que los segmentos externos albergan gran cantidad de sacos lamelares amontonados que ocupan la gran mayoría de su volumen.

A lo largo de los puntos anteriores han sido mencionadas diferentes partes morfológicas similares en los bastones y en los conos. Ambas células fotorreceptoras muestran un segmento externo, un segmento interno, un cilio conector, una región pericaria que contiene al núcleo y un terminal sináptico (Figura 3). Si bien es cierto que toda célula fotorreceptora, independientemente del tipo de que se trate, presenta estos elementos morfológicos, también lo es que en ellos existen en ellos innegables diferencias que permiten definir el tipo de fotorreceptor.

La diferencia más notable es, sin duda, la desigual morfología del segmento externo. En los bastones es cilíndrico, alargado y redondeado en su extremo terminal, mientras que en los conos es cónico y no tan alargado. Son evidentes, también, las diferencias en el contenido de estos segmentos externos. El de los bastones contiene ~ 1000 discos de membrana independientes, cada uno de los cuales contiene ~ 10000 moléculas fotosensibles o pigmentos visuales. Los segmentos

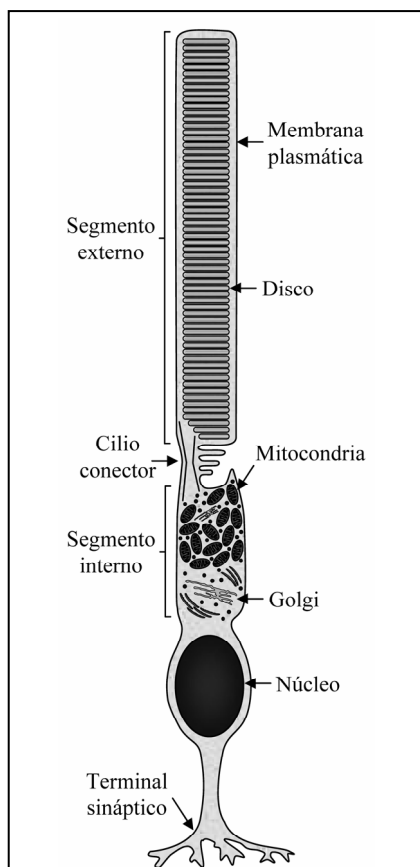


Figura 3. Estructura de un bastón de vertebrados. El segmento externo de los bastones está especializado en la fotorrecepción, mientras que el interno contiene toda la maquinaria metabólica de la célula. El cilio conector actúa como puente de unión entre ambos segmentos. En la base del fotorreceptor se establecen sinapsis con neuronas de segundo orden. Adaptada de (Hargrave y McDowell, 1992).

externos de los conos también poseen discos con pigmentos visuales, aunque estos presentan una continuidad con la membrana plasmática del segmento externo y se forman por plegamientos de la misma (Yokoyama y Yokoyama, 1996; Pugh, 2001). Otra diferencia reside en la presencia de incisuras en los discos de los bastones (Figura 4), no observadas en los discos de los conos (Molday, 1998). Las incisuras incrementan el espacio citoplasmático y facilitan la difusión de Guanidín Monofosfato cíclico (cGMP) y Ca^{2+} , lo que permite una mejor comunicación entre los discos. Además, causan la división del disco en varios dominios separados, impidiendo la libre difusión de la rodopsina, la transducina y la fosfodiesterasa entre ellos. Esto provoca que la fotorrespuesta se localice solamente en aquellos dominios que son excitados por los fotones (Caruso *et al.*, 2006).

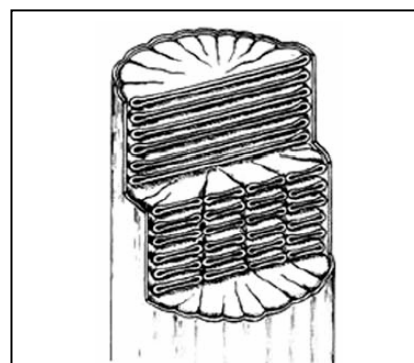


Figura 4. Representación gráfica de la estructura de un segmento externo de bastón. Las incisuras delimitan dominios separados en los discos que adoptan la forma de lóbulos o pétalos. Tomada de (Caruso *et al.*, 2006).

Un cilio delgado e inmóvil (el cilio conector) mantiene la continuidad citoplasmática entre el segmento externo y el interno; un compartimento que contiene las mitocondrias, el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y otras organelas subcelulares necesarias para el mantenimiento de la célula. Contigua al segmento interno se encuentra la región pericaria, la cual se extiende hasta el terminal sináptico. La señal eléctrica generada por la célula fotorreceptora cuando es excitada por la luz, será transmitida desde el terminal sináptico hacia otras neuronas de la retina (Molday, 1998).

I.1.4. Desarrollo del espacio interfotorreceptor

Entre las semanas quince y dieciocho desaparecen las uniones intercelulares establecidas en estadios gestacionales previos entre el RPE y las células de la retina neural (Hageman y Johnson, 1991). Se origina, entonces, un espacio repleto de material amorfo fácilmente reconocible en torno a los extremos de los segmentos internos de los fotorreceptores. Este espacio –denominado espacio interfotorreceptor o subretinal– es el remanente de la cavidad central de la vesícula óptica embrionaria y en él tienen lugar las importantes interacciones entre las células fotorreceptoras, la retina neural y la vasculatura coroidea. El borde externo del espacio interfotorreceptor está definido por la capa de células del RPE unidas a través de uniones estrechas (*zonulae occludentes*) (Milam *et al.*, 1998). El borde interno está compuesto por la alternancia de segmentos internos de fotorreceptores y procesos de las células de Müller unidos mediante uniones intermedias (*zonulae adherentes*), constituyendo la membrana limitante externa.

Aunque se conoce muy poco sobre el desarrollo del espacio interfotorreceptor, se ha podido constatar que la primera detección de la proteína interfotorreceptora de unión a retinoides (IRBP; componente mayoritario de la matriz interfotorreceptora adulta en humanos) se evidencia en la retina

de fetos de 20 semanas, tiempo en el cual se produce la diferenciación de los segmentos externos de las células fotorreceptoras (Hageman y Johnson, 1991). Los bastones son las primeras células involucradas en la síntesis de IRBP y en su consiguiente secreción dentro de la matriz interfotorreceptora. La importancia de la regulación de la permeabilidad en la membrana limitante externa ejercida por las JAMs (*Junction Adhesion Molecules A, B y C*) radica en evitar la salida de la proteína IRBP del espacio interfotorreceptor, en donde es absolutamente necesaria (Daniele *et al.*, 2007). Además de esta molécula, la matriz interfotorreceptora está constituida por otras proteínas, glicoproteínas y glucosaminoglicanos. Entre ellos se pueden encontrar glicoproteínas similares a la mucina, varios enzimas, una fosfodiesterasa de cGMP, antígenos solubles, factores tróficos y una gran variedad de proteínas séricas, tales como la albúmina o las inmunoglobulinas (Hageman y Johnson, 1991). Se ha comprobado que los componentes de la matriz interfotorreceptora se distribuyen de forma heterogénea siguiendo dos patrones básicos: aquel que demuestra diferencia de composición apical-basal; y aquel que demuestra diferencia de composición dependiendo del tipo de célula fotorreceptora con la que toma contacto. Las interacciones entre las regiones apicales del RPE, las células de Müller y los fotorreceptores con la matriz interfotorreceptora son esenciales para el mantenimiento de la aposición del RPE y la retina neural. La alteración química de los componentes de la matriz interfotorreceptora provocaría la separación de la retina del RPE (Daniele *et al.*, 2007).

I.2. Topografía de la capa de fotorreceptores de la retina

Los bastones y los conos, fácilmente distinguibles entre sí por su particular morfología, pueden ser reconocidos en la mayoría de las retinas de los vertebrados. La proporción de bastones/conos de una retina suele servir como indicador del estilo de vida del animal del que procede. Así, las retinas de animales nocturnos o de las profundidades marinas, presentan una mayor cantidad de bastones, maximizando la sensibilidad a la luz en detrimento de la discriminación de color (visión escotópica). Por su parte, las retinas de los animales diurnos presentan una mayor cantidad de conos, los cuales facilitan la visión en condiciones de alta intensidad de brillo y proporcionan una óptima visión en color (visión fotópica). Como ejemplos de las distribuciones extremas de los fotorreceptores se pueden citar a *Gekko gekko*, un gecko nocturno que solo posee bastones en su retina y a *Anolis carolinensis*, un camaleón americano en cuya retina solo existen conos (Yokoyama y Yokoyama, 1996).

La enorme mayoría de los primates poseen ojos especializados en la visión diurna, pero aún así en sus retinas se encuentran ambos tipos de células fotorreceptoras. Fisiológicamente, los bastones son 100 veces más sensibles a la luz que los conos, aunque detectan una gama más reducida de las intensidades de luz de fondo y su respuesta a la luz es de 2 a 5 veces más lenta. En consecuencia,

mediante los conos discriminan colores y finos detalles a plena luz del día, mientras que con los bastones garantizan –aunque de forma menos eficiente– la visión en condiciones de luz tenue (visión mesotópica). Es bastante impreciso realizar un cómputo de los fotorreceptores de una retina, puesto que en la medida influirán factores como la edad del donante, el tamaño de la porción analizada, la localización anatómica de la porción en la retina y la gran variabilidad existente en relación con la cantidad de fotorreceptores que posee cada individuo (Jonas *et al.*, 1992; Curcio *et al.*, 1993). Pese a ello, en 1935, Østerberg realizó el primer cómputo de células fotorreceptoras en la retina de un único ojo de un varón de 16 años. Los datos obtenidos reflejaban unos valores totales de 110000000 a 125000000 bastones y de 6300000 a 6800000 conos. Además, calculó las densidades de los conos obteniendo un valor máximo de 150000 conos/mm² en el centro de la fovea, que descendía bruscamente a 4000-5000 conos/mm² en la periferia de la retina. Del mismo modo calculó las densidades de los bastones, encontrando un máximo de 160000 bastones/mm² a unos 5-6 mm del centro de la fovea (no detectó la presencia de bastones en la fovea) que disminuía progresivamente a 30000-40000 bastones/mm² en la periferia de la retina. Un estudio posterior realizado sobre una mayor cantidad de retinas y con otras técnicas evidenció valores menores que los obtenidos por Østerberg. Así, las cifras totales obtenidas fueron de 38742000 a 80650000 bastones y de 2235495 a 4284437 conos. La densidad máxima de conos se situó en 125000 conos/mm² a una distancia aproximada de 40 µm del centro de la fovea. Sin embargo, como estos estudios no evaluaban el contenido en fotorreceptores del centro de la fovea, fue necesario realizar una extrapolación a partir de una curva de distribución en dirección a la fovea para estimar las densidades de los conos, obteniéndose un valor final de 150000 a 180000 conos/mm², en concordancia con los datos obtenidos por Østerberg. En cuanto a la densidad de los bastones, el pico máximo obtenido de 150000 bastones/mm² se localizaba a 3-5 mm de la fovea, reduciéndose esta cifra hasta los 30000-40000 bastones/mm² en la periferia de la retina, dato que también se correspondía con el estudio de Østerberg (Jonas *et al.*, 1992).

Finalmente, el estudio de la topografía de las células fotorreceptoras en la retina humana refleja un hacinamiento de los conos en una pequeña región de la retina denominada fovea, donde se focaliza la imagen (Figura 5). Dentro de la fovea existe una pequeña región central de unos 100 µm de diámetro en la cual la densidad de conos sensibles a longitudes de onda corta o al azul disminuye bruscamente y llega a alcanzar valores nulos en los 50 µm centrales (Bumsted y Hendrickson, 1999). Hasta el momento, se desconoce si la ausencia de este tipo de conos en esta región de la fovea supone alguna ventaja en la capacidad visual. Por otro lado, los bastones se disponen en las partes más periféricas de la retina permitiendo la captación de luz tenue en la oscuridad (Kolb, 2003).

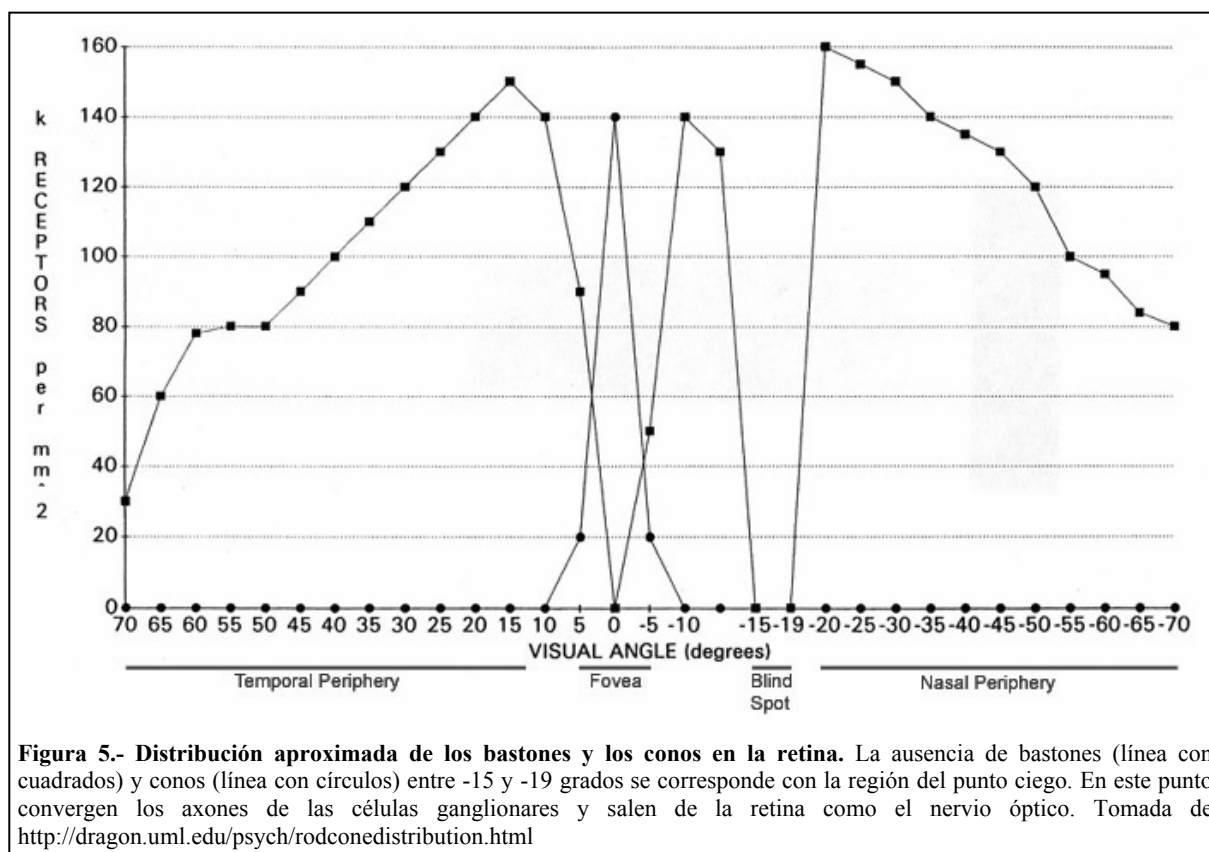


Figura 5.- Distribución aproximada de los bastones y los conos en la retina. La ausencia de bastones (línea con cuadrados) y conos (línea con círculos) entre -15 y -19 grados se corresponde con la región del punto ciego. En este punto convergen los axones de las células ganglionares y salen de la retina como el nervio óptico. Tomada de <http://dragon.uml.edu/psych/rodconedistribution.html>

I.3. Histopatología y patología molecular de la Retinitis Pigmentaria

El término Retinitis Pigmentaria (RP; OMIM #268000) fue empleado por primera vez en 1857 por el médico holandés Franz Cornelius Donders (Tilburg in Nordbrabant, 1818 – Utrecht, 1889). Con él hacía referencia a las alteraciones pigmentarias observadas en la retina de algunos individuos ciegos. A lo largo de los años este término ha sido muy criticado, principalmente porque no existe evidencia alguna que indique un origen inflamatorio de esta patología (Dewar y Reading, 1975). Hoy en día, aunque se reconoce que la expresión Retinitis Pigmentaria es semánticamente incorrecta, puesto que RP es una patología hereditaria y no inflamatoria, sigue siendo ampliamente aceptada y utilizada (Pagon, 1988).

La RP forma parte de un grupo de enfermedades hereditarias de la retina caracterizadas por la degeneración progresiva de los conos y los bastones (Armstrong y Smith, 1999; Hartong *et al.*, 2006). En este grupo también se incluye la ceguera nocturna estacionaria congénita (CSNB), la distrofia macular (MD), la distrofia de conos y bastones (CORD) y la degeneración macular asociada a la edad (ARMD) (Armstrong y Smith, 1999). Los estudios realizados sobre RP en diferentes poblaciones han permitido estimar una prevalencia mundial de 1 de cada 4000 personas (Haim, 2002; Hamel, 2006; Hartong *et al.*, 2006).

I.3.1. Aspectos genéticos de la RP

La naturaleza hereditaria de la RP se confirmó cuando Liebreich, en 1861, observó que la incidencia de esta patología era más alta en familias resultantes de matrimonios entre primos hermanos (Dewar y Reading, 1975). La RP es una de las patologías moleculares con mayor heterogeneidad genética en cuanto al modo de herencia. Aproximadamente el 45% de los casos de RP son esporádicos, pero los restantes presentan diversos patrones de herencia (Hamel, 2003). La RP puede ser heredada como un carácter autosómico dominante (30-40% de los casos), autosómico recesivo (50-60%) o ligado al cromosoma X (5-15%) (Hartong *et al.*, 2006). Estas proporciones asumen que todos los casos aislados son autosómicos recesivos, aunque unos pocos podrían presentar nuevas mutaciones dominantes, ejemplos de isodisomía uniparental o, en los hombres, mutaciones ligadas a X (Thompson *et al.*, 2002; Rivolta *et al.*, 2002a). Patrones de herencia no mendeliana, como son la herencia digénica (Goldberg y Molday, 1996; Dryja *et al.*, 1997; Kedzierski *et al.*, 2001; Loewen *et al.*, 2001) o la herencia mitocondrial (Mansergh *et al.*, 1999), representan una pequeña proporción de los casos. Las variaciones en la penetrancia son frecuentes, particularmente en el caso de las mutaciones de *PAP1*, *PRPF31* y *RPI* (van Heyningen y Yeyati, 2004; Hamel, 2006). Por otro lado, además de la presentación no sindrómica, RP puede presentarse de forma sindrómica como el síndrome de Usher o el de Bardet-Biedl (Farrar *et al.*, 2002).

I.3.1.1. Modos de herencia de la RP

Esta patología está relacionada con múltiples genes, los cuales muestran varios patrones de herencia:

1.- RP autosómica dominante (adRP). Las formas autosómicas dominantes representan un 30-40% de los casos de RP. Son fácilmente identificables mediante un examen minucioso de los individuos afectados, los cuales presentarán rasgos o características asociados a la función genética aberrante (Armstrong y Smith, 1999). En estas formas de RP el inicio de la sintomatología suele instaurarse al final de la primera o inicio de la segunda década de vida. La relativamente suave sintomatología inicial irá volviéndose más severa a medida que avanza el desarrollo de la patología (Dewar y Reading, 1975). Algunas de las formas de adRP pueden mostrar penetrancia incompleta (Voaden, 1991). La variación de la expresión del alelo salvaje en contraposición con la del mutante puede influenciar la penetrancia del fenotipo patológico (van Heyningen y Yeyati, 2004). En el caso de *PRPF31*, las manifestaciones clínicas de la RP parecen estar moduladas por la baja expresión del alelo salvaje en contraposición con la del alelo mutado (Vithana *et al.*, 2003; Rivolta *et al.*, 2006). Los individuos sintomáticos heredarían de su progenitor no portador una relativamente pobre expresión del alelo salvaje, en comparación con los individuos asintomáticos. Los bajos niveles de la proteína PRPF31 en los fotorreceptores provocarían un empeoramiento de la sintomatología de la RP, debido a

la sensibilidad que presentan estas células ante cambios de concentración de este factor de splicing en situaciones de elevada síntesis de RNA mensajero o mRNA (como la generada durante el recambio de los segmentos externos).

2.- RP autosómica recesiva (arRP). Las formas autosómicas recesivas explican entre un 50 y un 60% de los casos de RP. Al contrario de lo que sucede en la adRP, los individuos que heredan un único alelo autosómico recesivo de RP no muestran ningún signo de la patología. Generalmente, la sintomatología de estas formas de RP comienza en torno al final de la primera o inicio de la segunda década de vida (Dewar y Reading, 1975). Sin embargo, existen formas de arRP de inicio tardío. Estas son poco frecuentes y suelen provocar un deterioro moderado de la función retinal, con una progresión más lenta y menor pérdida de agudeza visual que las formas de inicio temprano.

3.- RP ligada al cromosoma X (XIRP). La naturaleza heterogénea de la RP se confirma al comprobar que esta patología presenta patrones de herencia asociados con el género (Falls, 1952; Bird, 1975). Aunque las formas de RP ligadas al sexo son menos frecuentes que las de adRP y arRP (un 5-15% de los casos), son consideradas las más severas en cuanto a inicio y progresión (Capeans *et al.*, 1998). La progresión de la disfunción de los fotorreceptores es menor en la adRP, seguida por la arRP, siendo la más rápida en XIRP (Baumgartner, 2000; Tzekov *et al.*, 2003). Los fenotipos XIRP son más frecuentes en hombres que en mujeres, puesto que las mujeres portadoras pueden minimizar los efectos negativos de los genes defectivos gracias al proceso de inactivación al azar (lyonización) del cromosoma X. La diferente inactivación del cromosoma X en estas mujeres origina un mosaico somático constituido por células con el cromosoma X mutado inactivado y células con el cromosoma X normal inactivado (Rivolta *et al.*, 2002b). Estas mujeres pueden presentar características del *fundus* y/o anomalías electrorretinográficas que indican una pérdida moderada de fotorreceptores. Sin embargo, algunas de estas portadoras pueden mostrar un cuadro clínico de degeneración retinal que, probablemente, se deba a la desfavorable inactivación del cromosoma X normal en la mayoría de las células de la retina. Aunque los síntomas pueden ser severos, lo normal es que las portadoras padezcan una patología menos agresiva que la de los hombres afectados.

4.- Herencia Mitocondrial. Otra forma de herencia ligada al sexo de la RP, totalmente distinta a la anterior en cuanto a sus determinantes genéticos, es la asociada con la herencia de línea materna. En un pedigree irlandés, cuyos individuos afectados presentaban RP y pérdida auditiva progresiva (síntomas similares a síndrome de Usher tipo III), se encontró que el patrón de cosegregación podía ser compatible con herencia autosómica dominante, ligada al sexo o matrilineal (Mansergh *et al.*, 1999). La búsqueda del posible gen causal mediante análisis de ligamiento consiguió excluir más del 90% del genoma nuclear. La marcada variabilidad en los síntomas, junto con la observación de anomalías musculares y cardíacas subclínicas, potenciaron la secuenciación del DNA mitocondrial (mtDNA) de los individuos de este pedigree en busca de posibles alteraciones. La secuenciación reveló la presencia de una transversión heteroplásmica C>A en la posición 12258 del mtDNA de los individuos afectados, no presente en ninguno de los 270 individuos sanos utilizados

como controles. Los datos obtenidos avalaban la evidencia de que la mutación C12258A del mtDNA era responsable del fenotipo de la RP en este pedigree y que la variabilidad de los síntomas se debía al grado de heteroplasmía. Aunque no se conoce de forma precisa el mecanismo molecular causante de este fenotipo, se intuye que debe estar relacionado con la reducción de la producción de ATP por la mitocondria. Esto originaría graves consecuencias en los tejidos con gran demanda de ATP, tales como el muscular o el neural.

5.- Herencia digénica de la RP. En aquellos casos en los que una pareja de individuos con un mismo fenotipo patológico recesivo da lugar a una nueva generación de individuos normales se confirma que los progenitores difieren en los genes que causan ese fenotipo (Rivolta *et al.*, 2002b). Todos los individuos de la nueva generación serán dobles heterocigotos obligados y portarán un alelo salvaje y otro mutado de cada uno de los dos loci. En tal caso, de estos dos loci se dice que son complementarios o que exhiben complementación no alélica. Si, por el contrario, los dobles heterocigotos de una generación fuesen afectados, se consideraría que estos dos loci se encuentran en un estado de no complementación no alélica.

La primera prueba de herencia digénica dialélica en humanos fue aportada por los estudios de los genes *RDS* y *ROM1* en unas pocas familias con RP. Mientras que todos los individuos afectados de estas familias eran dobles heterocigotos y portaban sendas mutaciones en *ROM1* y en *RDS* (Goldberg y Molday, 1996; Dryja *et al.*, 1997; Loewen *et al.*, 2001), los que solamente portaban una de las dos mutaciones eran sanos. Ratones con mutaciones en *Rds* y *Rom1* similares a las encontradas en estas familias presentaban fenotipos parecidos (Kedzierski *et al.*, 2001). La mutación en *RDS* encontrada en todas estas familias con RP digénica, afecta a un aminoácido esencial para el ensamblaje del complejo RDS/ROM1 (Goldberg y Molday, 1996; Loewen *et al.*, 2001). Los mutantes pueden formar dímeros RDS/RDS, pero no pueden formar el complejo tetramérico con los dímeros de ROM1/ROM1. El gran descenso de la cantidad de tetrámeros funcionales sería responsable de la patología en los dobles heterocigotos. En los heterocigotos sencillos, las mutaciones de RDS o ROM1 no impedirían la formación de las cantidades de tetrámero necesarias para mantener la estructura y viabilidad del fotorreceptor.

6.- Disomías uniparentales. El inusual modo de herencia mediante el cual un individuo puede recibir los dos cromosomas de un par cromosómico de un único progenitor se denomina disomía uniparental (Rivolta *et al.*, 2002b). Si el par cromosómico heredado es el mismo que el del progenitor donante, se habla de heterodisomía uniparental. En cambio, si el par cromosómico uniparental heredado se origina por la duplicación de un único cromosoma del progenitor, se dice que existe isodisomía uniparental y el individuo será homoalélico para todos los loci de ese cromosoma. No obstante, los cromosomas heterodisómicos uniparentales pueden poseer regiones isodisómicas debido a los eventos de recombinación meiótica sufridos tras su anormal segregación. La isodisomía uniparental puede revelar la presencia de alelos patológicos recesivos en el cromosoma duplicado, puesto que la homocigosidad de dichos alelos originará la aparición de fenotipos patológicos. A lo

largo de la literatura se pueden encontrar artículos que relacionan la isodisomía uniparental con RP (Thompson *et al.*, 2002; Rivolta *et al.*, 2002a). Sin embargo, los casos de RP asociados a isodisomía uniparental son tan escasos que es difícil conocer con certeza la frecuencia de esta combinación.

I.3.1.2. RP sindrómica

RP es una patología que generalmente se encuentra confinada al ojo, ocasionando graves daños. Sin embargo, el 20-30% de los afectados presentan, además de la RP, una enfermedad no ocular asociada, dando lugar a más de 30 síndromes diferentes (Hartong *et al.*, 2006). La forma más frecuente de RP sindrómica es el síndrome de Usher (10-20% de los casos de RP recesiva), en el cual la RP se asocia con deterioro auditivo. Mutaciones en al menos 11 genes causan la aparición de uno de los tres tipos conocidos de síndrome de Usher. El tipo I cursa con pérdida auditiva profunda presente desde el nacimiento y ataxia vestibular. El tipo II presenta moderada pérdida auditiva no progresiva. Y el tipo III, se manifiesta con audición normal durante la juventud, que puede ir empeorando gradualmente a medida que el individuo envejece (Lorenz y Preising, 2004; Reiners *et al.*, 2006). Dependiendo de la mutación, varios genes del síndrome de Usher pueden causar RP sin pérdida auditiva (Rivolta *et al.*, 2002a; Bernal *et al.*, 2003a; Aller *et al.*, 2004) o sordera profunda sin RP (Liu *et al.*, 1997; Weil *et al.*, 1997; Bork *et al.*, 2001; Astuto *et al.*, 2002). Otra forma importante de RP sindrómica es el síndrome de Bardet-Biedl (5-6% de los casos de RP). En este síndrome la RP puede asociarse de modo variable con obesidad, deterioro cognitivo, polidactilia, hipogenitalismo y enfermedad renal (Beales *et al.*, 1999). Menos frecuentes son los síndromes de Senior Loken –RP asociada a nefronofitosis– o Alport, sordera y nefritis progresiva asociadas a un punteado amarillento alrededor de la mácula, más que con una auténtica RP (Hamel, 2003).

I.3.2. Aspectos clínicos de la RP

El fenotipo de la RP se caracteriza por afectación bilateral, pérdida de visión periférica, predominancia de la disfunción de los bastones y progresión de la degeneración de ambos tipos de fotorreceptores (Kanski, 2003). La clínica de esta patología es variable e incluye síntomas de ceguera nocturna (nictalopía) con elevados umbrales de adaptación a la oscuridad, electroretinografía anormal de las ondas a y b, dificultad en la movilidad secundaria a la constricción del campo visual, pigmentación anormal de la retina, inclusión de espículas óseas en la región medial–periférica de la retina, deficiencia en la visión de la gama de colores del azul al amarillo (tritanopía), disminución de la sensibilidad al contraste, estrechamiento de las arterias, palidez del nervio óptico, predisposición a la miopía, catarata subcapsular posterior y cambios vítreos (Pagon, 1988; Kanski, 2003; Omar *et al.*, 2005; Hartong *et al.*, 2006).

La sintomatología suele comenzar con dificultad en la adaptación a la oscuridad y ceguera nocturna en la adolescencia, y pérdida del campo visual medial-periférico en la edad adulta temprana (Hartong *et al.*, 2006). Así como va progresando la patología se va agravando la pérdida de la visión periférica y los individuos afectados pueden desarrollar la visión en túnel, típica de la RP. Alcanzados los 40 años la constricción de los campos visuales es tan grande y provoca tales dificultades para la visión, que estos individuos son considerados como prácticamente ciegos. Finalmente, en torno a los 60 años de edad, pierden la visión central, con lo cual la capacidad para recibir estímulos visuales se reduce a la mera percepción de luz.

La pérdida progresiva de bastones acarrea importantes consecuencias funcionales, como la ceguera nocturna o la constricción del campo visual, pero por si sola no causa un gran detrimento de la agudeza visual (Ecklund, 2000). Es más, la característica ceguera de los estados avanzados de RP se debe a la degeneración postergada de los conos (Hackam *et al.*, 2004). No se conocen los mecanismos que inducen la muerte de los conos tras la muerte de los bastones, pero es probable que la viabilidad de estas células este mediada por factores de supervivencia (Huang *et al.*, 1993; Lavail *et al.*, 1998; Mohand-Said *et al.*, 1998).

Generalmente, el inicio de la RP se relaciona con la edad a la cual aparece la sintomatología visual. Algunos pacientes experimentan la pérdida de la visión en la infancia, mientras que otros permanecen asintomáticos hasta bien entrada la mediana edad. La diferente valoración que refieren los afectados sobre los mismos síntomas provoca que la edad de comienzo sea considerada una medida muy imprecisa de la severidad de la patología y aporte escasa o nula información acerca del inicio de la degeneración de los fotorreceptores (Hartong *et al.*, 2006). Por lo tanto, el grado de afectación y la velocidad de progresión de la patología serán determinados a través de exámenes clínicos y pruebas que detallen medidas cuantitativas de la función de la retina (electrorretinogramas, amplitud de los campos visuales, etc...). Esta información permitirá al clínico reconocer el estadio de la RP en que se encuentra cada individuo y estimar la prognosis de la patología de forma personalizada. En la patogénesis de la RP se pueden distinguir tres fases (Baumgartner, 2000): estadio 1, fase de inducción caracterizada por el descenso de la amplitud del trazado de los electrorretinogramas, aunque no existen grandes alteraciones del campo visual; estadio 2, pérdida de la visión periférica como resultado de los procesos apoptóticos de los fotorreceptores; y estadio 3, pérdida potencial de los conos (responsables de la visión central) a pesar de no poseer ningún defecto genético.

I.3.3. Hallazgos anatomopatológicos en la RP

A nivel histológico, los cambios más destacables que ocasiona la RP se encuentran en la retina neural –donde se constata la ausencia de bastones y conos– y en el RPE, ausente o desorganizado en algunas áreas (Merin y Auerbach, 1976). Además del adelgazamiento de la retina, causado por la pérdida de fotorreceptores, existe un edema que provoca su engrosamiento. Estas dos alteraciones

morfológicas suelen ir acompañadas de la pérdida de agudeza visual (Sandberg *et al.*, 2005). Sin embargo, no existen evidencias de infiltrados celulares inflamatorios (Voaden, 1991). La capa nuclear externa de la retina se encuentra severamente atenuada en los individuos afectados de RP (Humayun *et al.*, 1999). La capa nuclear interna y la capa de células ganglionares están considerablemente bien conservadas, pero muchas de esas células sufrirán una degeneración en estadios más tardíos de la enfermedad (Hartong *et al.*, 2006).

La forma típica de RP se caracteriza por la degeneración pigmentaria bilateral de la retina, la difuminación de los vasos sanguíneos retinales y palidez del disco óptico (Armstrong y Smith, 1999). La degeneración de la retina conduce a un escotoma anular, que se irá extendiendo periférica y centralmente, hasta dejar un pequeño campo visual central. En las formas atípicas de RP, que a menudo presentan un inicio más tardío, existe menor alteración pigmentaria y mayor variabilidad en los defectos del campo visual, presentando escotomas sectoriales además de los centrales.

De forma más detallada, los cambios histológicos que se producen en las retinas afectadas de RP son los siguientes:

1.- Bastones. La muerte de los bastones comienza en la retina medial-periférica (ecuatorial) y progresa hacia la mácula y la retina más periférica, no afectando a los fotorreceptores más periféricos hasta bien avanzada la patología (Milam *et al.*, 1998). En la periferia medial temporal existen zonas con fotorreceptores no degenerados, además de fotorreceptores que se reestructuran en rosetas (Tulvatana *et al.*, 1999). Estas rosetas están compuestas mayoritariamente por bastones y unos pocos segmentos internos similares a los de los conos, dispuestos radialmente en torno a un lumen central vacío.

2.- Segmentos externos. En todas las formas de RP, el primer cambio histológico que sufren los bastones es el acortamiento de sus segmentos externos. Generalmente, esta alteración afecta antes al segmento externo de los bastones que al de los conos (Armstrong y Smith, 1999). Dicho cambio morfológico, relacionado con la disminución de función de los bastones, indica un deterioro del proceso de renovación del segmento externo (Milam *et al.*, 1998). Tras la modificación del segmento externo se producirá la degeneración del interno y la despigmentación gradual del RPE (Armstrong y Smith, 1999).

3.- Cilio conector. El defecto estructural o funcional del cilio conector causa el descenso del transporte de proteínas desde el segmento interno hacia el externo, resultando en el acortamiento y disfunción del segmento externo (Milam *et al.*, 1998).

4.- Neuritas de los bastones. En aquellas regiones periféricas de las retinas con RP donde los fotorreceptores han empezado a morir se observa que los bastones desarrollan largos procesos semejantes a los axones (Li *et al.*, 1995; Milam *et al.*, 1996). Estas neuritas contienen rodopsina en sus membranas de superficie y se extienden dentro de la retina interna, evitando las dendritas de las células horizontales y bipolares (objetivos normales de los axones de los bastones en la capa plexiforme externa) para asociarse con los procesos hipertrofiados de las células de Müller. En los

conos no parece existir un desarrollo de neuritas tan grande como el que presentan los bastones. No obstante, en las retinas con RP, las células amacrinas y las horizontales también desarrollan neuritas (Fariss *et al.*, 2000). Estos cambios en las neuronas de la retina pueden contribuir a las anomalías electroretinográficas y la progresiva disminución de la visión.

5.- Conos. La muerte de los bastones en las retinas de RP suele provocar cambios en los conos circundantes, tales como el acortamiento del segmento externo, la densificación citoplasmática, la elongación axonal y, por último, la muerte del fotorreceptor (Milam *et al.*, 1998; John *et al.*, 2000). Cuando se produce la muerte de todos los bastones y la mayoría de los conos, la mácula continúa manteniendo una monocapa de somas de conos con segmentos muy cortos o ausentes. Los conos también muestran segmentos externos más cortos en aquellas zonas de la periferia donde los bastones han comenzado a degenerarse.

6.- Espacio interfotorreceptor. Tras la muerte de los fotorreceptores, el espacio interfotorreceptor desaparece debido a la migración de las células del RPE hacia la retina interna y la extensión de los hipertrofiados procesos de las células de Müller hacia la región de la membrana de Bruch (Milam *et al.*, 1998). Durante los primeros estadios de la RP, el volumen del espacio interfotorreceptor disminuye a medida que los segmentos externos de los fotorreceptores van acortándose. La muerte de los bastones también puede provocar cambios en la composición de la matriz interfotorreceptora, los cuales pueden estar asociados con la degeneración de los conos.

7.- RPE, membrana de Bruch y coriocapilares. Después de la muerte de todos los fotorreceptores, las células del RPE se separan de la membrana de Bruch y migran hacia las regiones perivasculares de la retina interna, empleando a las fibras de Müller como soporte para su expansión. (Merin y Auerbach, 1976; Milam *et al.*, 1998). Los pigmentos liberados del RPE serán fagocitados por macrófagos, los cuales también migrarán hacia las capas internas de la retina (Armstrong y Smith, 1999). Los macrófagos y las células del RPE liberarán sus pigmentos en las zonas próximas a los vasos sanguíneos, originando la característica apariencia de espículas óseas típica de la RP. La migración de las células del RPE hacia la retina interna provoca notables alteraciones en los vasos sanguíneos de la retina (Milam *et al.*, 1998). El depósito de matriz extracelular entre las células del RPE y las células endoteliales de la delgada pared de las vénulas y capilares puede llegar a ocluir la luz de los vasos. El engrosamiento de las paredes de los vasos y la oclusión de su luz se correlacionan con la esclerosis y la atrofia de la vasculatura retinal, particulares características fundoscópicas de la RP. Los gruesos depósitos perivasculares pueden comprometer el flujo de nutrientes desde el vaso sanguíneo hasta las neuronas de la retina interna (Milam *et al.*, 1998) y provocar un creciente deterioro de la oxigenación retinal que conduzca a la muerte de los fotorreceptores (Baumgartner, 2000). Otra alteración importante de los vasos retinales inducida por la RP es la fenestración de las células del endotelio vascular próximas a las células del RPE, permitiendo el filtrado de proteínas séricas hacia los espacios perivasculares (Milam *et al.*, 1998).

Mediante autofluorescencia de *fundus* se han obtenido imágenes que muestran elevadas concentraciones de lipofuscina en el RPE de algunos individuos con RP. Las regiones de la retina con mayor autofluorescencia presentan amplitudes electroretinográficas bajas y reducida sensibilidad escotópica (Robson *et al.*, 2003; Robson *et al.*, 2004; Robson *et al.*, 2006).

8.- Células de Müller. Las células de Müller sufrirán una gliosis reactiva que causa la hipertrofia celular y la migración de sus agrandados núcleos desde la capa nuclear interna hasta la retina externa (Milam *et al.*, 1998). En estadios avanzados de la RP, los fotorreceptores degenerados son reemplazados por una capa de engrosados procesos de las células de Müller. La pérdida de la capa de fotorreceptores genera la desaparición de la membrana limitante externa constituida por las uniones de la *zonulae adherentes* entre los fotorreceptores y los procesos de las células de Müller. En las áreas de formación de espículas óseas, los procesos de las células de Müller de la retina interna están unidos mediante uniones de la *zonulae adherentes* y forman microvilli en las zonas de contacto con las células del RPE.

9.- Capa nuclear interna (INL). A pesar de la significativa pérdida de fotorreceptores, las retinas con RP severa muestran la retención del ~78% de las células de la INL (Milam *et al.*, 1998). De este dato se infiere que la pérdida de fotorreceptores no ocasiona una gran degeneración de la INL. Sin embargo, esta interpretación puede ser errónea, puesto que además de los diferentes tipos de neuronas (horizontales, bipolares y células amacrinas) la INL también contiene los somas y núcleos de las células de Müller. La hiperplasia reactiva que sufren las células de Müller con la RP causa que el incrementado número de núcleos de células de Müller compensen la pérdida de neuronas de la INL.

10.- Capa de células ganglionares. La atrofia de los vasos sanguíneos de la retina, junto con la palidez del disco óptico, sugieren que la RP puede causar la pérdida de células ganglionares (Milam *et al.*, 1998). Probablemente, la muerte de las células ganglionares se deba al descenso de flujo sanguíneo generado por las alteraciones inducidas por las células del RPE sobre los vasos sanguíneos de la retina. En general, la pérdida de células ganglionares es paralela a la pérdida de fotorreceptores.

11.- Nervio óptico. Otra de las características funduscópicas de la RP es la palidez del disco óptico. El grado de palidez puede estar en relación con el grado de degeneración de la capa de células ganglionares (Armstrong y Smith, 1999). Además, en los individuos afectados de RP, también se puede apreciar cierto grado de adelgazamiento de la capa de fibras nerviosas de la retina en la región peripapilar (Walia *et al.*, 2007).

I.3.4. Mecanismo de muerte celular en la RP

La degeneración de los fotorreceptores causada por la RP suele concluir con la muerte de estas células. El análisis de la fragmentación del DNA y la ausencia de respuesta inflamatoria indican que en humanos con RP (Milam *et al.*, 1998) y en modelos murinos de RP (Chang *et al.*, 1993; Portera-Cailliau *et al.*, 1994; Lolley *et al.*, 1994) la muerte de los fotorreceptores se produce por apoptosis

(Rattner *et al.*, 1999). Por otro lado, la apoptosis también ha sido destacada por su relevante función en el desarrollo del ojo humano, participando en la morfogénesis de la cúpula y el pedículo óptico, en la diferenciación de la retina neural y la morfogénesis del cristalino (Bozanic *et al.*, 2003). Este mecanismo de muerte celular origina la condensación y encogimiento del núcleo y el citoplasma celular, sin pérdida de integridad de la membrana plasmática, seguido de la completa fragmentación de la célula y la consiguiente fagocitosis de los desechos por las células vecinas (Baumgartner, 2000).

En retinas humanas con RP existe una desigual pérdida de bastones y conos (Cideciyan *et al.*, 1998). Los fotorreceptores degenerados inducen la muerte celular de los adyacentes, motivo por el cual se produce la pérdida de conos en aquellos individuos que portan defectos en genes específicos de los bastones (Huang *et al.*, 1993; Wong, 1997; Kedzierski *et al.*, 1998; John *et al.*, 2000). La muerte de los conos puede ser desencadenada por productos tóxicos resultantes de la degeneración de los bastones o por la ausencia de factores tróficos para los conos sintetizados por los bastones (Milam *et al.*, 1998). Dentro de este grupo de personas, la progresiva pérdida de la visión mediada por los conos posee un mayor impacto en la calidad de vida que la producida por la ausencia de los bastones (Rattner *et al.*, 1999).

I.4. Genes responsables de la RP

En la etapa previa al desarrollo de la tecnología del DNA recombinante, la investigación de las patologías oculares estaba limitada a la descripción y clasificación de fenotipos según la morfología, la bioquímica y la fisiología (Bok, 2007). La extraordinaria contribución de la genética molecular ha permitido reconocer numerosas mutaciones en distintos genes, proporcionando una valiosa información sobre los procesos que desencadenan este tipo de patologías. La veda para la identificación de genes responsables de RP se abrió en 1989, al localizar el primer locus de adRP (RP1) en el brazo largo del cromosoma 3 y señalar a la rodopsina como potencial gen candidato (McWilliam *et al.*, 1989; Farrar *et al.*, 1990). El análisis de este gen reveló que sus mutaciones estaban directamente relacionadas con la instauración de la RP (Dryja *et al.*, 1991; Sung *et al.*, 1991). El hallazgo de otros pedigríes de adRP en los que no existía cosegregación con las formas mutadas de la rodopsina, señaló la gran heterogeneidad genética de esta patología (McWilliam *et al.*, 1989; Farrar *et al.*, 1990; Kumar-Singh *et al.*, 1993; Humphries *et al.*, 1993; Farrar *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005a). Desde 1989, han sido identificados 36 genes y 10 loci implicados en RP (<http://www.sph.uth.tmc.edu/retnet/sum-dis.htm#A-genes>), pero se estima que todavía quedan otros tantos por identificar. Actualmente, los genes RP conocidos explican de un 40 a un 54% de los casos de adRP, de un 61 a un 89% de los de XIRP y menos del 33% de los de arRP; sin tener en cuenta a los esporádicos, que representan un 45% de todos los casos de RP (Hamel, 2003).

A medida que se iban identificando los genes responsables de RP y se iba conociendo su función, varios autores han ido clasificándolos según el proceso celular que resulta alterado por la mutación de estos genes (van Soest S. *et al.*, 1999; Phelan y Bok, 2000; Bessant *et al.*, 2001; Hims *et al.*, 2003; Kennan *et al.*, 2005; Hartong *et al.*, 2006). Las diferentes categorías hacen referencia a procesos tan importantes para el fotorreceptor como la cascada de fototransducción, el metabolismo del retinol, el mantenimiento de la estructura, la transcripción, las interacciones celulares, el procesado de mRNA y el transporte intracelular.

A continuación se detallan los procesos celulares y los genes responsables de RP contenidos en cada una de estas clases funcionales:

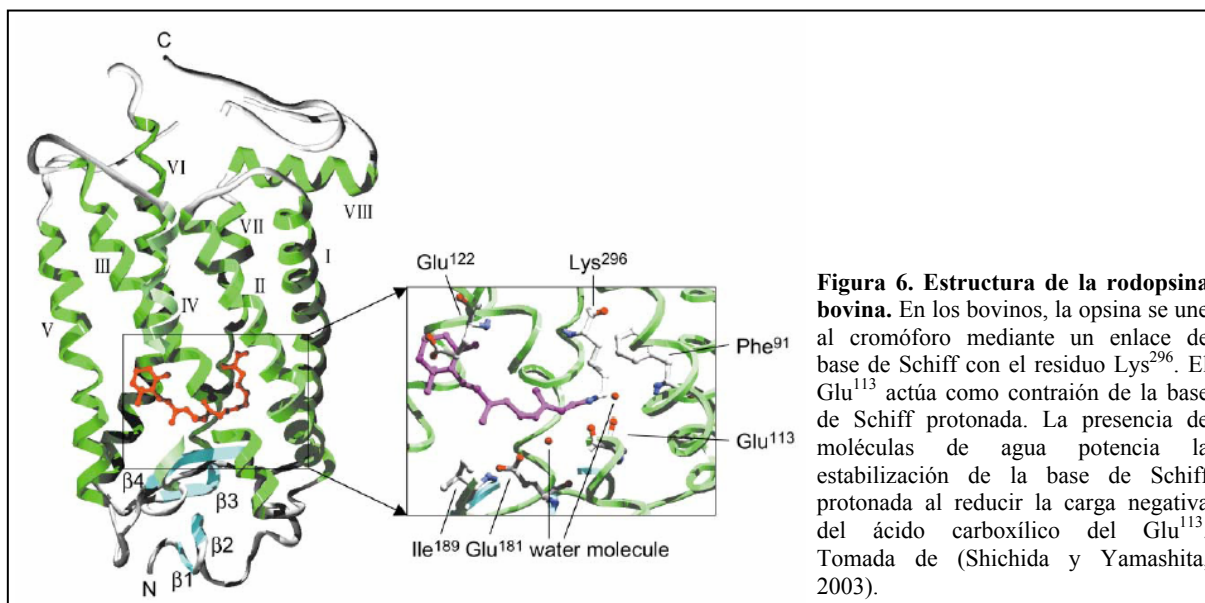
I.4.1. Fototransducción

La habilidad exhibida por los vertebrados para captar gran parte del espectro de luz visible es debida a un grupo de moléculas fotosensibles denominadas pigmentos visuales. Localizados tanto en conos como en bastones, los pigmentos visuales son receptores acoplados a proteína G (GPCRs) en los cuales una apoproteína –la opsina– está covalentemente unida a un cromóforo: el 11-*cis* retinal (aldehído de la vitamina A1) o el 11-*cis*-3,4-dehidroretinal (aldehído de la vitamina A2), encontrado en ciertas lampreas, peces óseos, anfibios y reptiles (Yokoyama y Yokoyama, 1989; Yokoyama y Yokoyama, 1996; Rattner *et al.*, 1999; Spudich *et al.*, 2000; Yokoyama, 2000; Pepe, 2001; Yokoyama, 2002; Yokoyama y Takenaka, 2005).

Las opsinas poseen siete segmentos α -hélice –unidos por tres *loops* citoplasmáticos y otros tres extracelulares– que atraviesan la membrana de los discos de los segmentos externos, dejando el extremo amino-terminal (N-terminal) hacia la cara interna y el carboxi-terminal (C-terminal) hacia la externa (Yokoyama y Yokoyama, 1996). La disposición espacial de estos segmentos transmembrana origina una oquedad que aloja al grupo prostético retinal (Figura 6), que se unirá a la opsina mediante un enlace en base de Schiff con el grupo ϵ -amino de un residuo de lisina situado en el centro del séptimo segmento (Spudich *et al.*, 2000).

La interacción entre el cromóforo y la opsina determina la longitud de onda específica para la cual se produce la máxima absorción (λ_{\max}) y por lo tanto, la sensibilidad del pigmento visual al espectro de luz visible (Lythgoe y Partridge, 1989; Yokoyama y Yokoyama, 1996; Yokoyama, 2000; Yokoyama, 2002). En humanos pueden encontrarse tres de las cinco clases de opsinas conocidas: las opsinas de los pigmentos sensibles al rojo (λ_{\max} de 558 nm) y al verde (λ_{\max} de 531 nm) o LWS (*Long Wavelength-Sensitive*), consideradas una única clase al presentar una homología del 96%; la opsina del pigmento sensible al azul (λ_{\max} de 419 nm) o SWS1 (*Short Wavelength-Sensitive*); y la rodopsina (λ_{\max} de 496 nm) o RH1, el único pigmento visual de los bastones (Hisatomi y Tokunaga, 2002). Las otras dos clases de opsinas, RH2 y SWS2, se encuentran en pollo y teleósteos. La utilización de estos cuatro

pigmentos visuales permite discriminar los diversos colores y tonos que están en el rango de 400 a 700 nm (Yokoyama y Yokoyama, 1996).



Mediante un proceso denominado fototransducción (Figura 7), los conos y los bastones traducen la energía luminosa (fotones) captada por los pigmentos visuales en actividad neuronal eléctrica, que será procesada por las neuronas de mayor orden de las áreas cerebrales especializadas en la visión para la obtención de imágenes. La fototransducción tiene lugar en el segmento externo del fotorreceptor, un compartimento especializado que alberga altas concentraciones de pigmentos visuales y de proteínas directamente implicadas en la transducción de señales. En los bastones, la rodopsina se localiza en la membrana de los discos con una densidad de ~ 25000 moléculas por μm^{-2} , lo que representa $\sim 10^8$ moléculas de rodopsina en cada segmento externo (Lamb y Pugh, 2006). La transducina –presente en una relación 1:10 con respecto a la rodopsina– es una proteína G heterotrimérica de unión a Guanosina 5'-trifosfato (GTP) que actúa como mediador de la activación entre la rodopsina y la fosfodiesterasa de Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP). Una vez activada, la fosfodiesterasa de cGMP (relación 1:100 con respecto a la rodopsina) hidroliza el cGMP a 5'-GMP causando el cierre de los canales regulados por cGMP y la interrupción de la entrada de Na^+ y Ca^{2+} a través de los mismos. La entrada de Na^+ y Ca^{2+} a través de los canales regulados por cGMP crea la denominada “corriente de oscuridad” que mantiene a la membrana relativamente despolarizada (Pepe, 2001). El cierre de los canales interrumpirá la corriente de oscuridad causando una hiperpolarización de la membrana y la generación de una señal eléctrica que se transmitirá hacia el terminal sináptico. Dicho terminal recogerá la señal eléctrica generada por el segmento externo del fotorreceptor y la transmitirá a neuronas de mayor orden situadas justo por debajo de él. Desde ahí, la señal irá pasando de neurona a neurona hasta llegar a las áreas cerebrales especializadas en la visión.

Debido a que la rodopsina está integrada en la membrana de los discos y que tanto la transducina como la fosfodiesterasa (PDE) están unidas a ella mediante grupos acilo, la única forma que tienen estas proteínas de entrar en contacto es movilizarse por la membrana mediante difusión lateral (Lamb y Pugh, 2006). Así, cuando una rodopsina activada (R^*) establece contacto con una transducina, se libera la molécula de GDP unida a la subunidad α y se une una molécula de GTP del citoplasma, quedando activada la subunidad α . Tras la activación, la R^* se disocia de la transducina, pudiendo activar a otras transducinas (la tasa de activación de una molécula de R^* en bastones de mamíferos a temperatura corporal es de ~ 400 moléculas de transducina s^{-1}). Gracias a la cascada de señalización que emplea cGMP como mensajero citoplasmático se consigue una amplificación de la respuesta a cada fotón del orden de 10^5 ; 10^2 de la primera fase, la activación de cientos de transducinas por cada molécula de rodopsina activada; y 10^3 de la segunda fase, la hidrólisis de ~ 1000 moléculas de cGMP s^{-1} por cada PDE activada (Pepe, 2001).

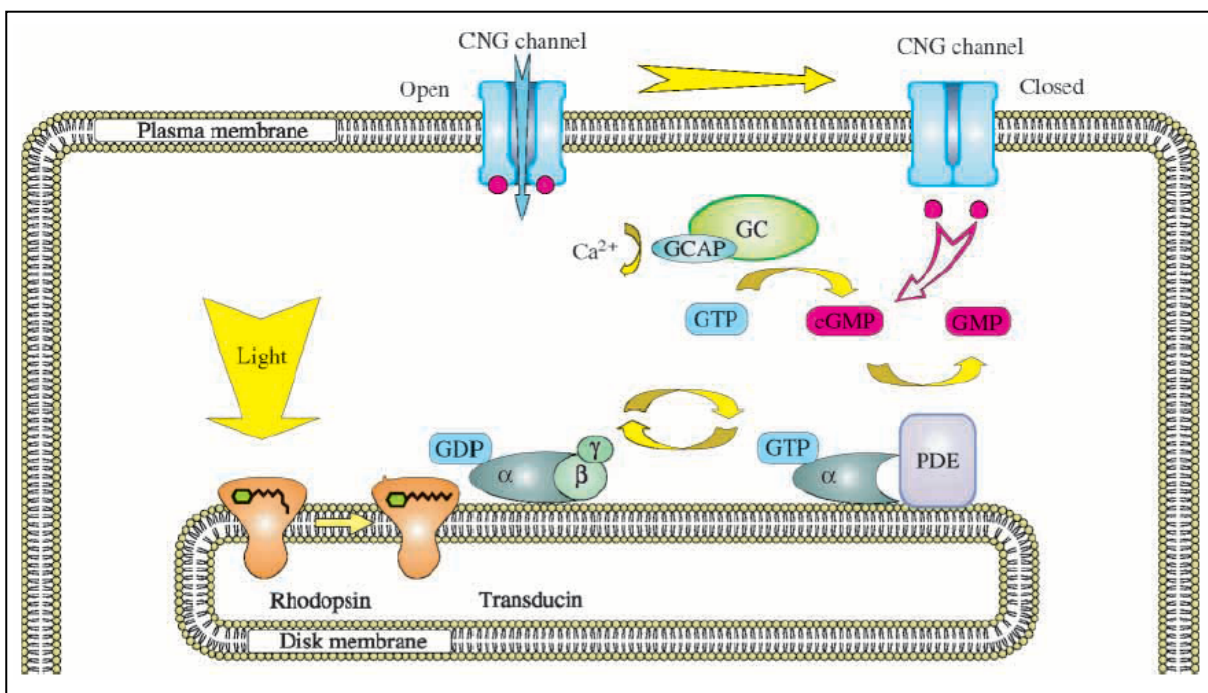


Figura 7. La cascada de fototransducción. La luz causa la fotoisomerización de la rodopsina, activando la proteína G heterotrimérica transducina. La subunidad α de la transducina unida a GTP activa a la fosfodiesterasa (PDE), la cual degrada cGMP a GMP. El descenso de la concentración de cGMP conduce al cierre de los canales regulados por cGMP (CNG), causando la disminución del flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula y la hiperpolarización del potencial de membrana. Bajas concentraciones intracelulares de Ca^{2+} desinhiben las proteínas activadoras de la guanilato ciclasa (GCAP), provocando la activación de la guanilato ciclasa (GC) y la síntesis de cGMP. Tomada de (Kramer y Molokanova, 2001).

A lo largo del proceso de fototransducción se irán sucediendo fases de activación e inactivación de las moléculas implicadas en la cascada de señalización. La importancia de la activación de estos componentes resulta evidente, pero el proceso de inactivación tampoco carece de relevancia. La inactivación de todas las moléculas activadas durante el proceso de fototransducción resulta ser un proceso fundamental, bien para terminar con una estimulación que de no tener límite

acabaría degenerando el receptor, bien para la correcta recuperación del estado basal del fotorreceptor y su predisposición para un nuevo proceso de fototransducción. Es por esto por lo que en el estudio del proceso de fototransducción en los fotorreceptores hay que distinguir dos fases de elevada trascendencia: la fase de activación y la fase de inactivación.

I.4.1.1. Fase de activación de la fototransducción

Inmediatamente después de que el pigmento visual (rodopsina en los bastones y conopsina en los conos) absorba un fotón, tendrá lugar una serie de eventos encaminados a transmitir la señal captada por los fotorreceptores. En vertebrados, las etapas más destacadas de la fase de activación de la fototransducción son la fotoisomerización, la activación de la transducina, la activación de la fosfodiesterasa y el cierre de los canales asociados a cGMP.

I.4.1.1.1. Fotoisomerización: activación de la rodopsina

El primer acontecimiento que se aprecia en la rodopsina tras la captación de un fotón es la isomerización *cis-trans* del 11-*cis* retinal a todo-*trans* retinal (Figura 8). En ese momento, desaparece la protección contra la interacción de la rodopsina inactivada y la subunidad α de la transducina o la rodopsín kinasa. Dicha protección está determinada por los cambios generados en los dominios α -hélice transmembrana y/o la superficie citoplasmática de la rodopsina tras la unión del 11-*cis* retinal a la lisina mediante el enlace en base de Schiff. La isomerización del 11-*cis* retinal da lugar a nuevos reordenamientos estructurales en la rodopsina, entre los que se incluye el desplazamiento de la base de Schiff cargada positivamente de su interacción con el residuo aminoacídico cargado negativamente (Glu). Todas estas alteraciones estructurales conducen a la aparición de un intermediario primario a los 40 picosegundos, la fotorodopsina (λ_{\max} ~558 nm). A partir de ella se derivan los consiguientes intermediarios con espectros de absorción característicos: bathorodopsina (a los 40 nanosegundos; λ_{\max} ~543 nm), lumirodopsina (a los 16 microsegundos; λ_{\max} ~497 nm), metarodopsina I (a 1 milisegundo; λ_{\max} ~478 nm) y metarodopsina II (a los 10 milisegundos; λ_{\max} ~380 nm). En el estado de metarodopsina I la base de Schiff permanece protonada, mientras que en el de metarodopsina II la base de Schiff se desprotona, hecho que explicaría el cambio de espectro de absorción hacia el ultravioleta. Como resultado de este rapidísimo proceso de transformación, que causa un descenso de la absorbancia máxima, el pigmento visual pierde su color “destiñéndose” en respuesta a la absorción de luz (Buczylko *et al.*, 1996; Pepe, 2001; Lamb y Pugh, 2004; Lamb y Pugh, 2006).

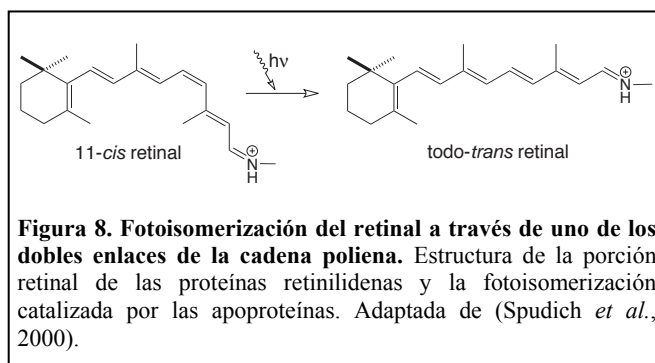
Al igual que sucede con la rodopsina, cuando una conopsina es alcanzada por un fotón también sufre diversos cambios que generan estadios intermediarios. La Metarodopsina II no fosforilada (R*) de ambos pigmentos visuales posee la capacidad de activar una proteína G específica (transducina) al formar un complejo con ella y catalizar la reacción de cambio de GDP a GTP. Sin

embargo, las ratios de formación y degradación de la Metarodopsina II derivada de la conopsina son 20 veces superiores a las de la derivada de la rodopsina. Esto sugiere que la conopsina comienza a activar proteína G inmediatamente después de la fotorrecepción, mientras que la rodopsina

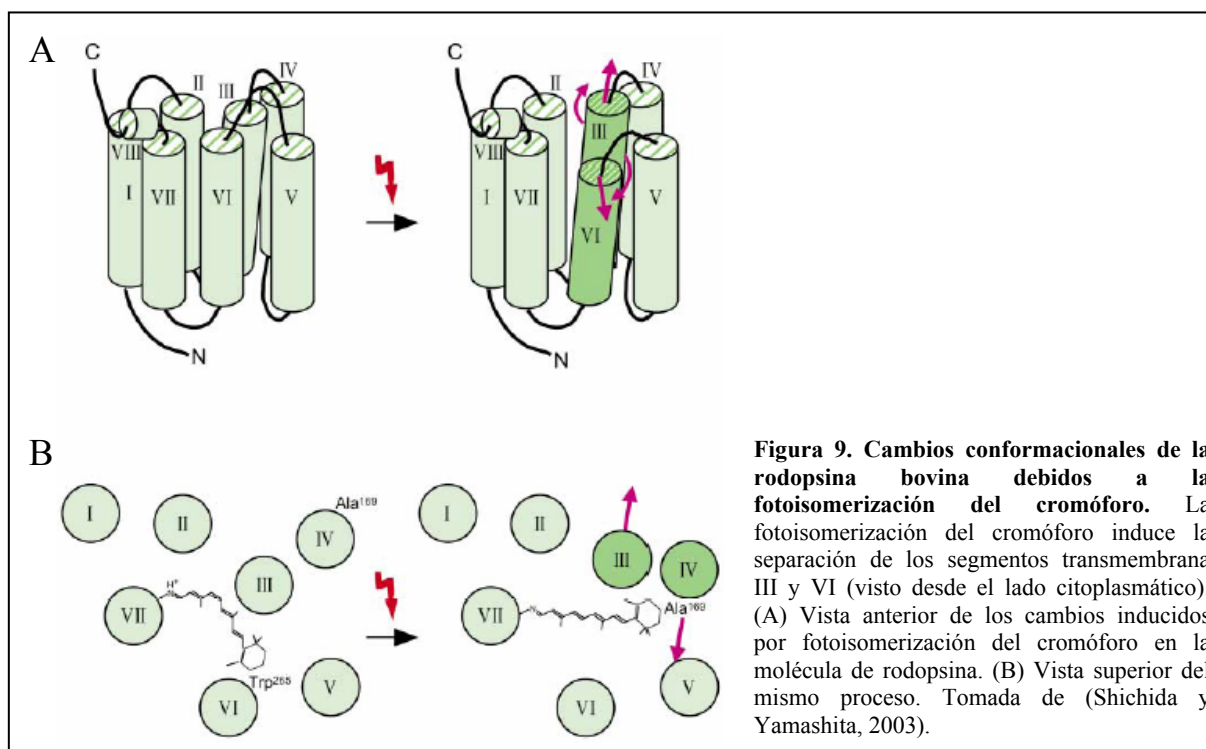
lo hace cuando la Metarodopsina II alcanza su vida media. De hecho, los conos presentan una mayor fotorrespuesta que los bastones, aunque estos últimos son mucho más sensibles a la luz (Shichida y Yamashita, 2003).

Los pigmentos visuales pertenecen a un grupo de proteínas transmembrana denominado receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Los GPCRs interactúan con la región C-terminal de la proteína G, una proteína periférica, a través de los *loops* citoplasmáticos de los dominios transmembrana de la apoproteína. Sin embargo, como el sitio de unión de la proteína G se encuentra cerca de la región de *loops* extracelulares, los segmentos transmembrana deberán sufrir varios reordenamientos para lograr desplazar dichos sitios de interacción hacia los dominios citoplasmáticos. La rotación y translación de los extremos citoplasmáticos de los segmentos α -hélice III y VI de la rodopsina bovina propagan los cambios conformacionales a través de la membrana hacia los *loops* citoplasmáticos (Figura 9). La rodopsina bovina interactúa con la transducina a través del segundo (III-IV), tercero (V-VI) y cuarto *loop* citoplasmáticos, mientras que el extremo C-terminal de la subunidad α de la transducina resulta ser uno de los sitios de interacción con la rodopsina. Tras la fotoisomerización del cromóforo y el consiguiente reordenamiento de los segmentos transmembrana III y IV, el tercer *loop* citoplasmático de la rodopsina queda expuesto para establecer una interacción con la región C-terminal de la subunidad α de la transducina. Esta interacción es uno de los mecanismos que garantizan el acoplamiento específico entre la rodopsina bovina y la transducina. (Spudich *et al.*, 2000; Shichida y Yamashita, 2003).

Muchos GPCRs –entre los que se encuentran varios receptores visuales y hormonales– necesitan formar hetero u homoligómeros para poder desarrollar sus funciones. Existen evidencias que indican que la rodopsina se organiza en dímeros (Fotiadis *et al.*, 2003; Fotiadis *et al.*, 2004) que a su vez se reorganizan en estructuras oligoméricas de mayor orden, agrupando de 10 a 30 dímeros (Liang *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha comprobado que la rodopsina monomérica es completamente funcional, por lo que es considerada como la unidad funcional mínima responsable de la activación de la proteína G. Esto sugiere que la oligomerización de los GPCRs no es un proceso esencial para la activación de la proteína G, aunque podría contribuir de forma importante en procesos específicos del fotorreceptor tales como el ajuste de la respuesta a la luz, la estabilización y la desensibilización (Whorton *et al.*, 2008). La organización de la rodopsina en oligómeros no facilitaría su difusión



lateral, lo cual entorpecería el contacto con la transducina y retrasaría la fotorrespuesta. La carencia de movilidad de los oligómeros de rodopsina estaría compensada con la elevada constante de difusión de la transducina y su presencia en alta concentración en los fotorreceptores, garantizando un tiempo de respuesta adecuado para cada estímulo visual (Liang *et al.*, 2003).



I.4.1.1.2. Activación de la transducina

Las proteínas G heterotriméricas son los mediadores moleculares que relacionan a los GPCRs con sus respectivas proteínas efectoras (enzimas o canales iónicos) constituyendo la segunda de las tres etapas de la cascada de señalización (Arshavsky *et al.*, 2002). La primera etapa consiste en la activación de los GPCRs mediante la unión de una molécula agonista. En los pigmentos visuales el 11-*cis* retinal actúa como un potente antagonista, pero tras su isomerización a todo-*trans* retinal, se comporta como un agonista y activa los GPCRs. En la segunda etapa, los GPCRs activados activan a múltiples moléculas de proteína G, catalizando el intercambio de Guanosina 5'-trifosfato (GTP) a Guanosina difosfato (GDP) en la proteína G. Y en la tercera etapa de la cascada de señalización, la proteína G activada se une a su efector, el cual ejercerá una acción potenciadora o inhibidora sobre determinados procesos.

La proteína G transducina es un heterotrímero constituido por una subunidad α , una β y una γ . En la oscuridad, el heterotrímero se encuentra fuertemente asociado a la membrana del disco a través de dos modificaciones lipídicas: un grupo acilo en el extremo N-terminal de la subunidad α (miristoilación) y un grupo farnesilo en el extremo C-terminal de la subunidad γ (isoprenilación)

(Lobanova *et al.*, 2007). La transducina de los bastones muestra sutiles diferencias con respecto a la de los conos. La subunidad α de la transducina humana presenta dos isoformas: Gt1 α o Gtr α en los bastones y Gt2 α o Gtc α en los tres tipos de conos (Hisatomi y Tokunaga, 2002). La Metarodopsina II (R*) activa a la transducina al inducir el cambio de GDP por GTP en la subunidad α (G α_t). Una simple R* es capaz de activar varias moléculas de transducina durante el tiempo que permanece activada (en bovinos, un promedio de 220 moléculas s⁻¹). Tras su activación, la transducina se libera de la R* y se produce la disociación de la G α_t -GTP activada (G*) y el G $\beta\gamma_t$. Inmediatamente después, la G* activa a su enzima efector, la fosfodiesterasa de cGMP, cuya función consiste en hidrolizar el cGMP a 5'-GMP (tasa de recambio >4000 s⁻¹).

La disociación del heterotrímero causa que las subunidades G* y G $\beta\gamma$ queden unidas a la membrana de los discos por una única modificación lipídica. En este momento, la afinidad que presentan las subunidades G* y G $\beta\gamma$ disociadas por la membrana de los discos, es inferior a la que poseen cuando están formando el heterotrímero. Esta disminución de afinidad facilita la liberación de las subunidades G* y G $\beta\gamma$ de la membrana y su posterior difusión por el citoplasma (Lobanova *et al.*, 2007). La alta tasa de hidrólisis de GTP que presenta la G* facilita la rápida reconstitución del heterotrímero, por lo que las subunidades de la transducina no permanecen separadas durante mucho tiempo. La unión de la proteína fosducina con la G $\beta\gamma$ retrasa la regeneración del heterotrímero al prevenir su asociación con la G*, aún después de que la hidrólisis de GTP haya tenido lugar (Figura 10). Además, la fosducina potencia la movilidad de la G $\beta\gamma$ volviéndola más soluble al enmascarar su grupo farnesilo y reducir las interacciones electrostáticas con los fosfolípidos de membrana cargados negativamente (Calvert *et al.*, 2006). Ante la

presencia de luz, la fosducina sufre una defosforilación en los segmentos externos que la habilita para poder unirse a la G $\beta\gamma$. Por el contrario, su fosforilación en la oscuridad por una proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) liberaría a la G $\beta\gamma$ restaurando la sensibilidad a la luz que presentan los fotorreceptores. Aparte de las funciones anteriormente mencionadas, la fosducina está implicada en la protección contra la proteólisis de la G $\beta\gamma$ por la vía ubiquitín-proteosoma, en la regulación de la transcripción o en la regulación de la actividad de otras proteínas G distintas a la transducina (Sokolov *et al.*, 2004).

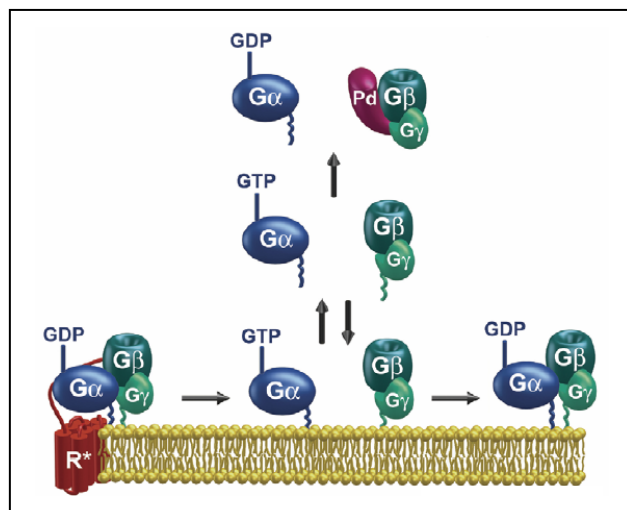
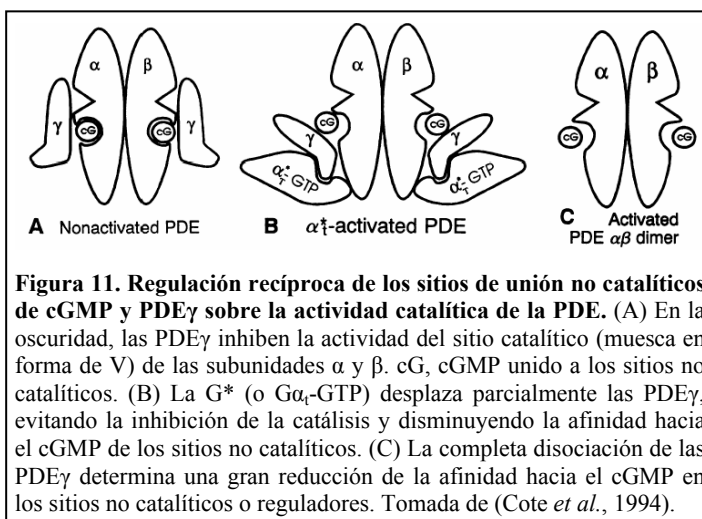


Figura 10. Disociación de las subunidades de la transducina e importancia de la fosducina. La activación de la transducina por una R* induce la disociación de sus subunidades. En ese estado, las subunidades pueden escaparse de la membrana de los discos. La unión de la fosducina con la G $\beta\gamma$ previene la rápida reconstitución del heterotrímero y potencia la movilidad de las subunidades de la transducina por el citoplasma. Tomada de (Calvert *et al.*, 2006).

I.4.1.1.3. Activación de la fosfodiesterasa

La fosfodiesterasa de cGMP (PDE; o también conocida como PDE6) es un heterotetrámero constituido por dos subunidades catalíticas similares o idénticas (α y β en bastones; α y α en conos) y dos subunidades reguladoras γ idénticas (PDE γ) (Cote *et al.*, 1994; Arshavsky *et al.*, 2002). Las subunidades α y β contienen un sitio catalítico y dos sitios de unión no catalíticos para cGMP (Cote *et al.*, 1994). Por su parte, las subunidades PDE γ inhiben la actividad de la PDE, manteniéndola en niveles muy bajos en los estadios de no activación. La unión de una G* a una subunidad PDE γ descarta el efecto inhibitorio que esta última ejerce sobre el sitio catalítico de las subunidades α o β , produciéndose la activación de la PDE. El mecanismo de activación de la PDE por la G* depende del estado de ocupación de los sitios no catalíticos de las subunidades α y β . Cuando estos sitios están ocupados, la G* forma un complejo con el holoenzima $\alpha\beta\gamma_2$ provocando el desplazamiento de las PDE γ de sus sitios de inhibición. Esto permite que el dímero $\alpha\beta$ comience a ejecutar su actividad catalítica, a pesar de no haberse producido la total disociación de las PDE γ . En ese momento, la afinidad de los sitios no catalíticos del dímero $\alpha\beta$ hacia el cGMP disminuye levemente, causando la disociación parcial de la molécula de cGMP. La activación de la PDE causa la total separación de las PDE γ del dímero $\alpha\beta$, originando una enorme reducción de la afinidad de los sitios no catalíticos hacia el cGMP que conlleva a la rápida y completa disociación del cGMP. Sin embargo, el dímero $\alpha\beta$ posee la misma actividad catalítica que el estado anterior (Figura 11).



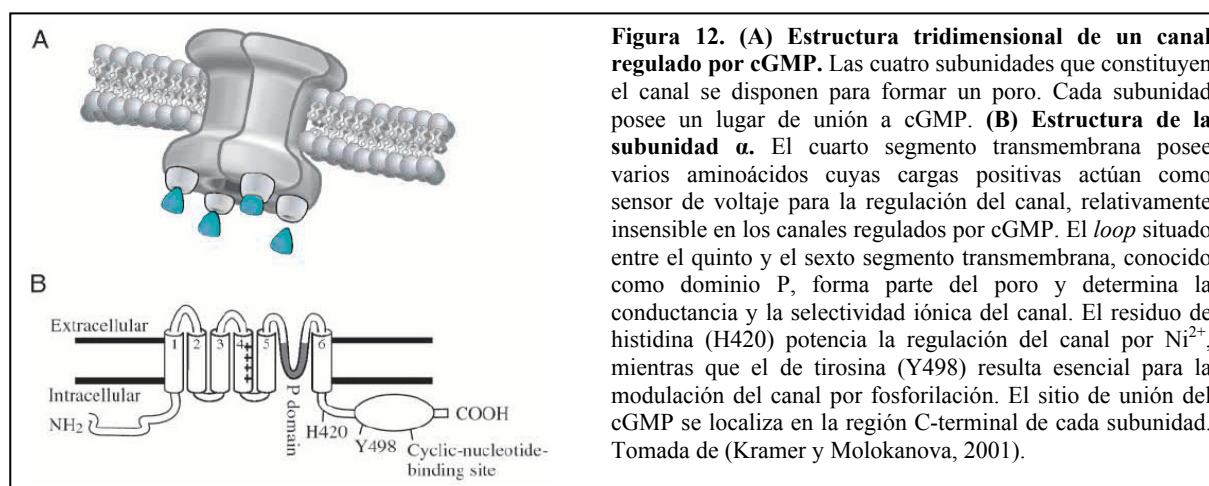
Según las simulaciones efectuadas por Reingruber *et al.*, utilizando datos obtenidos en conos de carpa, se estima que la cascada de señalización originada por un solo fotopigmento excitado de los conos no podría activar a más de 10 moléculas de PDE (Reingruber y Holcman, 2008). Según esta cifra, los conos precisan absorber un elevado número de fotones de forma casi sincrónica para lograr activar una cantidad mínima de moléculas de PDE; las suficientes para generar una señal que supere a la establecida como ruido de fondo por la activación espontánea de la PDE.

I.4.1.1.4. Cierre de los canales asociados a cGMP

La reducción de la concentración citoplasmática de cGMP causada tras la activación de la PDE6, provoca el cierre de los canales catiónicos regulados por cGMP (CNG; *Cyclic Nucleotide-*

Gated channel) de la membrana plasmática (Arshavsky *et al.*, 2002). La clausura de los CNGs ocasiona la reducción de la corriente interna –sostenida en la oscuridad por los iones de Na^+ y Ca^{2+} –, causando la hiperpolarización de la membrana y un descenso de la liberación del transmisor sináptico (glutamato) en el terminal del fotorreceptor. Los CNGs de los bastones de bovinos forman un tetrámero constituido por dos subunidades α , con una masa molecular de 63 kDa cada una, y dos subunidades β , con 240 kDa cada una (Cook *et al.*, 1987; Pittler *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1994; Higgins *et al.*, 2002), aunque también es posible encontrar una estequiometría $3\alpha:1\beta$ (Zhong *et al.*, 2002). La subunidad α (o CNG1) forma un canal sensible a cGMP, mientras que la β tercia la modulación entre el Ca^{2+} y la Calmodulina (CAM) (Figura 12).

Los canales de los conos de los bovinos presentan otro tipo de subunidad α , la CNG3, y al contrario de lo que ocurre en los de los bastones, no están modulados por Ca^{2+} -Calmodulina (Hisatomi y Tokunaga, 2002). Sin embargo, la elevada permeabilidad que presentan los canales de los conos frente al Ca^{2+} , permite variaciones (inducidas por la luz) en la concentración plasmática de este ión más rápidas y con mayor duración que en los bastones.



Las proteínas que constituyen los CNGs son miembros de la superfamilia de proteínas de canales iónicos regulados por voltaje, y dentro de esta superfamilia, presentan una alta homología con los canales de K^+ (Kramer y Molokanova, 2001). Cada subunidad del CNG posee un extremo N-terminal citoplasmático, seis segmentos transmembrana y un extremo C-terminal también citoplasmático. Además de muchas estructuras similares a las de la subunidad α , la subunidad β contiene un sitio de unión a Calmodulina y una extensión del extremo N-terminal denominada parte GARP (*Glutamic Acid-Rich Protein*), pero no posee residuo de glutamato de la región del poro, ni sitio de glicosilación ligado a asparragina (Molday, 1998). Las dos subunidades α y las dos subunidades β se ensamblan en un complejo tetramérico en el cual las subunidades idénticas suelen situarse una enfrente de la otra, aunque es muy posible que *in vivo* también se puedan encontrar adyacentes. Las regiones del poro que unen a los segmentos S5 y S6 cerca de la superficie extracelular

de la membrana, se extienden hacia el centro de la cavidad, en donde pueden funcionar como filtro selectivo de iones. El residuo de glutamato en la región del poro de la subunidad α es responsable del bloqueo externo de cationes divalentes que muestra el canal.

La respuesta de los CNGs ante la variación de la concentración plasmática de cGMP es modulada por varios sistemas intracelulares, alterando la sensibilidad de los canales hacia el cGMP (Kramer y Molokanova, 2001). Los CNGs poseen dominios específicos que actúan como receptores para cada una de estas señales intracelulares: Ca^{2+} -Calmodulina, óxido nítrico, metales de transición, metabolitos fosfolipídicos, cambios en el estado de fosforilación e interacciones con proteínas de membrana, como las proteínas tirosín kinasas. La Ca^{2+} -Calmodulina se une a la subunidad β de los canales de los bastones alterando la interacción entre los extremos N y C-terminal de las subunidades, lo que provoca una reducción de la sensibilidad del canal hacia el cGMP. El objetivo principal del óxido nítrico es la guanilato ciclasa, la cual activa los canales mediante la síntesis de cGMP. Los metales de transición, como el Ni^{2+} y el Zn^{2+} , en concentraciones suficientemente altas, pueden inducir un bloqueo dependiente de voltaje al unirse a sitios de la vía de permeabilización del canal. Los metabolitos fosfolipídicos, como el diacilglicerol (DAG), alteran la apertura del canal al unirse a las regiones hidrofóbicas de las proteínas del canal y/o deformar la bicapa de las zonas próximas a los canales. Las proteínas serina/treonina fosfatasas defosforilan el canal y aumentan su sensibilidad al cGMP, mientras que las proteínas serina/treonina kinasas lo fosforilan (en presencia de ATP) y lo vuelven menos sensible a cGMP, aumentando las probabilidades de estar cerrado. Las proteínas tirosín kinasas (PTK) y proteínas tirosín fosfatasas (PTP), compiten por el mismo sitio del canal (Molokanova *et al.*, 1997; Molokanova *et al.*, 2000; Kramer y Molokanova, 2001; Molokanova y Kramer, 2001). Cuando se une la PTP se produce la apertura del canal, mientras que la unión de la PTK provoca su cierre (Figura 13).

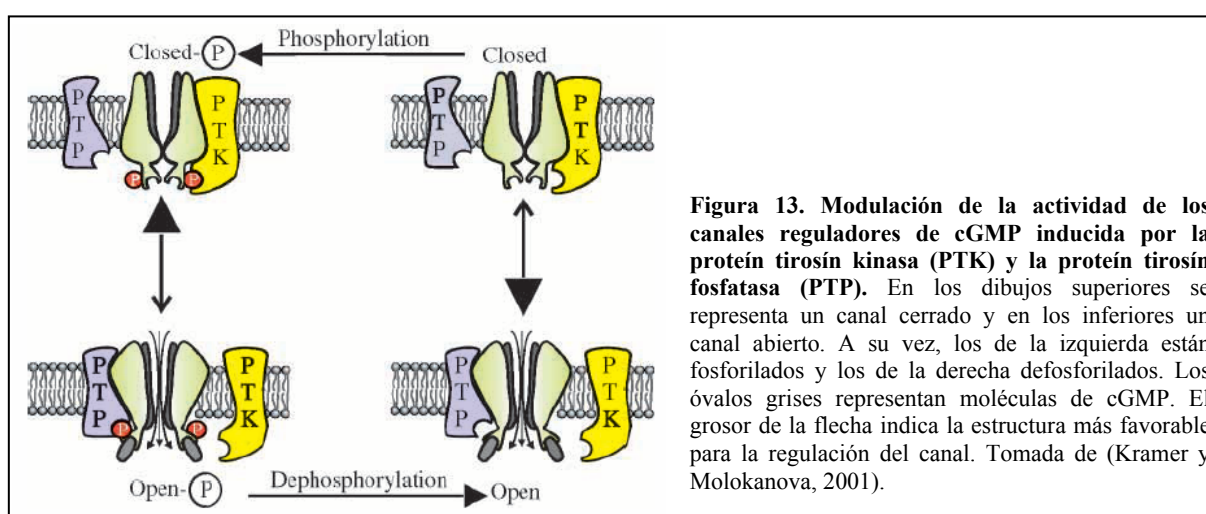


Figura 13. Modulación de la actividad de los canales reguladores de cGMP inducida por la proteína tirosín kinasa (PTK) y la proteína tirosín fosfatasa (PTP). En los dibujos superiores se representa un canal cerrado y en los inferiores un canal abierto. A su vez, los de la izquierda están fosforilados y los de la derecha defosforilados. Los óvalos grises representan moléculas de cGMP. El grosor de la flecha indica la estructura más favorable para la regulación del canal. Tomada de (Kramer y Molokanova, 2001).

I.4.1.2. Fase de inactivación de la fototransducción

Como sucede en otras vías de señalización mediadas por la proteína G, la finalización de la cascada de fototransducción requiere la inactivación de todos los intermediarios activados (R^* , G^* y PDE^*) y la restauración de las condiciones basales de los fotorreceptores en la oscuridad. El reestablecimiento del estado basal se consigue mediante la fosforilación de la rodopsina por una rodopsín kinasa seguida de la unión de la arrestina a la rodopsina fosforilada, la hidrólisis del GTP de la transducina por su actividad guanosín trifosfatasa (GTPasa) intrínseca, la restauración de la inhibición de la PDE por sus subunidades γ , y la elevación de los niveles de cGMP por una guanilato ciclasa.

I.4.1.2.1. Inactivación de la rodopsina

La R^* se vuelve inactiva tras ser fosforilada por una rodopsín kinasa (GRK1) y unirse a la arrestina (Palczewski *et al.*, 1989). GRK1 se ancla a la membrana de los discos mediante su extremo C-terminal farnesilado y establece un complejo con una proteína de unión al Ca^{2+} , la recoverina (REC) (Figura 14). En condiciones basales, este complejo inhibe la fosforilación de la rodopsina sin afectar a la actividad catalítica de la kinasa (Higgins *et al.*, 2006). Sin embargo, el descenso de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} causa su disociación e incrementa la tasa de fosforilación de la rodopsina (Calvert *et al.*, 1998; Hisatomi y Tokunaga, 2002; Calvert *et al.*, 2006).

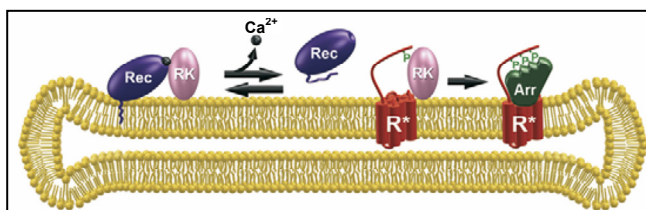
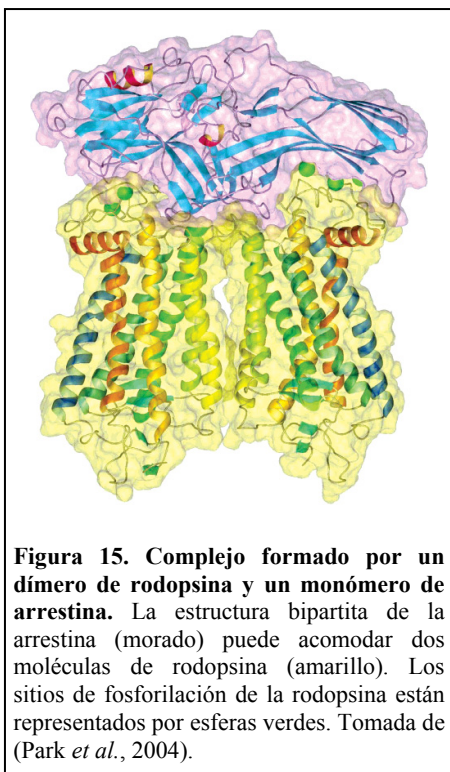


Figura 14. Inactivación de la rodopsina. Las reacciones responsables de la inactivación de la rodopsina fotoexcitada incluyen la fosforilación de R^* por una rodopsín kinasa (RK), seguida de una unión a la arrestina (Arr). La actividad de la RK es regulada por una proteína de unión al Ca^{2+} , la recoverina (Rec), la cual se une a la RK inhibiéndola en presencia de altos niveles de Ca^{2+} . Tomada de (Calvert *et al.*, 2006).

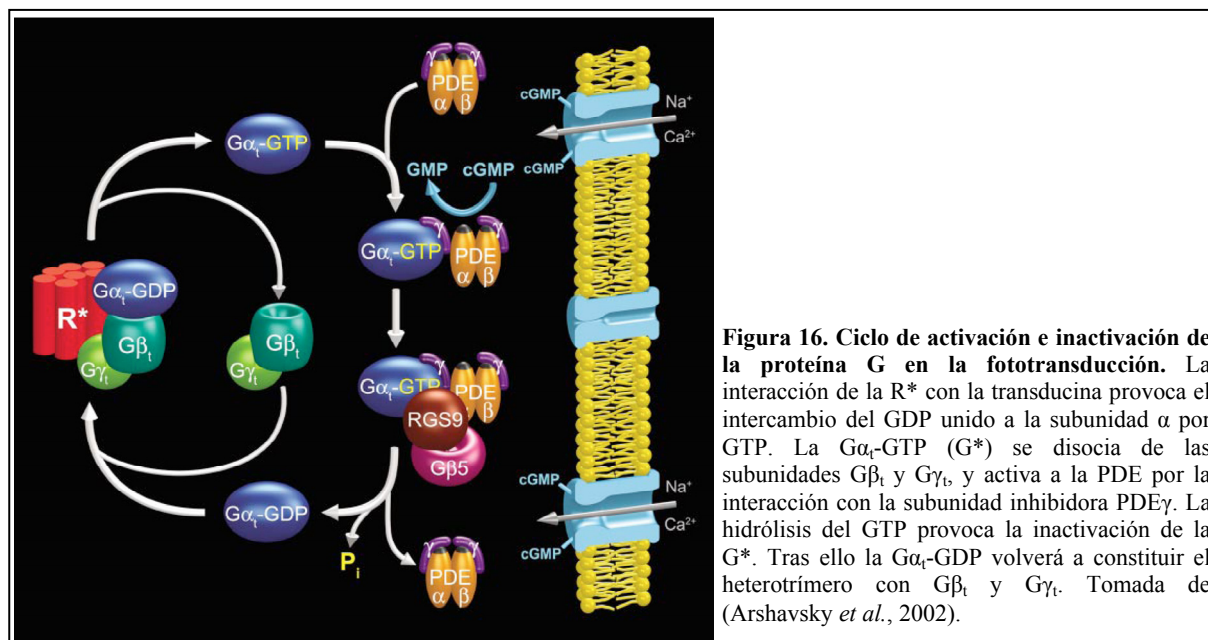
Después de ser fosforilada, la R^* se une a la arrestina. Cada monómero de arrestina posee un área cóncava en el dominio N-terminal y otra en el C-terminal. Ambas concavidades son responsables de la característica estructura en doble cáliz de la arrestina y favorecen la interacción con un dímero de rodopsina (Hirsch *et al.*, 1999; Skegros *et al.*, 2007). La disposición de las cargas positivas en la superficie del dímero de rodopsina se ajusta perfectamente a la de las cargas negativas que posee la arrestina, facilitando la unión de ambas moléculas (Liang *et al.*, 2003) (Figura 15). Además, esta unión está mediada por la fosforilación de los seis o siete lugares de fosforilación del extremo C-terminal de la rodopsina, altamente conservados en diferentes especies de mamíferos. De hecho, el número de fosfatos incorporados al pigmento visual determina la interacción rodopsina-arrestina. La adición de un solo fosfato no facilita la interacción con la arrestina, dos fosfatos inducen una interacción con alta afinidad y la incorporación de tres fosfatos promueve la firme sujeción de la arrestina, permitiéndole



ejercer su acción sobre la rodopsina. Mayores niveles de fosforilación no incrementan la estabilidad del complejo formado por la arrestina y la rodopsina activada, pero sí consiguen potenciar la unión de la arrestina a la fosforodopsina o fosfoconopsina en la oscuridad. El complejo formado por la arrestina y la rodopsina activada hiperfosforilada libera el todo-*trans* retinal de una forma más rápida, sugiriendo que la arrestina interrumpe la señalización de la rodopsina inmediatamente después de la adición del tercer fosfato por la rodopsín kinasa (Vishnivetskiy *et al.*, 2007).

I.4.1.2.2. Inactivación de la transducina

La hidrólisis del GTP unido a la G^* (en GDP y P_i) provoca la inactivación de la G^* (Figura 16). Dicha hidrólisis está regulada por la actividad GTPasa de la PDE, la cual depende del estado de ocupación de los sitios no catalíticos de las subunidades α y β (Cote *et al.*, 1994; Arshavsky *et al.*, 2002). Si estos sitios permanecen ocupados con cGMP la tasa de hidrólisis de GTP es relativamente baja y la G^* puede permanecer activa durante un periodo de tiempo relativamente largo. Cuando la luz causa la disminución de la concentración plasmática de cGMP libre, seguido de una disociación del cGMP de los sitios no catalíticos, la tasa de hidrólisis del GTP se multiplica y la duración de la activación de la G^* se reduce. Este mecanismo podría acelerar la recuperación de la fotorrespuesta (Calvert *et al.*, 1998). El tiempo de actuación de la PDE* está controlado por la G^* , puesto que la hidrólisis del GTP provoca su inactivación y consecuentemente la de la PDE (Arshavsky *et al.*, 2002).



I.4.1.2.3. Inactivación de la fosfodiesterasa

La hidrólisis del GTP unido a la G^* provoca la disociación de la G^* y la PDE, tras lo cual el enzima efector recupera su estado inactivado (Arshavsky *et al.*, 2002). La actividad GTPasa es un factor determinante tanto para la sensibilidad como para el tiempo de respuesta a la luz. De hecho, cuanto más baja es esta actividad, más tiempo permanecerá activada la PDE, mayor será la amplitud de la respuesta y mayor será la sensibilidad. Sin embargo, el aumento de sensibilidad conlleva una menor respuesta y un mayor tiempo de resolución del proceso de fototransducción. Por este motivo, los fotorreceptores emplean un mecanismo molecular para potenciar la relativamente baja actividad GTPasa en al menos dos órdenes de magnitud. Esto lo consiguen gracias a la PDE γ y a un complejo proteico constituido por una proteína reguladora de la señalización de la proteína G (RGS9) y la variante de splicing larga de la subunidad β de la proteína G tipo 5 ($G_{\beta}5L$) (Tsang *et al.*, 1998; Arshavsky *et al.*, 2002). Aunque RGS9 se expresa en ambos tipos de fotorreceptores, se encuentra en mayor proporción en los conos (Hisatomi y Tokunaga, 2002). Esta circunstancia sería la responsable de la cinética de fotorrespuesta más rápida y la menor sensibilidad de los conos, en comparación con los bastones. La asociación entre RGS9 y la proteína transmembrana R9AP ocasiona el anclaje del complejo RGS9- $G_{\beta}5L$ a la membrana de los discos de los fotorreceptores, estabilizando el complejo regulador que acelera la tasa de hidrólisis de GTP (Keresztes *et al.*, 2004) (Figura 17). Por un lado, la PDE γ contribuiría de forma directa a la hidrólisis de GTP, estabilizando el estado de transición de la G^* (Arshavsky *et al.*, 2002). Y por otro lado, incrementaría la afinidad entre la G^* y el complejo RGS9- $G_{\beta}5L$ (el más eficiente activador de la GTPasa de una proteína G heterotrimérica, con una tasa de recambio de $\sim 100 \text{ s}^{-1}$ a 22°C). Aunque ambas acciones de la PDE γ se manifiestan en la misma proporción y poseen igual importancia en la regulación de la actividad GTPasa, la última es

suficientemente válida de por sí para concluir la fotorrespuesta en los fotorreceptores (incluso en los más rápidos, los conos humanos). Sin embargo, si la G^* fuese inactivada por el complejo RGS9-G β 5L sin necesidad de unirse a la PDE, podría darse la circunstancia de que algunas moléculas de G^* fuesen inactivadas antes de activar a la PDE, provocando que la señal de

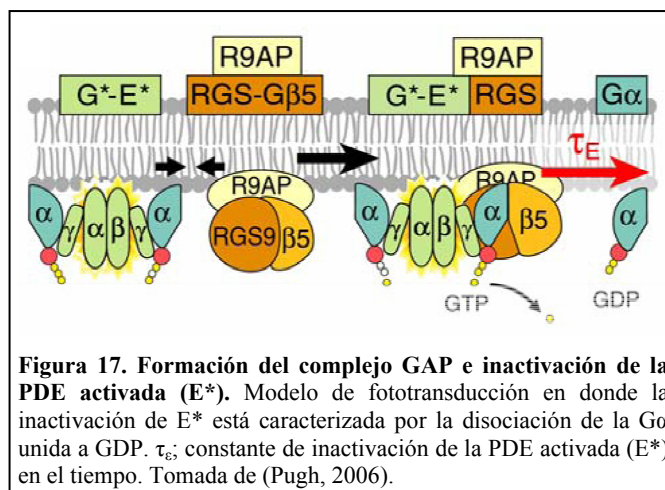


Figura 17. Formación del complejo GAP e inactivación de la PDE activada (E^*). Modelo de fototransducción en donde la inactivación de E^* está caracterizada por la disociación de la $G\alpha$ unida a GDP. τ_E : constante de inactivación de la PDE activada (E^*) en el tiempo. Tomada de (Pugh, 2006).

amplificación fuese menor. Por lo tanto, la activación de la GTPasa dependiente de la asociación de G^* y PDE γ garantiza la alta eficiencia de transmisión de señal entre G^* y PDE, puesto que la hidrólisis de GTP no tendría lugar sin la unión de G^* a PDE.

I.4.1.2.4. Apertura de los canales regulados por cGMP

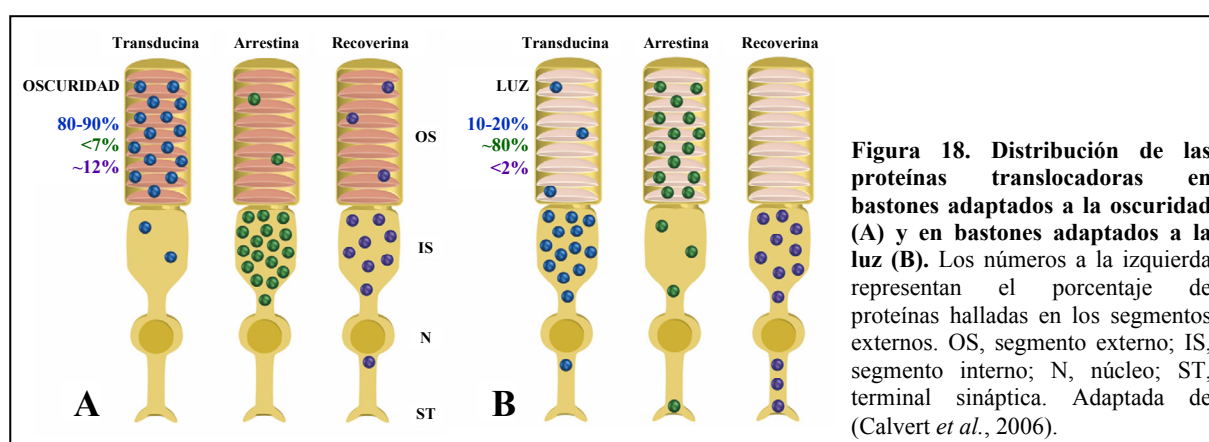
Tras la inactivación de la R^* , la G^* y la PDE * , una guanilato ciclasa (GC) se encarga de aumentar la concentración citoplasmática del cGMP hasta alcanzar el valor del estado basal en la oscuridad, permitiendo la apertura de los canales (Arshavsky *et al.*, 2002). Con ello se logra que el sistema vuelva a estar dispuesto para un nuevo proceso de señalización.

La GC presenta una baja actividad ciclasa en la oscuridad. Sin embargo, cuando la respuesta a la luz disminuye la concentración intracelular de Ca^{2+} , esta actividad es estimulada a través de unas proteínas de unión al Ca^{2+} denominadas proteínas activadoras de la guanilato ciclasa (GCAPs; GCAP2 se localiza en los bastones y GCAP3 en todos los subtipos de conos) (Hisatomi y Tokunaga, 2002). De esta forma, el incremento de la síntesis de cGMP consigue contrarrestar el elevado efecto hidrolítico de la PDE (Govardovskii *et al.*, 2000).

La GC se une directamente a los filamentos de actina que forman parte del citoesqueleto de los segmentos externos de los fotorreceptores y se distribuye por toda la extensión de las membranas de los discos (Hallett *et al.*, 1996). En la retina humana pueden identificarse dos tipos de GC: GC1 y GC2 (Hisatomi y Tokunaga, 2002). GC1 se localiza principalmente en los segmentos externos de los conos y secundariamente en los de los bastones. Por su parte, GC2 se encuentra en igual cantidad en conos y en bastones.

I.4.1.3. Translocación de la transducina, la arrestina y la recoverina

La exposición a la luz induce cambios en la localización subcelular de la transducina, la arrestina y la recoverina contenidas en los fotorreceptores (Figura 18). Los movimientos que implican la translocación de estas proteínas se realizan mediante mecanismos de difusión (Calvert *et al.*, 2006). En los bastones, la transducina sale del segmento externo y se acumula en el segmento interno, la arrestina se moviliza en dirección contraria y la recoverina se traslada desde el segmento externo hacia la sinapsis. En los conos, se producen movimientos de la arrestina con la luz, aunque no sucede lo mismo con la transducina; y, por el momento, no se ha verificado la translocación de la recoverina (Calvert *et al.*, 2006; Lobanova *et al.*, 2007).



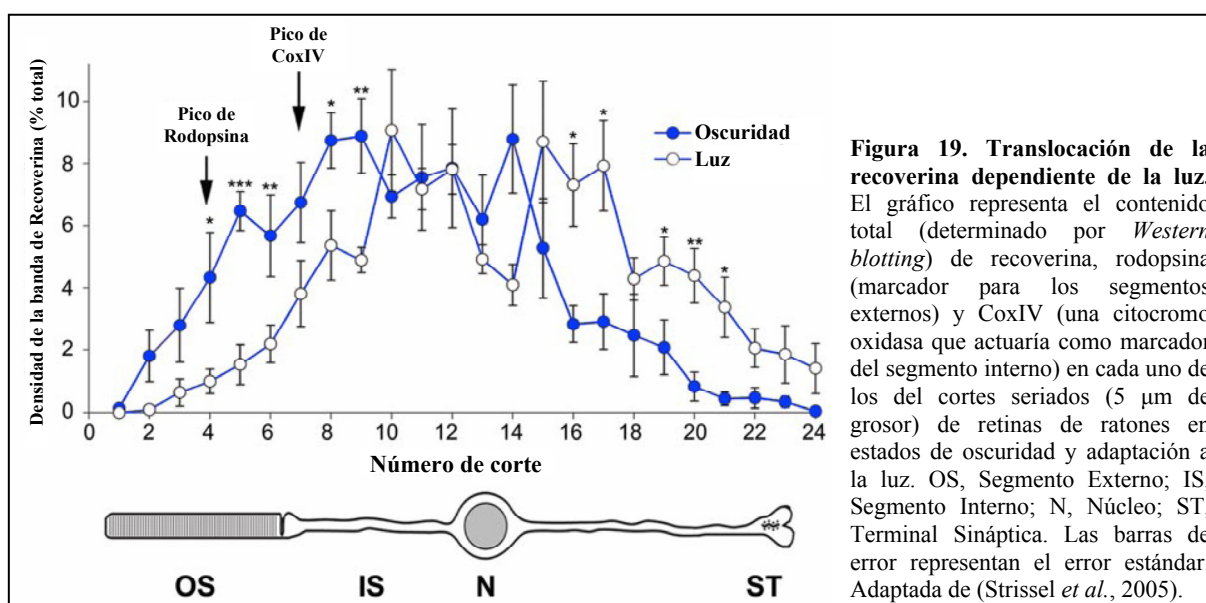
Después de que el fotorreceptor haya sido excitado por la luz, una cantidad considerable de transducina sale del segmento externo, retornando únicamente en condiciones de oscuridad (Sokolov *et al.*, 2002). De hecho, en días con intensidades luminosas normales, el 90% de la transducina sale del segmento externo en menos de 10 minutos. El umbral de dependencia a la luz que presenta la translocación de la transducina está determinado por la capacidad del complejo de activación de la GTPasa para inactivar a esta proteína (Lobanova *et al.*, 2007). Además, la eficiencia en la translocación de la G* depende de las propiedades lipofílicas de su grupo acilo y de la hidrofobicidad generada por su modificación. La mayor proporción de RGS9 existente en los conos permite una inactivación más eficiente de la transducina, que se traduce en una mayor retención de sus subunidades por las membranas de los discos.

Por otro lado, en condiciones de luminosidad, la fosducina facilita la translocación de la transducina desde los segmentos externos hacia otros compartimentos de los bastones (Sokolov *et al.*, 2004). Una vez disociadas de las membranas de los discos, la translocación de las subunidades de la transducina puede ser llevada a cabo por dos mecanismos alternativos: la difusión o el transporte activo. Si bien es cierto que existen evidencias que apoyan las dos hipótesis, no existen suficientes datos para decantar la balanza hacia una de las dos posibilidades. Si la translocación de la transducina se basase en la difusión, la fosducina podría incrementar la tasa de translocación de la G $\beta\gamma$ al volverla

más soluble, puesto que ocultaría el grupo farnesilo en un hueco intramolecular. Si, por el contrario, la translocación se basa en el transporte activo, la fosducina debería unirse a las $G\beta\gamma$ para transportarlas hacia el correspondiente sistema molecular de transporte.

En condiciones de oscuridad, la mayor parte de la arrestina se encuentra en los segmentos internos (Sokolov *et al.*, 2002). Aquí, los monómeros de arrestina y los tetrámeros formados por oligomerización de estos monómeros, se encuentran unidos a los microtúbulos, constituyendo un almacén de arrestina (Hanson *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando la intensidad de luz alcanza el umbral crítico correspondiente al límite superior del rango normal de respuesta de los bastones, la arrestina se desplaza hacia los segmentos externos (Sokolov *et al.*, 2002; Strissel *et al.*, 2006). El movimiento de arrestina entre ambos segmentos conlleva un incremento de la concentración de arrestina libre en el citoplasma del segmento externo, favoreciendo la inactivación de la R^* fosforilada (Strissel *et al.*, 2006).


En último lugar, la luz causa una reducción de la recoverina contenida en el segmento externo de los bastones, que viene acompañada de su redistribución hacia los terminales sinápticos. Aunque todavía no se ha determinado el mecanismo de desplazamiento de la recoverina, es muy probable que esta molécula se mueva bien mediante difusión a través del citoplasma del fotorreceptor, bien mediante transporte activo. La alta afinidad por las membranas que presenta la recoverina unida al Ca^{2+} provocaría que, en condiciones de oscuridad (alta concentración de Ca^{2+} libre), fuese atraída por el elevado contenido de membranas del segmento externo. Durante el día, cuando bajan los niveles de Ca^{2+} libre, la recoverina se disociaría de las membranas y se redistribuiría por todo el bastón o se uniría a lugares específicos del cuerpo celular (Figura 19). La translocación de la recoverina es un proceso adaptativo, puesto que puede reducir la inhibición que la recoverina ejerce sobre la rodopsín kinasa. Por el contrario, no se ha identificado translocación de la rodopsín kinasa ni de las proteínas activadoras de la guanilato ciclasa (Strissel *et al.*, 2005).



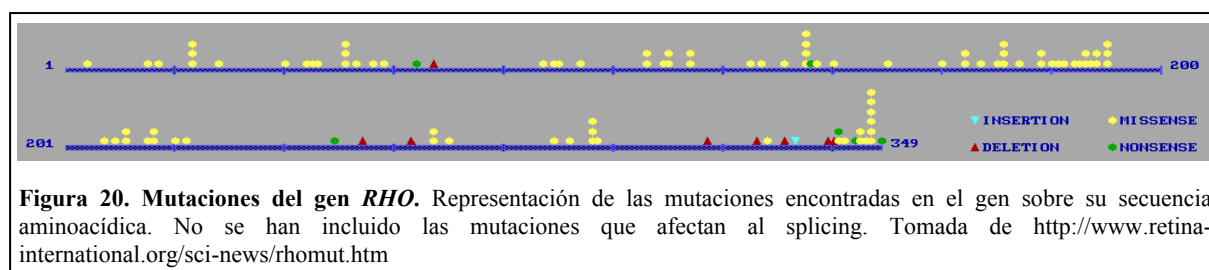
I.4.1.4. Genes responsables de RP implicados en la fototransducción

En este grupo se incluyen aquellos genes cuyas mutaciones causan defectos en el proceso de la fototransducción que conducen a la degeneración de la retina.

I.4.1.4.1. Rodopsina (opsina de los bastones)

	
Símbolo: <i>RHO</i> (OMIM: +180380)	Proteína codificada: 5 exones, 349 a.a.
Otros alias: <i>RP4</i>	Función: Molécula captadora de fotones
Región cromosómica: 3q21.3	Especificidad de tejido: Retina (bastones)
Posición: 130730172-130736877	Localización subcelular: Membrana
Patologías asociadas: adRP, arRP, adCNSB	Propiedades: λ_{\max} = 495 nm

El gen que codifica la rodopsina humana fue aislado y secuenciado en 1984 (Nathans y Hogness, 1984). La localización de este gen dentro de un locus que cosegregaba con una forma dominante de RP en un pedigree irlandés (RP1; 3q), sugirió su implicación como posible gen candidato (McWilliam *et al.*, 1989). El hallazgo de numerosas mutaciones en *RHO* confirmaron su responsabilidad en la patogénesis de la adRP (McWilliam *et al.*, 1989; Farrar *et al.*, 1990; Dryja *et al.*, 1991; Sung *et al.*, 1991; Farrar *et al.*, 1991b; Bunge *et al.*, 1993; Min *et al.*, 1993; Sung *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1994; Sung *et al.*, 1994; Vaithinathan *et al.*, 1994; Millán *et al.*, 1995; Simonelli *et al.*, 1998; Bessant *et al.*, 1999a; Budu *et al.*, 2000; Dryja *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2004). Además, también se han encontrado mutaciones en *RHO* cosegregando con arRP (Rosenfeld *et al.*, 1992; Kumaramanickavel *et al.*, 1994) y con adCSNB (Dryja *et al.*, 1993; al-Jandal *et al.*, 1999). En la actualidad, las más de 100 mutaciones del gen *RHO* (Figura 20) explican un 26,5% de los casos de adRP (Daiger *et al.*, 2007) y ~1% de los casos de arRP (Hartong *et al.*, 2006).



I.4.1.4.2. Subunidad α de la fosfodiesterasa de cGMP, 6

Símbolo: <i>PDE6A</i> (OMIM: *180071)	Proteína codificada: 22 exones, 861 a.a.
Otros alias: <i>PDEA</i>	Función: Transmisión y amplificación de la señal visual
Región cromosómica: 5q33.1	Actividad catalítica: cGMP + H ₂ O → GMP
Posición: 149220419-149304549	Localización subcelular: Membrana celular
Patologías asociadas: arRP	Propiedades: Forma un trímero con PDE6B y PDE6G

En 1990, se caracterizó el cDNA de varios clones solapados que codificaban la subunidad α de la fosfodiesterasa humana, un enzima clave para la fototransducción (Pittler *et al.*, 1990). Posteriormente, mediante hibridación de este cDNA con un panel de DNAs de células somáticas híbridas, se determinó que el gen *PDE6A* humano se localizaba en el brazo largo del cromosoma 5, entre las regiones q31.2 y q34.

En un estudio realizado sobre 167 individuos con adRP y 173 con arRP, se identificaron diversas variaciones de secuencia del gen *PDE6A*, entre las que destacaban tres mutaciones encontradas en dos individuos con arRP (Huang *et al.*, 1995). El hallazgo de estas mutaciones, ha permitido establecer relaciones causales entre *PDE6A* y la RP, en particular con su forma recesiva. Posteriores investigaciones aportaron nuevas mutaciones en *PDE6A* (Dryja *et al.*, 1999). En la actualidad, se estima que un 4% de los casos de arRP están causados por mutaciones en *PDE6A* (Daiger *et al.*, 2007).

I.4.1.4.3. Subunidad β de la fosfodiesterasa de cGMP, 6

Símbolo: <i>PDE6B</i> (OMIM: +180072)	Proteína codificada: 22 exones, 855 a.a.
Otros alias: <i>PDEB</i>	Función: Transmisión y amplificación de la señal visual
Región cromosómica: 4p16.3	Actividad catalítica: cGMP + H ₂ O → GMP
Posición: 609373-654571	Localización subcelular: Membrana celular
Patologías asociadas: arRP, adCSNB	Propiedades: Forma un trímero con PDE6A y PDE6G


Durante la búsqueda del gen de la enfermedad de Huntington, Weber *et al.* clonaron y secuenciaron 34 Kb de DNA genómico que contenían al gen de la subunidad β de la fosfodiesterasa de cGMP humana, lo cual les permitió conocer la estructura y la secuencia completa del gen (Weber *et al.*, 1991). Prácticamente al mismo tiempo, varios autores localizaron a *PDE6B* en 4p16.3, una región muy próxima al telómero (Weber *et al.*, 1991; Altherr *et al.*, 1992; Bateman *et al.*, 1992). Este gen es

altamente expresado en retina, aunque existe una pequeña expresión en cerebro de un transcrito de menor tamaño (Weber *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1992).

La identificación de una mutación en el gen de la subunidad β de la fosfodiesterasa de cGMP de los bastones –responsable de la degeneración retinal de los ratones mutantes *rd* (Pittler y Baehr, 1991)– sugirió la probable implicación de su homólogo humano en las degeneraciones de la retina (Altherr *et al.*, 1992; Bateman *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1992). El posterior hallazgo de una mutación en el gen *PDE6B* de perros Setter irlandés afectados de displasia de bastones y conos, proporcionaría mayor solidez a esta hipótesis (Suber *et al.*, 1993). Sin embargo, su confirmación fue patente cuando McLaughlin *et al.* identificaron cuatro mutaciones en el *PDE6B* humano que cosegregaban con arRP (McLaughlin *et al.*, 1993). Más tarde, se comprobó como una transversión en heterocigosis de una C por A dentro del exón 4 del gen *PDE6B*, cosegregaba con una forma autosómica dominante de CSNB en un pedigree danés (Gal *et al.*, 1994), involucrando todavía más a este gen en la instauración de ciertas patologías degenerativas de la retina.

A lo largo de estos años han ido apareciendo nuevas mutaciones en *PDE6B* (Danciger *et al.*, 1995; McLaughlin *et al.*, 1995; Danciger *et al.*, 1996; Valverde *et al.*, 1996; Piriev *et al.*, 1998), el conjunto de las cuales representa un 4% de los casos de arRP (Daiger *et al.*, 2007). Sin embargo, no hay constancia de haber encontrado alguna que cosegregue con adRP (Gao *et al.*, 1996).

I.4.1.4.4. Subunidad α de los canales regulados por cGMP de los bastones, 1


	
Símbolo: <i>CNGA1</i> (OMIM: *123825)	Proteína codificada: 8 exones, 690 a.a.
Otros alias: <i>CNCG1</i>	Función: Transducción de la señal visual
Región cromosómica: 4p12	Especificidad de tejido: Retina (bastones)
Posición: 47632751-47649477	Localización subcelular: Membrana
Patologías asociadas: arRP	Propiedades: Forma un tetrámero con CNGB1

La secuencia y la estructura del gen de la subunidad α del canal catiónico regulado por cGMP de los bastones, fueron caracterizadas por Pittler *et al.* y Dhallan *et al.* a principios de los noventa (Dhallan *et al.*, 1992; Pittler *et al.*, 1992). *CNGA1* fue inicialmente localizado cerca del centrómero del cromosoma 4, en la región p14-q13 (Pittler *et al.*, 1992). Más tarde, mediante hibridación in situ, Griffin *et al.* delimitaron de forma más precisa la localización de *CNGA1*, ubicándolo entre 4p12 y el centrómero (Griffin *et al.*, 1993).

La posibilidad de que los defectos moleculares del canal iónico condujesen al mal funcionamiento de la cascada de fototransducción y la incapacidad para generar un impulso nervioso, puso de manifiesto que *CNGA1* podía ser un gen candidato para la RP u otros trastornos de la retina (Pittler *et al.*, 1992). La identificación de varias mutaciones de este gen cosegregando con arRP, zanjó

cualquier duda en cuanto a su implicación en la RP (Dryja *et al.*, 1995; Paloma *et al.*, 2002b). Las mutaciones de *CNGA1* explican un 2,3% de los casos de arRP (Daiger *et al.*, 2007).

I.1.4.1.5. Subunidad β de los canales regulados por cGMP de los bastones, 1

	
Símbolo: <i>CNGB1</i> (OMIM: *600724)	Proteína codificada: 33 exones, 1246 a.a.
Otros alias: <i>CNCG2</i> , <i>GARI</i>	Función: Transducción de la señal visual
Región cromosómica: 16q13	Especificidad de tejido: Retina (bastones)
Posición: 56475206-56562513	Localización subcelular: Membrana
Patologías asociadas: arRP	Propiedades: Forma un tetrámero con <i>CNGA1</i>

Cuando Chen *et al.* analizaron el canal regulado por cGMP de bastones en geles SDS se encontraron, además de la banda proteica de 63 kDa de la subunidad α (Cook *et al.*, 1987), con otra banda de 240 kDa (Chen *et al.*, 1994). Dentro de esta banda podrían coexistir dos péptidos: la subunidad β –el sustrato de unión de la Ca^{2+} -Calmodulina, un modulador de la afinidad del canal por cGMP– y una proteína de ~65 kDa, la subunidad γ (Ardell *et al.*, 1995). El gen que codifica a la subunidad γ , *GARI*, fue localizado en 16q13. Posteriormente, la identificación de la secuencia aminoacídica completa de la subunidad β , permitió verificar que el gen *GARI* codificaba su región N-terminal o parte GARP (Ardell *et al.*, 1996). La *CNGB1* humana se sintetiza a partir de un complejo locus localizado en el cromosoma 16, el cual es capaz de generar transcritos independientes correspondientes a *GARI* y los dos tercios C-terminales de la subunidad (Ardell *et al.*, 1996; Ardell *et al.*, 2000).

El análisis de homocigosidad efectuado en una familia francesa consanguínea afectada por una forma severa de arRP, manifestó la cosegregación de esta patología con una mutación (G993V) en homocigosis del gen *CNGB1* (Bareil *et al.*, 2001). G993V provoca el cambio de una altamente conservada glicina por una valina dentro del dominio de unión a cGMP de la subunidad β . La citada mutación G993V, junto con la mutación de splicing c.3444+1G>A (Kondo *et al.*, 2004) son, hasta el momento, las únicas mutaciones de *CNGB1* relacionadas con la patogénesis de RP y representan un 4% del total de los casos de arRP (Hartong *et al.*, 2006).

I.1.4.1.6. Arrestina

Símbolo: <i>SAG</i> (OMIM: *181031)	Proteína codificada: 16 exones, 406 a.a.
Otros alias: <i>S-ANTIGEN</i>	Función: Inhibición de la activación de la fosfodiesterasa
Región cromosómica: 2q37.1	Especificidad de tejido: Retina y glándula pineal
Posición: 233881207-233920440	Localización subcelular: Citoplasma
Patologías asociadas: arRP, arCSNB	Propiedades: Interactúa selectivamente con Ca ²⁺

El gen que codifica a la arrestina, una proteína soluble de 48 kDa encontrada en retina y glándula pineal, fue inicialmente localizado en la región cromosómica 2q24-q37 (Ngo *et al.*, 1990). Posteriormente, mediante FISH (*Fluorescence in situ hybridation*) se refinó esta localización a q37 (Calabrese *et al.*, 1994). La variante de splicing p⁴⁴ (44 kDa) posee una secuencia aminoacídica similar a la de la arrestina (excepto por la ausencia de los 35 residuos C-terminales), pero presenta mayor actividad inhibitoria de la fototransducción (Palczewski *et al.*, 1994). Mientras que la arrestina se distribuye por toda la célula, p⁴⁴ se encuentra restringida al segmento externo de los fotorreceptores, lo que sugiere un posible rol de esta variante en la cascada de fototransducción (Smith *et al.*, 1994).

Mutaciones en *SAG* inducen la enfermedad de Oguchi (arCSNB) (Fuchs *et al.*, 1995; Nakamachi *et al.*, 1998). La mutación 1147delA de este gen, causa frecuente de enfermedad de Oguchi en población japonesa, también ha sido relacionada con arRP, aportando evidencia de expresión variable de la mutación en el gen *SAG* (Nakazawa *et al.*, 1998). Dicha mutación explica <1% de los casos de arRP (Hartong *et al.*, 2006).

I.1.4.1.7. Proteína activadora de la guanilato ciclasa, 1B

Símbolo: <i>GUCA1B</i> (OMIM: *602275)	Proteína codificada: 4 exones, 201 a.a.
Otros alias: <i>GCAP2</i>	Función: Estimulación de la guanilato ciclasa 1
Región cromosómica: 6p21.1	Especificidad de tejido: Retina (bastones y conos)
Posición: 42259000-42270672	Localización subcelular: Membrana celular
Patologías asociadas: adRP, adMD	Propiedades: Une tres iones de Ca ²⁺

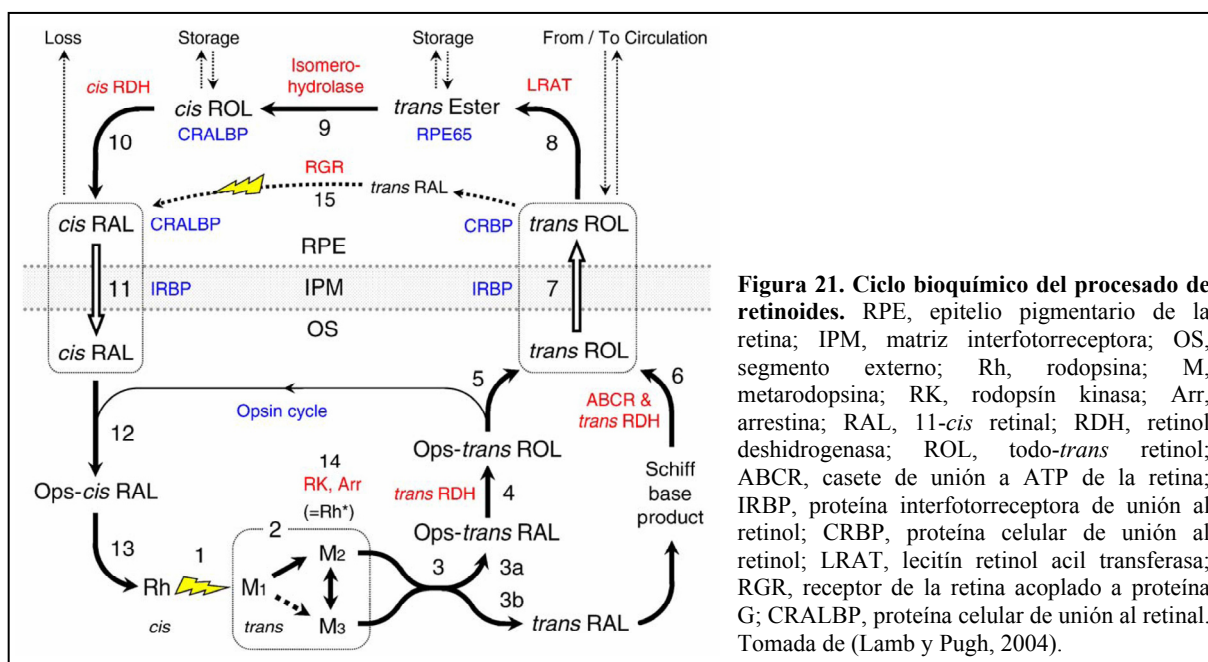
Los genes *GUCA1A* y *GUCA1B* comparten el mismo locus, localizado en la región 6p21.1 (Surguchov *et al.*, 1997). Sin embargo, el parecido entre sus respectivas secuencias se limita a ciertas porciones de los exones 1 y 2. Muy probablemente, la coexistencia de estos dos genes en un mismo locus y la relativa semejanza de sus secuencias nucleotídicas, se deban a un evento de duplicación génica. En la retina humana, la proteína *GUCA1B* se distribuye mayoritariamente en los segmentos

internos, somas y sinapsis de los conos; y en menor grado en los segmentos internos de los bastones y las neuronas de la retina interna (Otto-Bruc *et al.*, 1997). Aunque *GUCA1A* está involucrada en la regulación por Ca^{2+} de la Guanilato Ciclasa de bastones y conos, *GUCA1B* puede tener una función no fototransductora en los fotorreceptores y en las neuronas de la retina interna.

La identificación de una transición en heterozigosis G>A en el codón 157 del gen *GUCA1B* (resultando en el cambio del aminoácido arginina por glicina) cosegregando con RP en tres individuos no relacionados, permitió considerar a este gen como responsable de adRP (Sato *et al.*, 2005). Esta mutación explica menos del 1% de los casos de adRP (Hartong *et al.*, 2006). Los exámenes fenotípicos realizados a los individuos de las familias afectadas, revelan que esta mutación está asociada, además de RP, con degeneración macular y con un fenotipo normal (Sato *et al.*, 2005). Esto sugiere que la citada mutación en *GUCA1B* causa una forma autosómica dominante de distrofia retinal con expresión fenotípica variable y penetrancia incompleta.

I.4.2. Metabolismo del retinol

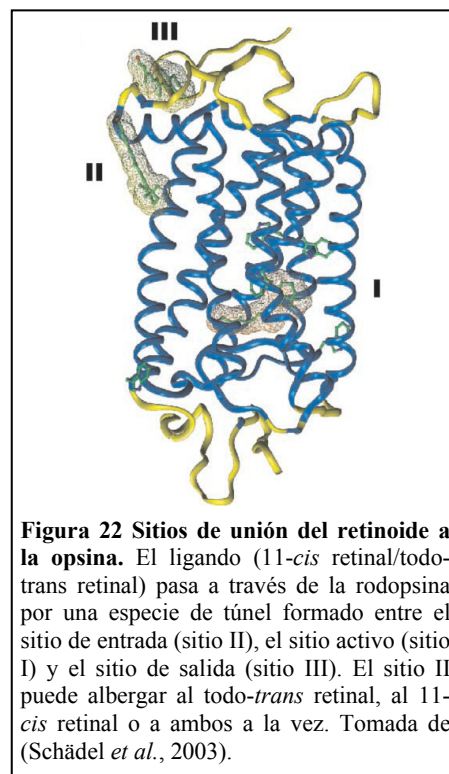
La perfecta adaptación del sistema visual a los diferentes niveles de iluminación ambiental se establece en un período de tiempo relativamente corto. No obstante, después de una exposición intensa o prolongada a la luz, el ojo tarda decenas de minutos en acomodarse a la oscuridad. Este lentísimo fenómeno de recuperación de la sensibilidad visual es el encargado de restaurar la corriente circulante del fotorreceptor, de regenerar los pigmentos visuales de los fotorreceptores y de reestablecer el umbral de la visión. La duración de los procesos de adaptación a la oscuridad y de regeneración del

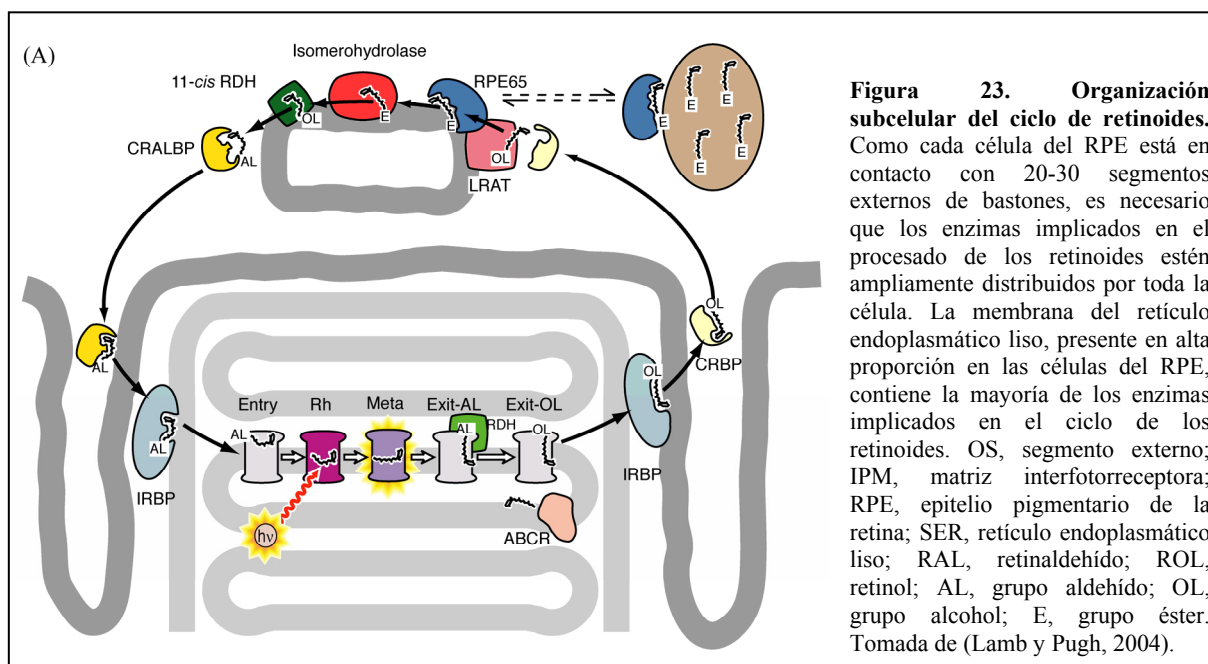


pigmento visual estará determinada por la concentración de 11-*cis* retinal existente en el fotorreceptor (Lamb y Pugh, 2004).

En algunas especies de invertebrados, la recuperación del 11-*cis* retinal se produce por una fotoisomerización retrógrada de la metarodopsina en rodopsina (Lamb y Pugh, 2004). Esta fotoisomerización tiene lugar dentro del fotorreceptor y durante la misma, el retinal permanece unido covalentemente a la opsina. En vertebrados, por el contrario, ni los conos ni los bastones pueden convertir el todo-*trans* retinal en 11-*cis* retinal por si mismos. De hecho, estos fotorreceptores precisan la ayuda de otras células para desenvolver una serie de reacciones químicas (conocidas como el ciclo de los retinoides o ciclo visual) con el fin de obtener el 11-*cis* retinal (Figura 21). En los bastones, el todo-*trans* retinal se libera de la opsina y sale de la célula fotorreceptora en dirección al RPE. Aquí, será reconvertido a 11-*cis* retinal y posteriormente volverá a ingresar en el fotorreceptor. El todo-*trans* retinal liberado por los conos será procesado por un ciclo ligeramente distinto, parte del cual se desarrollará dentro de las células de Müller (Mata *et al.*, 2002).

La liberación de la molécula de todo-*trans* retinal por parte del pigmento visual, se produce por la hidrólisis del enlace covalente en base de Schiff que lo mantiene unido a la apoproteína (Heck *et al.*, 2003; Schädel *et al.*, 2003). Sin embargo, muchas moléculas del aldehído permanecerán unidas mediante interacciones hidrofóbicas a lugares específicos de sus respectivas opsinas (conocidos como “sitios de salida” o sitio III), distintos al lugar de unión convencional del cromóforo con la opsina (sitio I). El todo-*trans* retinal unido al sitio de salida no será liberado hasta que otra molécula de retinaldehído (generalmente 11-*cis* retinal) se una al sitio de entrada (sitio II) (Figura 22). Las opsinas, entonces, actuarían como una chaperona, transportando el todo-*trans* retinal hasta la membrana de los segmentos externos (Lamb y Pugh, 2004). A lo largo del ciclo de los retinoides, varias chaperonas serán las encargadas de guiar a las diferentes configuraciones de la molécula de retinoide a través de los sucesivos pasos, protegiéndolas de la degradación e incrementando enormemente su solubilidad en la fase acuosa. En última instancia, el todo-*trans* retinal será reducido por el enzima todo-*trans* retinol deshidrogenasa (RDH) a todo-*trans* retinol e inmediatamente será liberado de la opsina (Rattner *et al.*, 2000) (Figura 23).

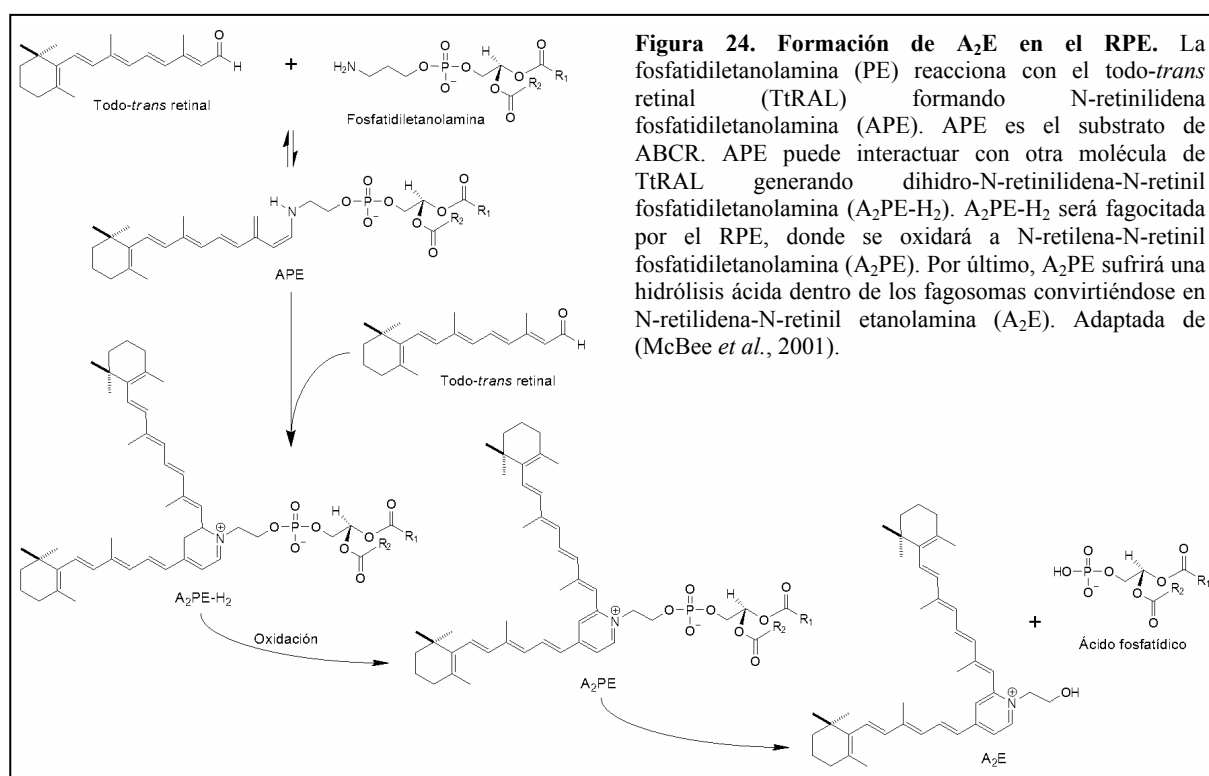




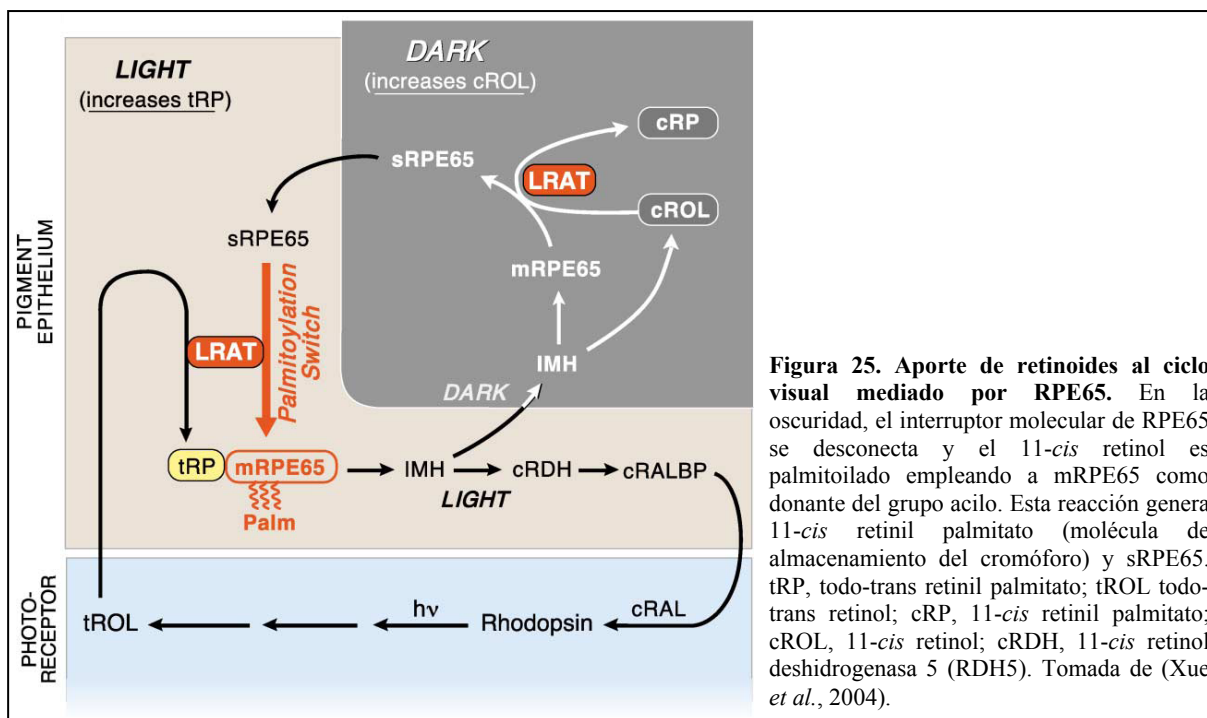
Aquellas moléculas de todo-*trans* retinal que se liberan de la metarodopsina como retinoides libres, pueden unirse de forma espontánea a la fosfatidiletanolamina (PE) a través de un enlace en base de Schiff dando lugar a la N-retilidena-PE o NrPE (McBee *et al.*, 2001). Posteriormente, una segunda molécula de todo-*trans* retinal puede unirse a la NrPE, formando la A₂PE. Esta molécula sufre un cambio químico y origina un producto con mayor condensación, la N-retilidena-N-retiniletanolamina o A₂E, el componente mayoritario de la lipofuscina (Figura 24). Hasta el momento, no se conoce ningún enzima capaz de degradar estos productos de doble condensación (A₂PE y A₂E), lo que explicaría su acumulación. La proteína transportadora ABCR retiraría la NrPE de la cara interna de la membrana de los discos (actuando como una flipasa fosfolipídica), evitando la formación de A₂PE y A₂E. Después de la hidrólisis del ABCR y el todo-*trans* retinal, el aldehído será reducido a todo-*trans* retinol por la RDH en el citoplasma, requiriendo NADPH como cofactor (Rattner *et al.*, 2000).

El todo-*trans* retinol obtenido por ambas vías se desplazará a través del citoplasma y atravesará la membrana plasmática del segmento externo. Una vez aquí, se unirá a la proteína interfotorreceptora de unión a retinoides (IRBP) y atravesará la matriz interfotorreceptora hasta alcanzar el RPE (Lamb y Pugh, 2004). La IRBP es una chaperona con cuatro sitios de unión para retinoides; dos de unión a todo-*trans* retinol y dos de unión al 11-*cis* retinal. En el citoplasma de las células del RPE, el todo-*trans* retinol se unirá a otra chaperona, la proteína celular de unión al retinol (CRBP), antes de ser esterificado por el enzima lecitín retinol acil transferasa (LRAT). El aporte de ácidos grasos necesarios para el proceso de esterificación está regulado por el enzima acil-CoA-retinol aciltransferasa (ARAT). El todo-*trans* retinil éster finalmente obtenido se unirá a otra proteína chaperona, RPE65, que lo trasladará hasta el enzima retinil éster isomerohidrolasa. La entrada de retinoides en el ciclo está regulada por la palmitoilación reversible de RPE65 por LRAT (Xue *et al.*, 2004). La forma asociada a la membrana de RPE65 (mRPE65) sufrirá una triple palmitoilación,

capacitándola para actuar como una chaperona de las largas cadenas de todo-*trans* retinil éster y promover su entrada en el ciclo (Figura 25). Además, mRPE65 actúa como un donante de palmitoil para el 11-*cis* retinol en presencia de LRAT, tras lo que se convierte en la forma soluble de RPE65 (sRPE65). La forma soluble no palmitoilada también funciona como una chaperona, conduciendo el todo-*trans* retinol hasta LRAT para generar todo-*trans* retinil éster. En la oscuridad, cuando no se requiere la síntesis de 11-*cis* retinal, LRAT convierte a mRPE65 en sRPE65, provocando un descenso del aporte de todo-*trans* retinil éster al ciclo. La disminución de la cantidad de todo-*trans* retinil éster disponible causa el bloqueo del ciclo de los retinoides.



Si el ciclo sigue su curso, el todo-*trans* retinil éster aportado por la mRPE65 será el sustrato de la retinil éster isomerohidrolasa, que lo isomerizará a 11-*cis* retinol (Gollapalli y Rando, 2003; Moiseyev *et al.*, 2003). La energía empleada en la reacción de isomerización proviene de la hidrólisis del enlace éster. El consiguiente aumento de la concentración de 11-*cis* retinol actuaría como regulador de la isomerohidrolasa, al ejercer un feedback negativo sobre el enzima.



Moiseyev *et al.* han sugerido que RPE65 podía ser el enzima responsable de la actividad isomerohidrolasa del ciclo visual y que el sustrato hidrofóbico sería suministrado por LRAT (Moiseyev *et al.*, 2005) (Figura 26). Estudios posteriores han confirmado que RPE65 es una isomerohidrolasa del ciclo visual dependiente de Fe^{2+} (Moiseyev *et al.*, 2006).

Llegado este punto del ciclo, el 11-*cis* retinol puede seguir dos vías. Por un lado, puede volver a ser esterificado por la LRAT y posteriormente almacenado. La elevada tasa de intercambio del 11-*cis* retinol manifestada entre los capilares de la coroides y el RPE, genera la pérdida de retinoides esenciales para la nueva síntesis del cromóforo de los pigmentos visuales. Para evitar esta pérdida, los retinoides son almacenados con la intención de mantener las concentraciones de ésteres de retinil en los niveles adecuados. La proteína LRAT resulta esencial en este proceso de acumulación de retinoides (Batten *et al.*, 2004). En el ojo humano, la regeneración de la rodopsina después de una breve exposición a la luz no requeriría el reciclaje de los retinoides, puesto que la cantidad de todo-*trans* retinil éster almacenado evitaría la síntesis del 11-*cis* retinal a partir del procesado del todo-*trans* retinal recién liberado (Lamb y Pugh, 2006). La cantidad de todo-*trans* retinil éster almacenado en el RPE humano equivale (en moles) a $\sim 2,5$ veces la cantidad de retinoide que se encuentra unido a la

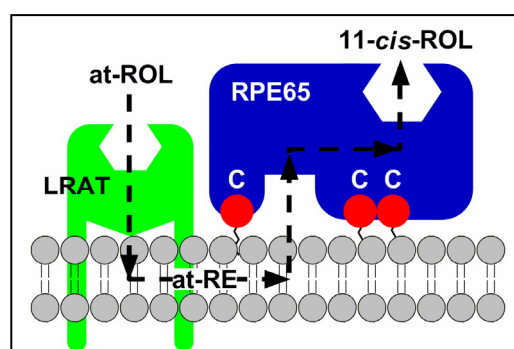
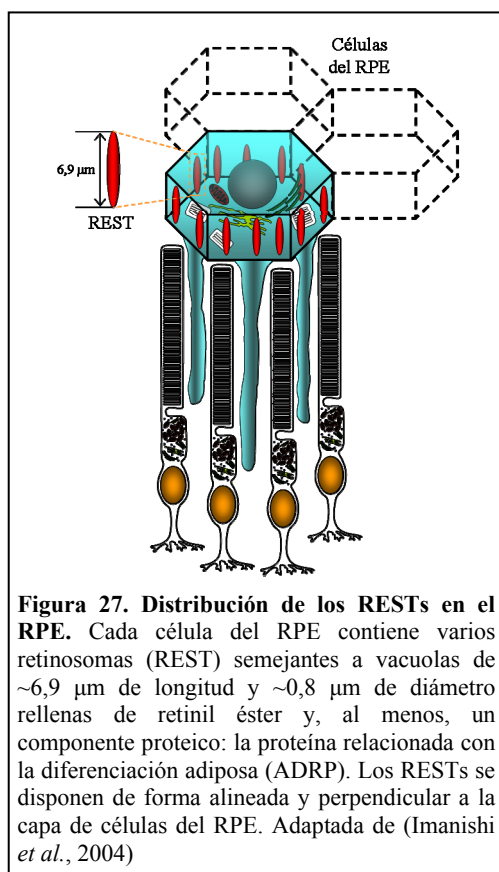


Figura 26. Interacciones entre RPE65 y LRAT. RPE65 está asociada a la membrana mediante tres cisteínas palmitoiladas (C). Lrat convierte todo-*trans* retinol (at-ROL) en todo-*trans* retinil éster (at-RE), el cual será transportado hasta RPE65 a través de la membrana. RPE65 obtiene este sustrato altamente hidrofóbico de la membrana y lo convierte en 11-*cis* retinol (11-*cis*-ROL). Adaptada de (Moiseyev *et al.*, 2005).

rodopsina de los fotorreceptores. En ratones, el retinil éster es almacenado en unas estructuras intracelulares especializadas denominadas RESTs (*Retinyl Ester Storage Particles*) o retinosoma (Imanishi *et al.*, 2004) (Figura 27). No está claro cuando estas estructuras se usan para almacenar retinoides o cuando se usan en el ciclo de los retinoides. Sin embargo, es muy probable que estas estructuras funcionen como un almacén dinámico que facilitaría la rápida movilización de retinoides siempre que se necesitasen.



Por otro lado, el 11-*cis* retinol puede continuar el ciclo de los retinoides, donde será oxidado por la 11-*cis* retinol deshidrogenasa (11-*cis* RDH, o RDH5) transformándose en 11-*cis* retinal (Simon *et al.*, 1995). Este nuevo producto se unirá a la chaperona proteína celular de unión al retinaldehído (CRALBP) y será trasladado hasta la membrana de la célula del RPE (Lamb y Pugh, 2004). Desde aquí, el 11-*cis* retinal atravesará la matriz interfotorreceptora unido a IRBP y alcanzará la membrana del segmento externo de los fotorreceptores. En los conos, el 11-*cis* retinal se unirá a las opsinas dispuestas en la membrana del segmento externo. Sin embargo, en los bastones, el 11-*cis* retinal tendrá que desplazarse por el citoplasma sin ayuda de ninguna chaperona hasta llegar a las membranas de los discos, en donde se unirá a la opsina. En un primer momento, el 11-*cis* retinal y la opsina se unen de forma no covalente en un sitio denominado “sitio de entrada” o

sitio II (Schädel *et al.*, 2003) (Figura 22). Tras esta primera aproximación, se establece espontáneamente un enlace en base de Schiff entre el sitio I de la apoproteína y el 11-*cis* retinal, induciendo un cambio conformacional que estabiliza la molécula de rodopsina en los bastones o la de conopsina en los conos (Lamb y Pugh, 2004).

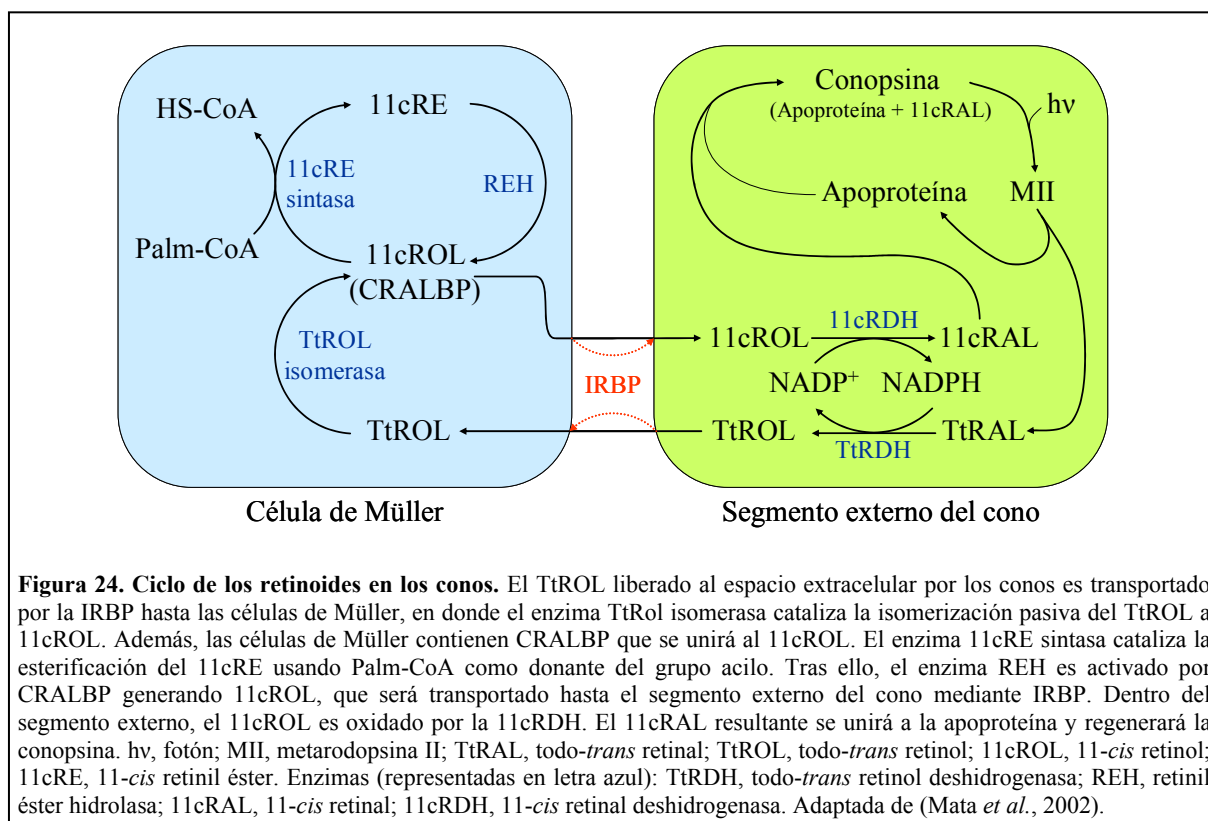
1.4.2.1. Vías alternativas del ciclo de los retinoides

Dentro del ciclo de los retinoides, existen dos rutas que actúan como bypass de algunos pasos, pero no poseen elevada relevancia dentro de la dinámica del procesamiento del retinoide. En primer lugar, la ruta establecida por la proteína ABCR transporta una relativa pequeña proporción de todo-*trans* retinal libre. Sin embargo, este transporte minoritario se convierte en un mecanismo esencial a la hora de evitar los daños que causa el todo-*trans* retinal que se escapa de la ruta normal y se transforma en un agente tóxico, el ácido todo-*trans* retinoico (Hao y Fong, 1999). La elevada afinidad que presenta

este ácido por RPE65, favorece la unión a esta proteína en detrimento de su ligando natural, el *todo-trans* retinil éster. La unión del ácido *todo-trans* retinoico con RPE65 provoca la inhibición de la función del ciclo visual (Gollapalli y Rando, 2004). En segundo lugar, la vía mediada por RGR proporciona una isomerización directa de *todo-trans* retinal en *11-cis* retinal en presencia de luz (Hao y Fong, 1996; Hao y Fong, 1999). La significativa proporción de *11-cis* retinal obtenido a través de esta ruta (con respecto al rendimiento final del ciclo de los retinoides), permite la reconstitución de los pigmentos visuales de los fotorreceptores (Chen *et al.*, 2001). No obstante, la pequeña cantidad de RGR apreciada en el ojo (una centésima parte de la cantidad de rodopsina) limita la contribución de esta vía en la regeneración del *11-cis* retinal aún en presencia de luz (Lamb y Pugh, 2004).

I.4.2.2. El ciclo de los retinoides en los conos

La distancia existente entre el segmento externo de los bastones y el RPE es muy inferior a la observada entre el RPE y los segmentos externos de los conos, mucho más pequeños que los de los bastones. La gran separación entre RPE y conos, dificulta la transferencia del *11-cis* retinol generado en el RPE. Por ello, los conos han tenido que desarrollar rutas alternativas para lograr el aporte de *11-cis* retinol adecuado para poder ser funcionales bajo condiciones de luminosidad (Mata *et al.*, 2002). Las células de Müller han resultado ser piezas clave en la ejecución de estas vías alternativas. Así, en las retinas de pollo y ardilla, las células de Müller presentan una vía de producción de *11-cis* retinol mediada por los enzimas *todo-trans* retinol isomerasa, *11-cis* retinil éster sintasa y retinil éster hidrolasa. Este proceso, junto con la presencia de un enzima *11-cis* RDH (RDH12) en los segmentos externos de los conos, indican la posible producción del *11-cis* retinal por los propios fotorreceptores (Haeseleer *et al.*, 2002; Mata *et al.*, 2002). En las células de Müller, también se ha detectado la expresión de RGR (Jiang *et al.*, 1993). RDH10, una *todo-trans* retinol deshidrogenasa expresada en RPE y células de Müller (Wu *et al.*, 2002), aportaría el *todo-trans* retinal necesario para el correcto funcionamiento de RGR. Las células de Müller, por lo tanto, también estarían capacitadas para generar *11-cis* retinal a partir de *todo-trans* retinol en presencia de luz (Wu *et al.*, 2004). Al contrario que los bastones, los conos no necesitarían los pasos que tienen lugar en el RPE, haciendo que el proceso de regeneración de las conopsinas se ejecutase unas 20 veces más rápido que el de la rodopsina (Mata *et al.*, 2002). Esta vía alternativa de síntesis de *11-cis* retinal sustentaría la excelente visión de los vertebrados en condiciones de alta intensidad de luz (Figura 24).



I.4.2.3. Genes responsables de RP implicados en el metabolismo del retinol

Esta categoría recoge aquellos genes cuyas mutaciones provocan alteraciones en el metabolismo del retinol.

I.4.2.3.1. Lecitín Retinol Aciltransferasa

Símbolo: <i>LRAT</i> (OMIM: +604863)	Proteína codificada: 3 exones, 231 a.a.
Otros alias: <i>O95237</i>	Función: Producción de ésteres de todo- <i>trans</i> retinil
Región cromosómica: 4q32.1	Actividad catalítica: PC + Retinol → 2-acyl-GPC + RE
Posición: 155884613-155893720	Especificidad de tejido: Muy expresada. Entre otros, RPE
Patologías asociadas: arRP, arLCA	Localización subcelular: Retículo endoplasmático

PC, fosfatidilcolina; 2-acyl-GPC, 2-acilglicerofosfolina; RE, retinil éster; RPE, Epitelio Pigmentario de la Retina

La secuencia aminoacídica de LRAT, el enzima responsable de la conversión de todo-*trans* retinol en retinil ésteres, fue descrita en 1999 (Ruiz *et al.*, 1999). Esta proteína de 25,3 kDa se distribuye por RPE, hígado, testículo, intestino y páncreas. La localización cromosómica del gen *LRAT* se asignó a la región 4q31.2 (Ruiz *et al.*, 2001). A pesar de que uno de los primeros estudios mutacionales de *LRAT* no evidenció ninguna asociación con distrofías retinales (Ruiz *et al.*, 2001), en

un estudio posterior se detectaron dos mutaciones que implicaban a este gen en la patogénesis de la distrofia retinal infantil severa (CSRD; *Childhood-onset Severe Retinal Dystrophy*) (Thompson *et al.*, 2001). El término CSRD se emplea para hacer referencia a amaurosis congénita de Leber (LCA) o a formas severas de arRP, patologías genéticamente heterogéneas que afectan a los bastones y a los conos (Sweeney *et al.*, 2007). RP se diagnostica en aquellos individuos que mantienen una buena visión central durante la primera década de vida, a pesar de la degeneración de los receptores (Morimura *et al.*, 1998). Por su parte, el diagnóstico de LCA implica la ceguera desde el nacimiento o la pérdida de visión en los primeros meses de vida. CSRD o EORD (*Early-Onset Retinal Dystrophy*) recogerían todos aquellos casos de afectados de degeneración de la retina que pierden la visión durante los primeros años de vida y en los cuales no existe el suficiente criterio diagnóstico para diferenciar una LCA de una arRP severa. Una de las mutaciones halladas en el estudio de Thompson *et al.*, la delección heterocigota de 2 adeninas (396delAA), se encontró en el alelo paterno de un individuo diagnosticado a los 3 años de degeneración severa de la retina (Thompson *et al.*, 2001). La imposibilidad para hallar la mutación 396delAA en el alelo materno de este individuo sugería que, o bien la distrofia retinal de este paciente no estaba causada por esta mutación, o bien era producto de la herencia digénica con otro gen defectivo. La otra mutación, una transversión en homocigosis 525T>A que genera un cambio aminoacídico de serina por arginina en el residuo 175, cosegregaba con arRP en dos individuos no relacionados cuyos progenitores mostraban consanguinidad. Posteriormente, Senechal *et al.* encontraron una mutación en *LRAT* (c.217delAT) relacionada con LCA (Senechal *et al.*, 2006). Esta nueva mutación causa la parada prematura de la síntesis proteica en el codón 120, resultando en una proteína no funcional.

La prevalencia actual de las mutaciones de *LRAT* entre los casos de arRP, se sitúa en torno al 1% (Hartong *et al.*, 2006).

I.4.2.3.2. Proteína de 65 kDa específica del epitelio pigmentario de la retina

Símbolo: <i>RPE65</i> (OMIM: +180069)	Proteína codificada: 14 exones, 534 a.a.
Otros alias: <i>RP20</i>	Función: Regeneración del 11- <i>cis</i> retinal
Región cromosómica: 1p31.2	Especificidad de tejido: RPE
Posición: 68667095-68688230	Localización subcelular: Citoplasma y membrana celular
Patologías asociadas: arRP, arLCA	Propiedades: Chaperona

La secuencia aminoacídica de la proteína RPE65 bovina fue descrita en 1993 (Hamel *et al.*, 1993). A pesar de comportarse como una molécula de 65 kDa en geles de SDS-PAGE, su masa molecular real se estimó en 60,94 kDa. Mediante FISH, se determinó la localización del gen *RPE65* humano en la región cromosómica 1p31 (Hamel *et al.*, 1994). La proteína RPE65 humana se expresa

bajo dos formas: una de ellas está asociada a la membrana (mRPE65; 65,38 kDa) y contiene considerables modificaciones posttraduccionales, mientras que la otra es citosólica (sRPE65; 61,161 kDa) y no está modificada (Ma *et al.*, 2001). La expresión de RPE65 está regulada negativamente a nivel transcripcional por el ácido retinoico (Chen *et al.*, 2003). RPE65, una proteína de unión a *trans* retinil éster (Gollapalli *et al.*, 2003; Jahng *et al.*, 2003), resulta esencial –pero no suficiente– para la isomerización de estos retinoides en sus isómeros 11-*cis* (Redmond *et al.*, 1998; Znoiko *et al.*, 2002; Mata *et al.*, 2004).

Mutaciones en *RPE65* causan arCSRD (Gu *et al.*, 1997; Morimura *et al.*, 1998). El solapamiento entre mutaciones específicas de *RPE65* encontrado en individuos con arRP y LCA (heterocigotos compuestos), podría explicar la variación de la severidad de la patología debida a estas mutaciones (Morimura *et al.*, 1998). Las distintas combinaciones entre las mutaciones darían lugar a un fenotipo claro de arRP o de LCA, pero existiría un cierto número de casos cuyo fenotipo sería difícilmente distinguible (designados como CSRD o EORD). El caso de LCA causada por mutaciones en *RPE65* mostrado por Marlhens *et al.* se ajusta a esta suposición, puesto que el individuo analizado resultó ser un heterocigoto compuesto para dos mutaciones de *RPE65* (Marlhens *et al.*, 1997). Sin embargo, también se han encontrado mutaciones en homocigosis que causan LCA (Gu *et al.*, 1997; Lotery *et al.*, 2000; Van Hooser *et al.*, 2000; Simovich *et al.*, 2001). En estudios posteriores se confirmó la asociación de arCSRD con mutaciones de *RPE65* en heterocigosis compuesta (Marlhens *et al.*, 1998; Lorenz *et al.*, 2000) y de arEORD con una mutación en homocigosis del mismo gen (El Matri *et al.*, 2006). Además, se ha podido identificar como un evento de isodisomía uniparental paterna del cromosoma 1 ocasiona la homocigosis de un alelo defectivo de *RPE65* (portando la mutación IVS1+5G>A), conduciendo a la degeneración de la retina (Thompson *et al.*, 2000).

Por otro lado, las mutaciones de *RPE65* asociadas a arRP descritas por Gu *et al.* (Gu *et al.*, 1997) resultan difíciles de valorar, debido a que no cosegregan perfectamente con la patología, afectan a regiones intrónicas no relacionadas con los sitios donador y aceptor de splicing o son mutaciones en heterocigosis en las cuales no se ha encontrado el otro alelo mutado (Morimura *et al.*, 1998). En términos generales, las mutaciones en *RPE65* parecen explicar el ~2% de los casos de arRP y el ~16% de los casos de LCA (Morimura *et al.*, 1998; Daiger *et al.*, 2007).

I.4.2.3.3. Proteína de unión al retinaldehído, 1

Símbolo: <i>RLBPI</i> (OMIM: *180090)	Proteína codificada: 9 exones, 318 a.a.
Otros alias: <i>CRALBP</i>	Función: Transporte de 11- <i>cis</i> retinol y 11- <i>cis</i> retinaldehído
Región cromosómica: 15q26.1	Especificidad de tejido: Retina y glándula pineal
Posición: 87554102-87565926	Localización subcelular: Citoplasma
Patologías asociadas: arRP, arBD, arRPA, NFRCD	Propiedades: Chaperona

A partir de una librería de cDNA de retina humana, se clonó un cDNA de 1317 pares de bases (pb) que codificaba a la proteína celular de unión al retinaldehído o CRALBP (Crabb *et al.*, 1988). El gen *RLBPI* humano se localizó en la región cromosómica 15q26 (Sparkes *et al.*, 1992). Los primeros estudios mutacionales de este gen comenzaron a principios de los 90, cuando Cotran *et al.* analizaron el DNA de individuos afectados de RP mediante *Southern blot*, empleando un fragmento de cDNA correspondiente al gen *RLBPI* humano (Cotran *et al.*, 1990). Estos autores no encontraron ninguna asociación entre las mutaciones de *RLBPI* y arRP, adRP, casos aislados de RP o síndrome de Usher tipo I. En 1997, Maw *et al.* detallaron un pedigree en el cual una mutación en homocigosis (R150Q) del gen *RLBPI* cosegregaba con arRP (Maw *et al.*, 1997). Más tarde, se verificó como la mutación R234W en homocigosis causaba distrofia de Bothnia, una variante de la *Retinitis punctata albescens* (RPA) común en el norte de Suecia (Burstedt *et al.*, 1999). Estudios posteriores hallaron nuevas mutaciones en *RLBPI* responsables de arRPA (Morimura *et al.*, 1999a; Fishman *et al.*, 2004) y de la distrofia de bastones y conos de Newfoundland, una distrofia retinal de inicio temprano (Eichers *et al.*, 2002).

Las mutaciones de *RLBPI* representan ~1% de los casos de arRP (Hartong *et al.*, 2006).

I.4.2.3.4. Transportador con una cassette de unión a ATP

Símbolo: <i>ABCA4</i> (OMIM: *601691)	Proteína codificada: 50 exones, 2274 a.a.
Otros alias: <i>ABCR</i>	Función: Transporte de retinoides
Región cromosómica: 1p22.1	Especificidad de tejido: Retina
Posición: 94230982-94359293	Localización subcelular: Membrana
Patologías asociadas: arRP, arFFM, arSTGD, arARMD, arCORD	Propiedades: Flipasa fosfolipídica

La búsqueda del gen responsable de la enfermedad de Stargardt (STGD) consiguió delimitar una región candidata en la región 1p13-p21 (Kaplan *et al.*, 1993). Poco tiempo después, la localización

de otro locus para *fundus flavimaculatus* (FFM) en 1p13, sugirió que STGD y FFM con distrofia macular podrían ser el resultado de mutaciones alélicas de un mismo locus o implicar a genes contiguos de la región 1p13 (Gerber *et al.*, 1995). La cosegregación de arRP con un nuevo locus situado dentro de la región 1p13-p21 reafirmó la posibilidad de heterogeneidad alélica (Martínez-Mir *et al.*, 1997a).

El hallazgo de mutaciones en *ABCA4* en individuos con distrofia macular autosómica recesiva (STGD o FFM) (Allikmets, 1997; Gerber *et al.*, 1998; Nasonkin *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 1999b; Fukui *et al.*, 2002); con ARMD (Allikmets *et al.*, 1997); con arRP (Cremers *et al.*, 1998; Martínez-Mir *et al.*, 1998; Fukui *et al.*, 2002; Klevering *et al.*, 2004a; Klevering *et al.*, 2004b) y con CORD (Cremers *et al.*, 1998; Maugeri *et al.*, 2000; Briggs *et al.*, 2001; Klevering *et al.*, 2002; Klevering *et al.*, 2004b), enfatizaron su gran heterogeneidad alélica y lo ratificaron como gen responsable de estas patologías. Posteriores estudios permitieron redefinir su localización cromosómica a 1p21-p22.1 (Nasonkin *et al.*, 1998). Este gen codifica a la proteína ABCR (o RmP; *Rim Protein*), una glicoproteína de membrana específica del borde de los discos de los segmentos externos de los bastones, cuya función está relacionada con el transporte de retinoides (Azarian y Travis, 1997; Sun y Nathans, 1997).

Otros análisis mutacionales de *ABCA4* han detectado individuos heterocigotos compuestos afectados de CORD (Cremers *et al.*, 1998), STGD (Lewis *et al.*, 1999b) o arRP (Fukui *et al.*, 2002; Klevering *et al.*, 2004b). La combinación de las posibles mutaciones causales definirá el fenotipo y la severidad de la patología (Maugeri *et al.*, 1999; Paloma *et al.*, 2002a; Klevering *et al.*, 2004a). En base a esto, se ha propuesto un modelo genotipo-fenotipo en el que la actividad de la proteína ABCR es inversamente proporcional a la severidad de la patología (Shroyer *et al.*, 1999). Según este modelo, las mutaciones que causan el truncado o la severa alteración de la estructura de la proteína originan patologías de inicio temprano que cursan con una rápida pérdida de fotorreceptores (RP o CORD). La combinación de mutaciones menos severas, ocasionaría la lenta y progresiva degeneración de los fotorreceptores secundaria a la acumulación de productos tóxicos por la menor actividad flipasa de ABCR. En este caso, los fenotipos patológicos serían relativamente más suaves (STGD y FFM). Por último, la ARMD se debería a la acumulación gradual de estos mismos productos y a la eventual pérdida de fotorreceptores. Además, ciertas mutaciones de *ABCA4* en heterocigosis podrían incrementar la susceptibilidad hacia ARMD (Allikmets *et al.*, 1997; Allikmets, 2000). Actualmente, se estima que las mutaciones de *ABCA4* son responsables del 2,9% de los casos de arRP (Daiger *et al.*, 2007).

I.4.2.3.5. Receptor acoplado a proteína G del epitelio pigmentario de la retina

Símbolo: <i>RGR</i> (OMIM: *600342)	Proteína codificada: 7 exones, 296 a.a.
Otros alias: <i>P47804</i>	Función: Receptor de todo- <i>trans</i> y 11- <i>cis</i> retinal
Región cromosómica: 10q23.1	Especificidad de tejido: RPE y células de Müller
Posición: 85994789-86008924	Localización subcelular: Membrana
Patologías asociadas: arRP, adCS	Propiedades: Fotoisomerasa

En 1993, fue identificado un putativo receptor acoplado a proteína G (RGR) a partir de una librería de cDNAs de RPE bovino (Jiang *et al.*, 1993). Este receptor, ampliamente expresado en RPE y células de Müller (Pandey *et al.*, 1994), pertenece a la familia de receptores de 7 segmentos transmembrana y presenta cierta homología con otros miembros de la familia: las opsinas (Jiang *et al.*, 1993). Sin embargo, la estructura del gen *RGR* humano no resultó ser tan similar a la de los genes de las opsinas (Shen *et al.*, 1994). Se sugirió, entonces, que *RGR* representaba la primera divergencia evolutiva de la familia de los genes de opsinas de vertebrados.

Entre las características más significativas de RGR –una opsina no visual– destacan su preferente unión a todo-*trans* retinal (Shen *et al.*, 1994; Hao y Fong, 1999) y su espectro de absorción dependiente de pH oscila entre el azul ($\lambda_{\max} \sim 469$ nm) y el ultravioleta cercano ($\lambda_{\max} \sim 370$ nm) (Hao y Fong, 1996). La irradiación de RGR con luz monocromática de 470 nm o luz ultravioleta cercana, provoca la isomerización estereoespecífica del todo-*trans* retinal a su configuración 11-*cis* (Hao y Fong, 1999). No obstante, RGR posee una esencial relevancia en la regeneración de la rodopsina, tanto en la oscuridad como en presencia de luz (Wenzel *et al.*, 2005). Se ha descrito un mRNA de *RGR* con un *skipping* del exón 6, el cual origina una variante de RGR (RGR-d; expresada en RPE y retina) caracterizada por la ausencia del sexto segmento transmembrana (Fong *et al.*, 2006). Esta isoforma, bastante común entre los humanos, puede contribuir a la progresiva desestabilización del RPE o implicarse en la degeneración de la retina, confirmándose como una de las potenciales causas de ARMD.

Un análisis mutacional en *RGR*, logró identificar un cambio aminoacídico (Ser66Arg) en homocigosis en un individuo con arRP y una inserción de una G (Gly275; GGA→GGGA) en heterocigosis en un individuo con esclerosis coroidea (CE) autosómica dominante (Morimura *et al.*, 1999b). Las mutaciones de *RGR* representan <1% de los casos de arRP (Hartong *et al.*, 2006).

I.4.3. Mantenimiento de la estructura de las células fotorreceptoras

Los segmentos externos de los fotorreceptores de vertebrados son organelas especializadas con una estructura sumamente delicada. El elevado empaquetamiento de los discos contenidos en ellos resulta vital para la visión, puesto que maximiza el área disponible para la fotorrecepción y permite la eficiente renovación de los segmentos externos. Por lo tanto, no cabe duda de que cualquier elemento implicado en la formación y mantenimiento de esta estructura tendrá una importancia crítica en el correcto desarrollo del proceso visual.

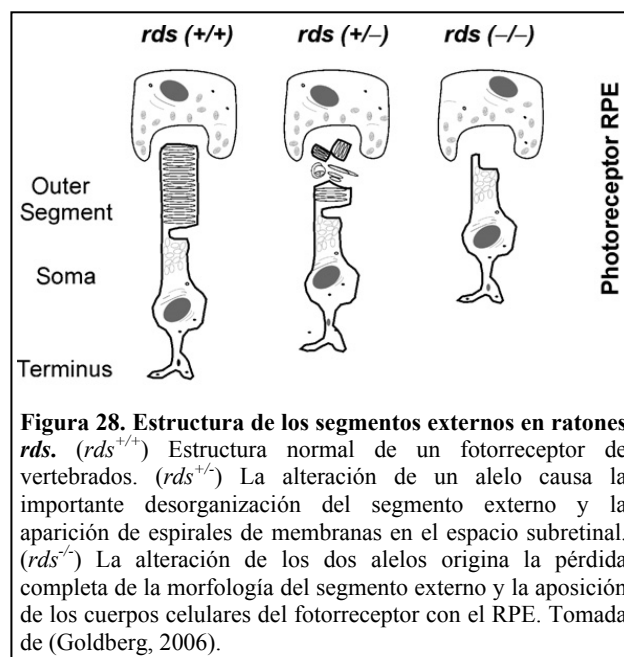
La membrana de los discos puede ser dividida en dos regiones o dominios, cada uno de los cuales presenta una composición proteica característica. En la región aplanada del disco, se encuentra mayoritariamente la opsina (rodopsina o conopsina), mientras que en el borde (laterales curvados) y las incisuras se encuentran la *periferina/rds* y la *Rom1* (Connell y Molday, 1990; Bascom *et al.*, 1992b). La rodopsina es la proteína predominante en la membrana de los discos, ocupando ~50% de su superficie. El resto, es ocupado con fosfolípidos y colesterol (Ridge y Palczewski, 2007). El alto contenido en fosfolípidos (80-90%) y bajo en colesterol (8-9%) da lugar a membranas con un alto grado de fluidez (McCull y Converse, 1995). Mutaciones en el gen de la rodopsina causan la degeneración de los fotorreceptores (Rosenfeld *et al.*, 1992) (Cideciyan *et al.*, 1998), ya que la proteína mutada se incorporaría a la membrana de los discos causando su desestabilización y la consiguiente muerte del fotorreceptor (Humphries *et al.*, 1993). La expresión de rodopsina es esencial para la formación de los segmentos externos de los bastones (Humphries *et al.*, 1997). De hecho, los bastones de los ratones *knockout* para rodopsina (*rho*^{-/-}) no presentan segmentos externos. Los ratones *rho*^{+/-} si presentan segmentos externos, aunque con cierta desorganización estructural y a medida que animal envejece, estos segmentos externos adoptan un tamaño inferior al normal. La reducción de un 30-40% en longitud y de ~20% en diámetro, permite que dichos segmentos externos conserven una densidad de rodopsina similar a la normal y mantengan su actividad fotosensible (Liang *et al.*, 2004). Sin embargo, la cantidad total de rodopsina en ambas retinas disminuye un ~43%.

Periferina/rds y *Rom1*, dos proteínas integrales de membrana presentan, además de su parecido tamaño (39 y 37 kDa, respectivamente), grandes similitudes estructurales. Ambas poseen cuatro dominios transmembrana, un dominio C-terminal citoplasmático, un largo *loop* intradiscal (~150 aminoácidos) entre el tercer y cuarto dominio transmembrana, siete residuos de cisteína altamente conservados y la ausencia de una secuencia consenso para la glicosilación ligada a N (Connell y Molday, 1990; Travis *et al.*, 1991b; Bascom *et al.*, 1992b; Moritz y Molday, 1996). Al contrario que la rodopsina, ni la *periferina/rds* ni la *Rom1* serán translocadas a la membrana del segmento externo o a la región aplanada de los discos, ya que son proteínas específicas de la región del borde (Moritz y Molday, 1996). Esto sugiere la presencia de algún tipo de señal o conformación estructural que impida su incorporación a la membrana plasmática.

Una diferencia importante entre estas dos proteínas radica en su expresión a nivel celular. Periferina/rds se expresa considerablemente en conos y en bastones, mientras que Rom1 lo hace de forma aceptable en bastones y prácticamente nula en conos. Este hecho podría ser responsable de la gran diferencia morfológica existente entre los discos de conos y bastones, al influir en el cierre de los discos de los bastones (Bascom *et al.*, 1992b). La periferina/rds representa algo menos del 5% del contenido total de proteínas del disco, lo que la convierte, por detrás de la rodopsina, en una de las proteínas más abundantes del fotorreceptor (Connell y Molday, 1990).

Periferina/rds juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura normal de la membrana de los discos de los bastones (Connell y Molday, 1990; Arikawa *et al.*, 1992; Travis *et al.*, 1992; Kedzierski *et al.*, 1996; Kedzierski *et al.*, 1998; Kedzierski *et al.*, 1999a; Kedzierski *et al.*, 1999b; Loewen y Molday, 2000; Loewen *et al.*, 2001). En ratones *rds*^{-/-} (*retinal degeneration slow*), la ausencia de periferina/rds causa la total incapacidad para constituir los segmentos externos. Sin embargo, si el defecto se presenta en heterocigosis (*rds*^{+/-}), los ratones desarrollan estructuras altamente desorganizadas constituidas por espirales de membranas (Hawkins *et al.*, 1985; Travis *et al.*, 1992; Kedzierski *et al.*, 2001) (Figura 28). Es posible que la haploinsuficiencia observada en este tipo de ratones, no consiga constituir el mayor y más complejo segmento externo de los bastones, pero si sea capaz de desarrollar el de los conos

(Cheng *et al.*, 1997). La pérdida de periferina/rds en los conos causa un evento morfogénico en el cual se produce la evaginación de la membrana plasmática, pero falla la invaginación, originando un segmento externo dismórfico desprovisto de discos (Farjo *et al.*, 2006). Aún así, estas estructuras son capaces de realizar la fototransducción a pesar de la importante reducción de sensibilidad. Esto indica que los conos solo necesitarían a la periferina/rds para producir las protuberancias en la membrana del cilio y formar los discos del segmento externo. En

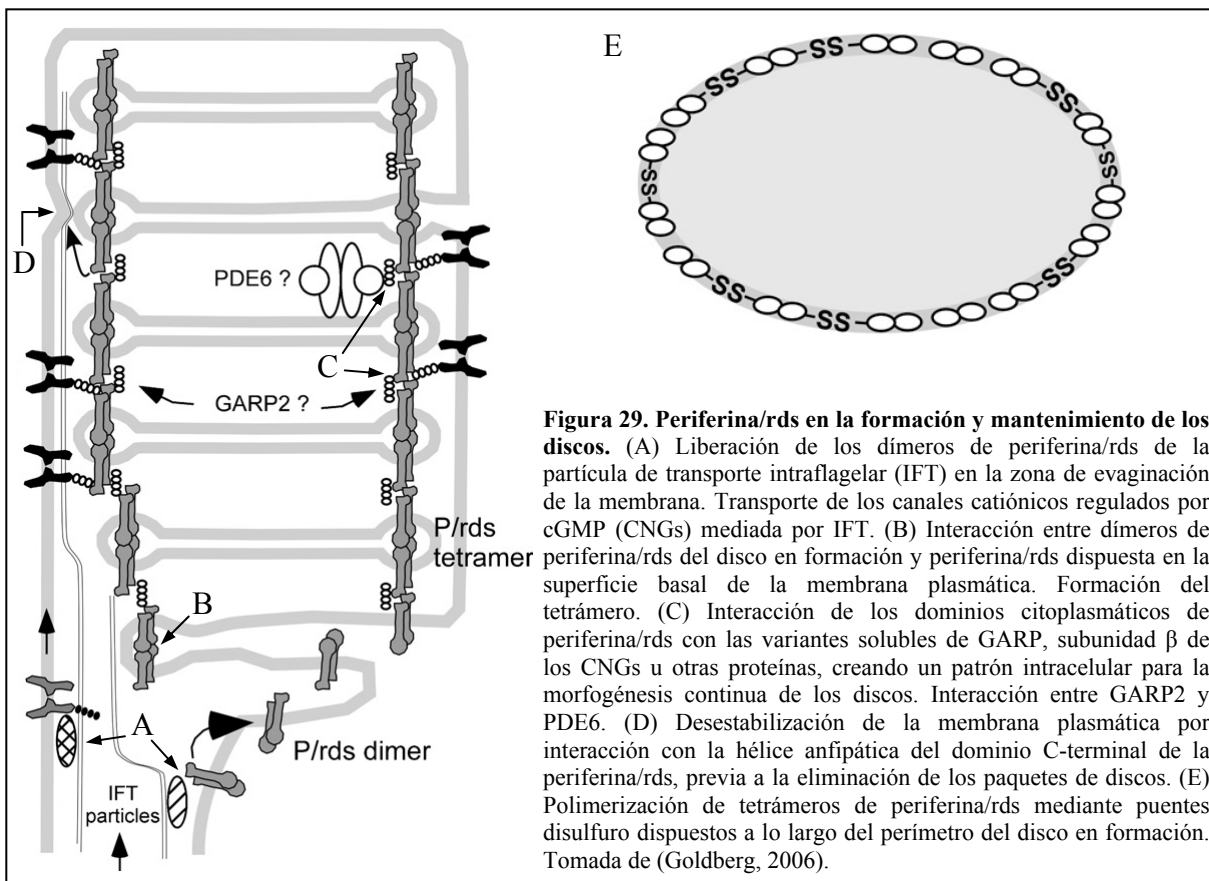


cambio, la periferina/rds poseería un mayor efecto sobre el desarrollo del segmento externo de los bastones. Su ausencia daría lugar a una alteración morfogénica severa y no se formaría el segmento externo. Estos fotorreceptores tan degradados solamente contendrían rodopsina en la punta del cilio y en el segmento interno, presentando una mínima actividad fototransductora que estimularía la degeneración del fotorreceptor.

Por su parte, Rom1 juega un papel auxiliar en la estructura del segmento externo (Clarke *et al.*, 2000b). En ausencia de Rom1, los segmentos externos de los bastones siguen presentando el

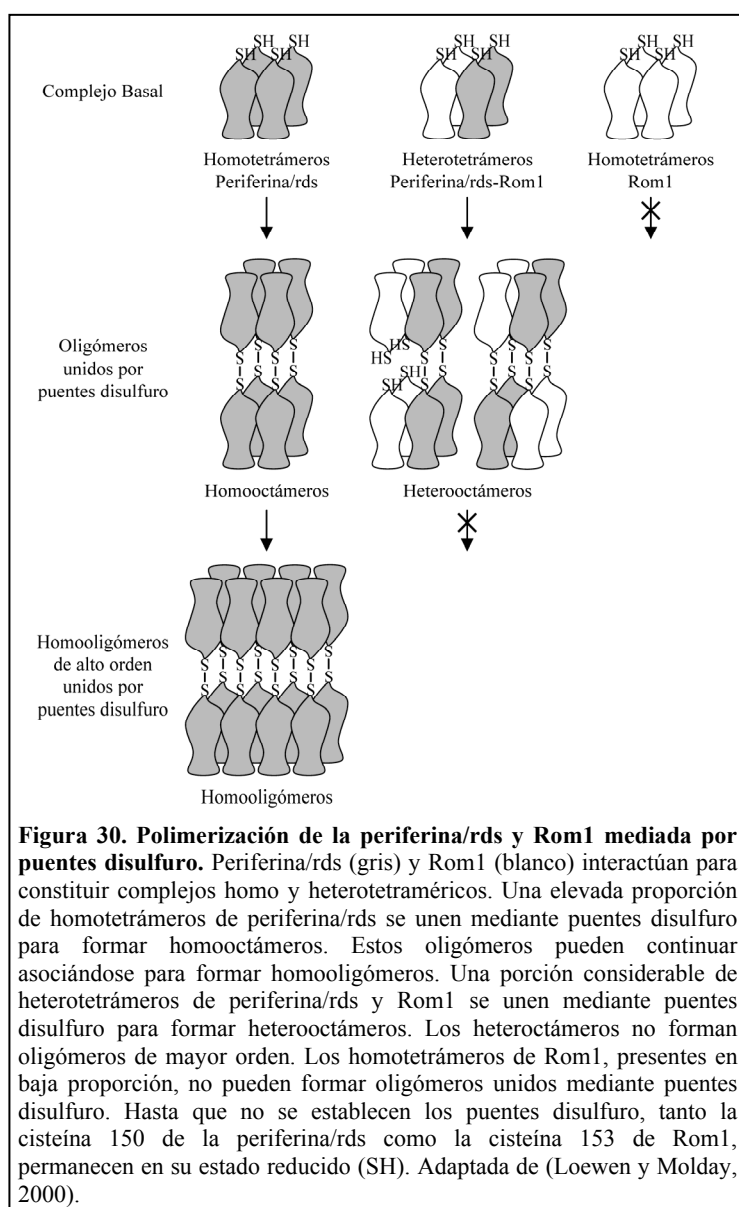
amontonamiento de discos, aunque estos poseen un diámetro superior al normal. Para poder albergarlos, el segmento debe expandirse lateralmente, provocando el aumento de la presión ejercida contra los segmentos externos adyacentes. El incremento sostenido de la presión causa una importante desorganización estructural dentro de cada segmento externo, conduciendo al fotorreceptor hacia la apoptosis.

Periferina/rds y Rom1 se asocian de forma no covalente constituyendo complejos de homodímeros y heterodímeros (Bascom *et al.*, 1992b; Wrigley *et al.*, 2000; Goldberg, 2006). Estos dímeros se unen a las partículas de transporte intraflagelar y son conducidos hacia el segmento externo a través del cilio conector (Figura 29). Una vez allí, son liberados en los lugares de evaginación de la membrana, permitiendo su incorporación al disco en formación. Los dímeros del nuevo disco interactuarán con otros dímeros de la superficie basal de la membrana plasmática del segmento externo. La dimerización no covalente de estos homo o heterodímeros constituye el tetrámero, una estructura con una importante función en la formación del borde del disco. La formación del tetrámero resulta un requisito indispensable para la correcta incorporación de la periferina/rds en las membranas de los discos recién formados (Loewen *et al.*, 2003). Durante la neogénesis de un disco, la periferina/rds (restringida a una región adyacente al cilio) se va distribuyendo por la membrana a medida que esta se expande. La repulsión de las cargas entre las moléculas de periferina/rds adyacentes de la superficie citoplasmática causa la curvatura de la membrana del disco, constituyendo



el borde (Connell y Molday, 1990). La formación del borde del disco, localización final de la periferina/rds, es un proceso secundario a la evaginación de la membrana plasmática del cilio para formar los nuevos discos (Arikawa *et al.*, 1992).

Los tetrámeros se unirán mediante puentes disulfuro formando estructuras homo o heterooctámicas (Loewen y Molday, 2000). Los homotetrámeros de periferina/rds se unen mediante el establecimiento de puentes disulfuro entre las cisteínas de la posición 150 del largo *loop* intradiscal de la proteína. En el caso de los heterotetrámeros, el puente disulfuro se establece entre la cisteína 150 de la periferina/rds y la cisteína 153 de la Rom1. Por su parte, las dos cisteínas 153 de Rom1 presentan muy baja capacidad para formar puentes disulfuro intermoleculares. Posteriormente, estos octámeros se reorganizarán en una estructura de mayor orden: los oligómeros. La periferina/rds exhibe una fuerte tendencia a formar oligómeros de varios tamaños. Sin embargo, la asociación de periferina/rds con Rom1 limita el tamaño de los oligómeros y el número de subunidades que participan en la formación



de puentes disulfuro intermoleculares. Rom1 ejerce una modulación negativa sobre la oligomerización de la periferina/rds, controlando el tamaño de los oligómeros y regulando las dimensiones de los discos durante la morfogénesis del segmento externo (Figura 30). La formación de los puentes disulfuro y la dimerización de la periferina /rds, causan las restricciones estructurales responsables de la morfología aplastada de los discos (Wrigley *et al.*, 2000) y de la formación del borde (Loewen y Molday, 2000). Además, la polimerización de tetrámeros adyacentes dispone toda una serie de sitios de anclaje a lo largo del perímetro del borde del disco (Goldberg, 2006).

La localización de la periferina/rds en el borde del disco sugiere una posible implicación de

esta proteína en el anclaje de los discos al sistema citoesquelético del fotorreceptor (Connell y Molday, 1990; Bascom *et al.*, 1992b). La interacción con el citoesqueleto se establecería a través de un dominio altamente cargado del extremo C-terminal de la periferina/rds. El extremo C-terminal posee, además, otros dos dominios funcionales: una señal de localización para el segmento externo de los bastones y una secuencia de afinidad para las incisuras; no observadas en el extremo C-terminal de Rom1 (Connell y Molday, 1990; Tam *et al.*, 2004). La secuencia de afinidad para las incisuras facultaría a la periferina/rds para incidir en su organización, generando su estabilización y/o su alineación. El anclaje de los discos a la membrana plasmática mediante estructuras filamentosas restringiría la rotación del disco y mantendría la alineación de las incisuras

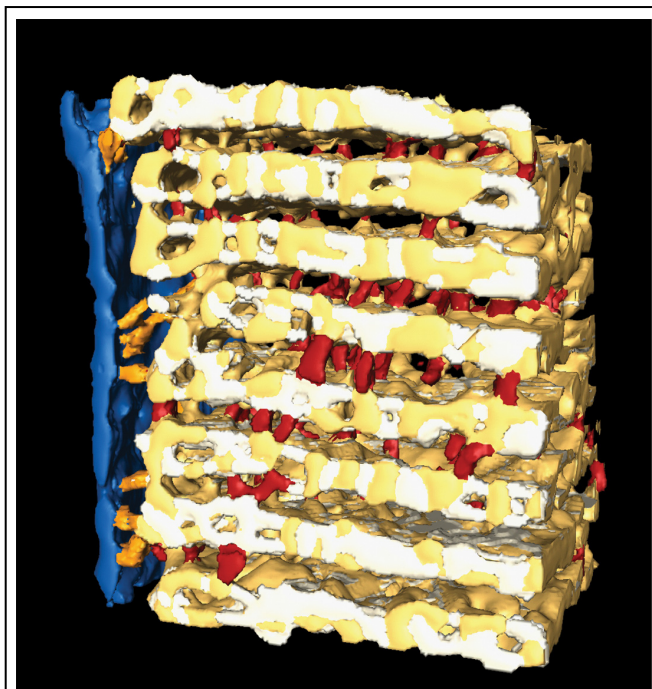


Figura 31. Representación tridimensional del segmento externo de un bastón de ratón. Fracción de 8 discos (amarillo) y la correspondiente membrana plasmática (azul). Las áreas de alta densidad (amarillo oscuro) que contienen a la rodopsina, pueden ser diferenciadas de las áreas menos densas (amarillo claro). Los espaciadores que conectan los discos adyacentes entre sí (rojo) se distribuyen por toda la superficie del disco. Los espaciadores que unen el borde del disco con la membrana plasmática han sido representados en color naranja. Las imágenes han sido obtenidas mediante tomografía crioelectrónica. Tomada de (Nickell *et al.*, 2007). <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200612010/DC1/6>.

entre los discos. Por otro lado, los discos adyacentes podrían asociarse a través de interacciones proteicas para mantener su posición relativa. Las estructuras espaciadoras que unen los discos adyacentes se encuentran distribuidas por toda la superficie del disco, puesto que si se localizasen exclusivamente en el borde y las incisuras, la región aplanada del disco no estaría lo suficientemente asentada para mantener el preciso almacenamiento de los discos (Nickell *et al.*, 2007) (Figura 31). Los espaciadores están constituidos por complejos de proteínas entre las que se incluyen la periferina/rds, Rom1 y las proteínas GARP. La interacción de periferina/rds con el dominio GARP de la subunidad β de los canales catiónicos regulados por cGMP (CNGs) tendría como resultado la formación de estructuras que adherirían los bordes de los discos a la membrana plasmática del segmento externo (Poetsch *et al.*, 2001; Batra-Safferling *et al.*, 2006) (Figura 32). Las interacciones periferina/rds-GARP-periferina/rds permitirían la asociación de los discos adyacentes y el mantenimiento de su posición relativa (Tam *et al.*, 2004). Además, las variantes solubles de las GARPs se unirían al complejo periferina/rds-Rom1, ligando el borde de los discos adyacentes (Batra-Safferling *et al.*, 2006). Recientemente, se ha demostrado la alta afinidad entre GARP2 (variante de splicing de la subunidad β de los CNGs) y PDE6 (Pentia *et al.*, 2006), asociación ya observada hacia tiempo por Körschen *et al.* (Körschen *et al.*, 1999). Esta asociación reduciría el ruido de fondo generado por la

activación espontánea de la PDE6 en la oscuridad. La posibilidad de que la función de PDE6 estuviese regulada por la asociación con GARP2 unida a periferina/rds, sugiere un papel importante de la periferina/rds en la fototransducción de los bastones. Las proteínas GARP no aparecen en conos, ni tan siquiera la de la subunidad β de los CNGs, por lo que muy probablemente este tipo de fotorreceptores poseen mecanismos alternativos para establecer y mantener la arquitectura de sus segmentos externos (Goldberg, 2006). La interacción de los dominios citoplasmáticos de la periferina/rds con variantes solubles de las proteínas GARP u otras proteínas en los conos, establecerá una pauta intracelular para la continua morfogénesis de los discos. La red de interacciones establecida durante la morfogénesis se conservará en los discos maduros, garantizando el correcto y ordenado amontonamiento de los discos.

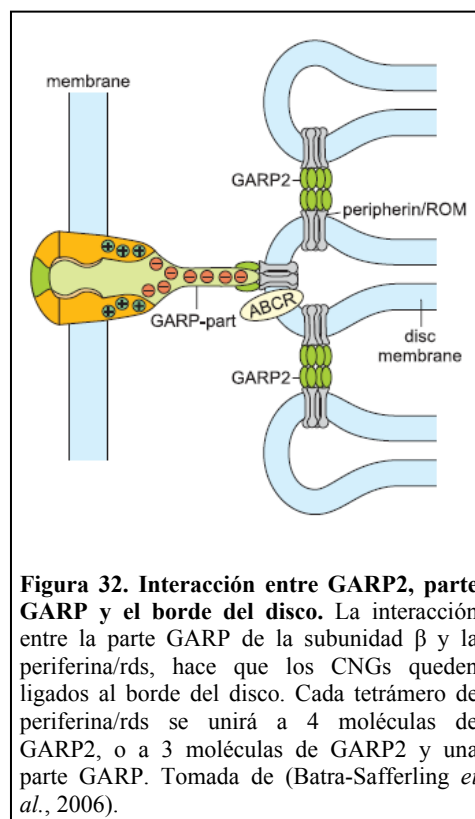


Figura 32. Interacción entre GARP2, parte GARP y el borde del disco. La interacción entre la parte GARP de la subunidad β y la periferina/rds, hace que los CNGs queden ligados al borde del disco. Cada tetrámero de periferina/rds se unirá a 4 moléculas de GARP2, o a 3 moléculas de GARP2 y una parte GARP. Tomada de (Batra-Safferling *et al.*, 2006).

En último lugar, la periferina/rds también está implicada en el mantenimiento de la longitud de los segmentos externos. La longitud de un segmento externo depende de los procesos de formación y eliminación de los discos sufridos en ese fotorreceptor. La localización del extremo C-terminal de la periferina/rds dentro del citoplasma del segmento externo permite la interacción entre el borde del disco y la membrana plasmática (Goldberg, 2006). Esta interacción promueve la fusión entre el disco y la membrana plasmática causando la eliminación de los discos envejecidos, un proceso esencial para la renovación del segmento externo (Boesze-Battaglia y Stefano, 2002). Los grupos de discos eliminados serán posteriormente fagocitados por el RPE.

La fusión entre disco y membrana plasmática facilita la renovación del segmento externo, pero ¿cómo reconoce el fotorreceptor a los discos que deben ser eliminados? En los segmentos externos de los bastones, el contenido en colesterol de las membranas de los discos disminuye a medida que envejecen (Boesze-Battaglia, 1997). Sin embargo, el contenido en fosfatidiletanolamina (PE) prácticamente no varía a lo largo de la vida del disco. El colesterol proporciona estabilidad a la bicapa de las membranas, mientras que la PE favorece las estructuras con menor radio de curvatura, desestabilizando la bicapa. El bajo contenido en colesterol que presenta un disco envejecido, no puede contrarrestar los efectos desestabilizadores ejercidos por la PE. Esto generará la desestabilización de la membrana del disco, un prerequisite para la fusión del disco con la membrana plasmática del segmento externo. Otra explicación alternativa se basa en la protección que la estructura normal de la bicapa lipídica ofrece a los lípidos contra el ataque de enzimas como las fosfolipasas o la colesterol oxidasa. Los cambios en el contenido de colesterol podrían, entonces, modular indirectamente la

actividad de estas enzimas. La baja proporción de colesterol facilitaría la acción de las citadas enzimas, provocando la desestabilización de las membranas de los discos y su fusión con la membrana plasmática.

Los eventos de fusión en los segmentos externos de los bastones son muy localizados y extraordinariamente regulados. De esta forma se evita que la fusión de los discos en un lugar no adecuado de la membrana plasmática genere un proceso anormal de renovación del segmento externo, que repercutiría considerablemente en la función del fotorreceptor (Boesze-Battaglia, 1997). La unión de GARP2 con la periferina/rds previene la fusión indiscriminada del disco con la membrana plasmática o la fusión de los bordes de dos discos adyacentes (Batra-Safferling *et al.*, 2006).

En definitiva, en el mantenimiento de la estructura de las células fotorreceptoras intervendrán tanto la rodopsina, con su función estructural secundaria, como la periferina/rds con sus múltiples acciones: guiar la morfogénesis del disco y sus bordes, alinear los amontonamientos de los discos y garantizar su aposición con la membrana plasmática, y eliminar los discos envejecidos en la parte distal del segmento externo (Goldberg, 2006). Sin embargo, es probable que la estructura de los fotorreceptores pueda estar influenciada por otras proteínas con diferentes acciones estructurales. Tal es el caso de PROML1, una proteína que origina la protrusión de la membrana en la base del segmento externo para la formación de los nuevos discos. La pérdida de función de esta proteína impediría la evaginación de la membrana, causando la alteración de la morfogénesis de los discos y la consiguiente degeneración de los fotorreceptores (Maw *et al.*, 2000). Por otro lado, PROML1 podría estar implicada en el alineamiento de los precursores de los discos recién sintetizados, un paso esencial para su biogénesis (Jaszai *et al.*, 2007).

I.4.3.1. Genes responsables de RP implicados en el mantenimiento de la estructura de los fotorreceptores

I.4.3.1.1. Periferina 2 / RDS

Símbolo: <i>PRPH2</i> (OMIM: *179605)	Proteína codificada: 3 exones, 346 a.a.
Otros alias: <i>RDS</i>	Función: Estabilización y compactación del SE
Región cromosómica: 6p21.1	Especificidad de tejido: Retina (bastones y conos)
Posición: 42772316-42798287	Localización subcelular: Membrana
Patologías asociadas: adRP, adMD, digRP con <i>ROM1</i> , adAVMD, adCACD	Propiedades: Tetraspanina

SE, Segmento Externo de los fotorreceptores.

El gen *rds* murino codifica una glicoproteína de membrana uniformemente distribuida entre de los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores (Travis *et al.*, 1991b). Su expresión coincide con la aparición de los discos, hecho que remarca la importancia de esta proteína como elemento estructural. Connell *et al.* comprobaron que la secuencia aminoacídica de la proteína *rds* murina compartía una gran homología (92,5%) con la periferina bovina, concluyendo que la periferina era el producto normal del gen *rds* (Connell *et al.*, 1991). La periferina o periferina/*rds*, es una proteína localizada a lo largo del borde de los discos de los segmentos externos de bastones y conos (Arikawa *et al.*, 1992).

Debido a la semejanza del fenotipo de los ratones *rds* (*retinal degeneration slow*) con las anomalías patológicas observadas en la RP, se procedió a la clonación y caracterización del gen *RDS* humano (Travis *et al.*, 1991a). Tras ello, se comprobó que *RDS* se expresaba en retina y se localizaba en el brazo corto del cromosoma 6. Estos autores propusieron que *RDS* podía ser un candidato de RP, pero no pudieron confirmar su hipótesis al no disponer de ningún pedigree de RP que mostrase ligamiento con el cromosoma 6. Sin embargo, Farrar *et al.* demostraron la cosegregación de RP y un locus del brazo corto del cromosoma 6 (RP6, próximo a *RDS*), en un pedigree irlandés afectado de adRP (Farrar *et al.*, 1991b). Esto motivó la búsqueda de mutaciones del gen *RDS* en otros pedigrees de adRP, hallándose varias de ellas prácticamente al mismo tiempo (Kajiwara *et al.*, 1991; Farrar *et al.*, 1991a). El análisis de ligamiento multipunto del locus RP6 –con la incorporación de marcadores intragénicos de *RDS*– evidenció un valor de LOD máximo (8,21) para *RDS* (Jordan *et al.*, 1992). La secuenciación directa de este gen determinó un cambio nucleotídico en el exón 2 (Ser212Gly), el cual cosegregaba con adRP en el pedigree irlandés (Farrar *et al.*, 1992).

Posteriores estudios de *RDS*, revelaron nuevas mutaciones cosegregando con adRP (Dryja *et al.*, 1997). Pero también hallaron mutaciones cosegregando con Retinitis *punctata albescens* (Kajiwara *et al.*, 1993), con distrofia macular pigmentaria en forma de mariposa (Nichols *et al.*, 1993), con

distrofia macular viteliforme del adulto (Wells *et al.*, 1993; Felbor *et al.*, 1997), con adRP asociada a maculopatía en ojo de buey (Kikawa *et al.*, 1994) o con distrofia coroidea areolar central (Yanagihashi *et al.*, 2003). Además, se ha descrito como mutaciones en *RDS*, asociadas a mutaciones en *ROM1*, dan lugar a una forma digénica de RP (Dryja *et al.*, 1997). La mutación L185P impide que la periférica/RDS forme homotetrámeros consigo misma, debiendo asociarse con ROM1 para constituir complejos heterotetraméricos estructuralmente normales (Goldberg y Molday, 1996). La presencia conjunta de L185P y una mutación nula en ROM1, impediría la correcta tetramerización de ambas proteínas (Goldberg y Molday, 1996; Loewen *et al.*, 2001). Esto causaría el descenso de los niveles de tetrámeros que contienen periférica/RDS por debajo del umbral crítico requerido para la formación y estabilización de los segmentos externos, conduciendo a la característica degeneración de fotorreceptores de la RP. Los ratones transgénicos generados por Kedzierski *et al.*, en los que se habían incluido las dos mutaciones de *RDS* y *ROM1*, sirvieron para demostrar la más rápida tasa de degeneración de los fotorreceptores presente en el modelo digénico en comparación con los modelos monogénicos dominantes (Kedzierski *et al.*, 2001).

El conjunto de las mutaciones del gen *RDS* supone un 9% de los casos de adRP (Sullivan *et al.*, 2006a).

I.4.3.1.2. Proteína de membrana del segmento externo de los bastones, 1

Símbolo: <i>ROM1</i> (OMIM: *180721)	Proteína codificada: 3 exones, 351 a.a.
Otros alias: <i>ROSP1</i>	Función: Estabilización y compactación del SE
Región cromosómica: 11q12.3	Especificidad de tejido: Retina (bastones)
Posición: 62137199-62139164	Localización subcelular: Membrana
Patologías asociadas: adRP, digRP con RDS	Propiedades: Forma homo- heterodímeros con RDS

Bascom *et al.* localizaron el gen *ROM1* humano en la región q13 del cromosoma 11 (Bascom *et al.*, 1992a). Este gen codifica una proteína con 4 dominios transmembrana localizada en el borde de los discos de los segmentos externos de los bastones (Bascom *et al.*, 1992a). La proteína ROM1, resulta indispensable en la regulación de la morfogénesis de los discos y en la viabilidad de los bastones de mamíferos (Clarke *et al.*, 2000a). De hecho, en ratones *Rom1*^{-/-}, los discos poseen un diámetro superior al normal, los segmentos externos están altamente desorganizados y los bastones mueren lentamente por apoptosis. Por otro lado, ROM1 juega un papel importante en el proceso de renovación del segmento externo, puesto que potencia los procesos específicos de fusión entre la membrana de los discos y la plasmática (Boesze-Battaglia *et al.*, 2007).

Aunque han sido encontradas mutaciones en *ROMI* cosegregando con adRP (Sakuma *et al.*, 1995; Martínez-Mir *et al.*, 1997b), la patogenicidad de alguna de ellas ha sido cuestionada (Martínez-Mir *et al.*, 1997b). Descontando las formas de RP digénica que involucran a *RDS* y *ROMI*, el porcentaje de casos de adRP explicados por las mutaciones en *ROMI* resulta inferior al 1% (Sullivan *et al.*, 2006a).

I.4.3.1.3. Prolinina, 1

Símbolo: <i>PROM1</i> (OMIM: *180721)	Proteína codificada: 27 exones, 865 a.a.
Otros alias: <i>PROMLI</i>	Función: Morfogénesis de los discos
Región cromosómica: 4p15.32	Especificidad de tejido: <i>Stem Cells</i> , retina, cerebro...
Posición: 15578955-15686664	Localización subcelular: Membrana
Patologías asociadas: arRP con MD	Propiedades: Proteína glicosilada

La proteína Prolinina posee un dominio N-terminal extracelular, cinco segmentos transmembrana flanqueados por dos pequeños *loops* citoplasmáticos y dos grandes *loops* extracelulares glicosilados y un dominio C-terminal citoplasmático (Miraglia *et al.*, 1997; Weigmann *et al.*, 1997). En ratones, Prolinina (*prom*) se encuentra asociada a las protusiones microvillosas de la superficie apical de las células neuroepiteliales, pudiendo interactuar con su citoesqueleto de actina (Weigmann *et al.*, 1997). La Prolinina humana (*PROM1*) fue inicialmente identificada como un receptor antigénico (AC133) de células madre hematopoiéticas y células progenitoras, sugiriendo un posible rol de esta proteína en hematopoesis o diferenciación celular (Miraglia *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997). AC133 también se expresaba en dos líneas celulares de retinoblastoma y en una de teratocarcinoma (Yin *et al.*, 1997), además de su expresión normal en retina (Miraglia *et al.*, 1997; Weigmann *et al.*, 1997). La interesante presencia de transcritos de *PROM1* en retina, fue achacada a la capacidad de las células ganglionares para regenerar los axones (Miraglia *et al.*, 1997). De hecho, *PROM1* se concentra selectivamente en las protusiones de las membranas plasmáticas de las células no epiteliales, debido a su interacción con el citoesqueleto de actina (Weigmann *et al.*, 1997; Corbeil *et al.*, 1999). En la retina, *PROM1* se localiza en la región de protusión de membrana de la base de los segmentos externos de los bastones, implicándose en la morfogénesis de los discos (Maw *et al.*, 2000). *PROM1* también se encuentra en los conos, pero distribuida a lo largo de todo el segmento externo (Jaszai *et al.*, 2007).

Mutaciones en el gen *PROM1*, ocasionan un tipo de degeneración de la retina autosómica recesiva (Maw *et al.*, 2000) o arRP severa acompañada de degeneración macular (Zhang *et al.*, 2007).

I.4.4. Factores de transcripción de los fotorreceptores

A través de un complejo proceso de determinación, migración y diferenciación, las células multipotenciales del neuroepitelio darán lugar a la retina adulta (Adler, 1993; Cepko *et al.*, 1996). Este proceso involucra a toda una jerarquía de factores de transcripción, cuya función consiste en regular la expresión de genes esenciales para la formación de la retina. Tres de estos factores de transcripción, CRX, NRL y NR2E3, controlan la expresión de genes específicos de los fotorreceptores (Phelan y Bok, 2000). CRX se expresa en todos los precursores de los fotorreceptores (Chen *et al.*, 1997) y resulta fundamental para el mantenimiento de los fotorreceptores de mamíferos (Freund *et al.*, 1997). Además, CRX establece una asociación sinérgica con NRL sobre la regulación de la actividad del promotor del gen *RHO* (Chen *et al.*, 1997). NRL se expresa únicamente en bastones (Swain *et al.*, 2001) y regula positivamente la actividad de los promotores de ciertos genes de la retina, como *RHO* (Kumar *et al.*, 1996; Rehemtulla *et al.*, 1996) y *PDE6B* (Lerner *et al.*, 2001), generando un incremento de la producción de sus proteínas. La implicación de NRL en la regulación de los genes de los fotorreceptores, junto con los altos niveles de expresión de esta proteína en la retina adulta, ponen de manifiesto su gran relevancia en el control de la función retinal (Rehemtulla *et al.*, 1996). CRX también regula la expresión en los fotorreceptores de NR2E3, un receptor nuclear perteneciente a la familia de los factores de transcripción (Kobayashi *et al.*, 1999). NR2E3 determinaría el fenotipo del fotorreceptor durante la retinogénesis humana (Haider *et al.*, 2000). Por un lado, NR2E3 activaría los genes específicos de los bastones junto con CRX, NRL y otras proteínas. Y, por otro lado, reprimiría la transcripción de genes específicos de los conos en los bastones que se están diferenciando (Cheng *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2004) y (Chen *et al.*, 2005).

La pérdida de funcionalidad de cualquiera de estos tres factores de transcripción impediría la correcta diferenciación de las células fotorreceptoras, induciéndolas a la degeneración. En el caso de CRX, la pérdida de función originaría retinas en las cuales no existen segmentos externos de los fotorreceptores. La completa pérdida de función de NRL y NR2E3 no permitiría suprimir los genes de los conos y activar a los de los bastones, causando la alteración del desarrollo de los bastones (Gire *et al.*, 2007).

I.4.4.1. Genes responsables de RP implicados en la transcripción

I.4.4.1.1. Factor de transcripción de conos y bastones con caja homeótica de tipo Otx

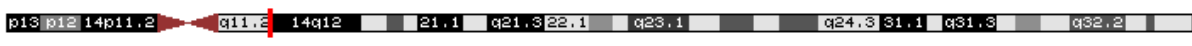
Símbolo: <i>CRX</i> (OMIM: +602225)	Proteína codificada: 4 exones, 299 a.a.
Otros alias: <i>CORD2</i>	Función: Mantenimiento del fotorreceptor
Región cromosómica: 19q13.32	Especificidad de tejido: Retina, glándula pineal
Posición: 53016911-53038393	Localización subcelular: Núcleo
Patologías asociadas: adCORD, arLCA, adLCA, adRP	Propiedades: Interactúa con SCA7

El gen *CRX*, localizado en 19q13.3, codifica un factor de transcripción –con un homeodominio similar al de OTX1 y OTX2, requeridas para el normal desarrollo del ojo– que resulta esencial para la diferenciación de los fotorreceptores (Freund *et al.*, 1997; Furukawa *et al.*, 1997). La conservada expresión de *CRX* en fotorreceptores completamente diferenciados, sugiere una importante función de mantenimiento relacionada con la morfogénesis de nuevos discos en el segmento externo (Freund *et al.*, 1997). *CRX* controla la biogénesis del segmento externo y la renovación de los discos mediante la regulación de la expresión de algunas proteínas del segmento externo, tales como rodopsina, conopsina, IRBP, PDEβ y arrestina (Chen *et al.*, 1997; Freund *et al.*, 1997; Furukawa *et al.*, 1997). *In vitro*, *CRX* actúa sinérgicamente con *NRL* en la transactivación del promotor de la rodopsina (Chen *et al.*, 1997). La interacción sinérgica de *CRX* con *QRX*, un nuevo gen homeobox localizado en 19p13.3, provoca el incremento de la función transactivadora de *CRX* y *NRL* (Wang *et al.*, 2004). Aparte de la regulación de genes específicos de los receptores, *CRX* también regula la expresión de genes específicos de la glándula pineal con relevancia en el control del ritmo circadiano (Li *et al.*, 1998). Ratones *Crx*^{-/-} muestran un desajuste del ritmo circadiano (Furukawa *et al.*, 1999), además de una gran alteración de los terminales sinápticos y un bloqueo de la morfogénesis de los segmentos externos (Morrow *et al.*, 2005).

Mutaciones en *CRX* han sido asociadas a adCORD (Swain *et al.*, 1997; Freund *et al.*, 1997; Sohocki *et al.*, 1998), arLCA (Freund *et al.*, 1998; Swaroop *et al.*, 1999), adLCA (Sohocki *et al.*, 1998; Rivolta *et al.*, 2001) y adRP (Sohocki *et al.*, 1998). No está totalmente confirmado si la mutación R41Q localizada por Sohocki *et al.* cosegrega realmente con adRP, puesto que dicha mutación había sido previamente hallada en una familia con adCORD (Swain *et al.*, 1997). En estudios posteriores Rivolta *et al.* volvieron a encontrar la mutación R41Q en un individuo con adRP (Rivolta *et al.*, 2001).

Las mutaciones del gen *CRX* son responsables de <1% de los casos de adRP (Sullivan *et al.*, 2006a) y del 0,6% de los casos de LCA (Hanein *et al.*, 2004).

I.4.4.1.2. Factor de transcripción neuroretinal con cremallera de leucina



Símbolo: <i>NRL</i> (OMIM: +162080)	Proteína codificada: 3 exones, 237 a.a.
Otros alias: <i>DI4S46E</i>	Función: Desarrollo del fotorreceptor
Región cromosómica: 14q11.2	Especificidad de tejido: Retina neural
Posición: 23619156-23623672	Localización subcelular: Núcleo
Patologías asociadas: adRP, arCPRD	Propiedades: Interactúa con FIZ1

En 1992, Swaroop *et al.* identificaron a *NRL* (*Neural Retina Leucine Zipper*), un gen específicamente expresado en todas las capas de neuronas de la retina, pero con los mayores niveles de expresión en los fotorreceptores (Swaroop *et al.*, 1992). La localización cromosómica inicial de *NRL* se determinó mediante hibridación *in situ*, ubicándolo en la región 14q11.1-q11.2 (Yang-Feng y Swaroop, 1992). Posteriormente esta región se redefinió a 14q11.2 (Farjo *et al.*, 1997). La proteína *NRL* presenta dos diferentes dominios (Swaroop *et al.*, 1992). En la mitad N-terminal de la proteína, se encuentra el dominio de transactivación. Y en la C-terminal, el dominio de unión a DNA (bZIP), el cual está constituido por una serie de aminoácidos básicos implicados en la unión al DNA y un motivo de dimerización de tipo cremallera de leucina. *NRL* está presente en el núcleo de los bastones en desarrollo y en el de los maduros, pero no se puede apreciar en el de los conos (Swain *et al.*, 2001). De lo cual se infiere una probable implicación de *NRL* en la regulación de la expresión de genes específicos de los bastones, imprescindible para el desarrollo y diferenciación de estas células fotorreceptoras (Rehemtulla *et al.*, 1996; Mears *et al.*, 2001; Swain *et al.*, 2001).

La interacción entre la cremallera de leucina de *NRL* y el homeodominio de *CRX*, potencia sinérgicamente la transactivación del promotor del gen de la rodopsina (Mitton *et al.*, 2000). Sin embargo, tanto *NRL* (Rehemtulla *et al.*, 1996) como *CRX* (Chen *et al.*, 1997), pueden provocar la transactivación de este promotor por sí solos, sin necesidad de ninguna interacción sinérgica. *NRL* y *CRX* también son requeridos para la completa activación del promotor del gen *PDE6A* (Pittler *et al.*, 2004). Ratones *Nrl*^{-/-} muestran una pérdida completa de la función de los bastones y una función de los conos superior a la normal, equivalente a la del síndrome de incremento de conos-S (ESCS) en humanos (Mears *et al.*, 2001).

Mutaciones en *NRL* cosegregan con adRP (Bessant *et al.*, 1999b; Martínez-Gimeno *et al.*, 2001; DeAngelis *et al.*, 2002; Nishiguchi *et al.*, 2004) o con un subtipo de arRP denominado degeneración pigmentaria agrupada de la retina (arCPRD) (Nishiguchi *et al.*, 2004). Actualmente, las mutaciones de *NRL* representan <1% de los casos de arRP y de arRP (Sullivan *et al.*, 2006a).

I.4.4.1.3. Receptor nuclear de la subfamilia 2 grupo E3

Símbolo: <i>NR2E3</i> (OMIM: *604485)	Proteína codificada: 8 exones, 410 a.a.
Otros alias: <i>PNR</i>	Función: Mantenimiento del fotorreceptor
Región cromosómica: 15q23	Especificidad de tejido: Retina (fotorreceptores)
Posición: 69889948-69897651	Localización subcelular: Núcleo
Patologías asociadas: arRP, adRP, arESCS, GFS, arCPRD	Propiedades: Varias isoformas de la proteína

NR2E3 codifica un receptor nuclear específico de los fotorreceptores, perteneciente a la familia de los factores de transcripción dependientes de ligando (Kobayashi *et al.*, 1999). Inicialmente, la posición cromosómica de este gen se asignó a 15q24. La restringida localización de *NR2E3* a los fotorreceptores, indicó su posible implicación en la regulación de la diferenciación y mantenimiento de estas células. La expresión de *NR2E3* en los bastones en desarrollo, junto con la represión que ejerce sobre la expresión de genes específicos de los conos en los bastones, hacen que *NR2E3* posea una esencial relevancia en la diferenciación de los fotorreceptores (Chen *et al.*, 2005). Por otro lado, *NR2E3* puede interactuar sinérgicamente con *NRL* y *CRX* en la activación de los promotores de genes específicos de los bastones, regulando su expresión durante el proceso de diferenciación (Cheng *et al.*, 2004).

Mutaciones en *NR2E3* podrían alterar el programa genético que controla las proporciones y topografía de los tres tipos de conos en la retina, ocasionando el fenotipo ESCS (Síndrome de incremento de conos S) (Haider *et al.*, 2000). El estudio postmortem de una retina con ESCS, reveló un patrón anormal de los fotorreceptores (Milam *et al.*, 2002). Esta retina mostraba la total ausencia de bastones y el doble de la densidad normal de conos, de entre los cuales el 92% eran del tipo S y la mitad de los restantes coexpresaban las opsinas L o M con la S. El incremento de la proporción de conos S, genera una ganancia de función que se traduce en una mayor sensibilidad hacia la luz azul (Haider *et al.*, 2000). Sin embargo, los individuos afectados presentan pérdida de visión, ceguera nocturna desde edades tempranas, diferentes grados de visión mediada por los conos M y L y degeneración de la retina. Esta última, puede presentarse en un amplio rango de categorías que comprende desde la forma más leve hasta la más severa, el Síndrome de Goldmann-Favre (GFS).

Además de las mutaciones de *NR2E3* relacionadas con ESCS (Haider *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2004), han sido identificadas otras mutaciones en este gen que causan arRP (Gerber *et al.*, 2000), arCPRD (Sharon *et al.*, 2003a), GFS (Sharon *et al.*, 2003a) o adRP (Coppieters *et al.*, 2007).

Mutaciones en *NR2E3* explican <1% de los casos de arRP (Hartong *et al.*, 2006) y un 1-2% de los casos de adRP (Gire *et al.*, 2007).

I.4.5. Interacciones celulares

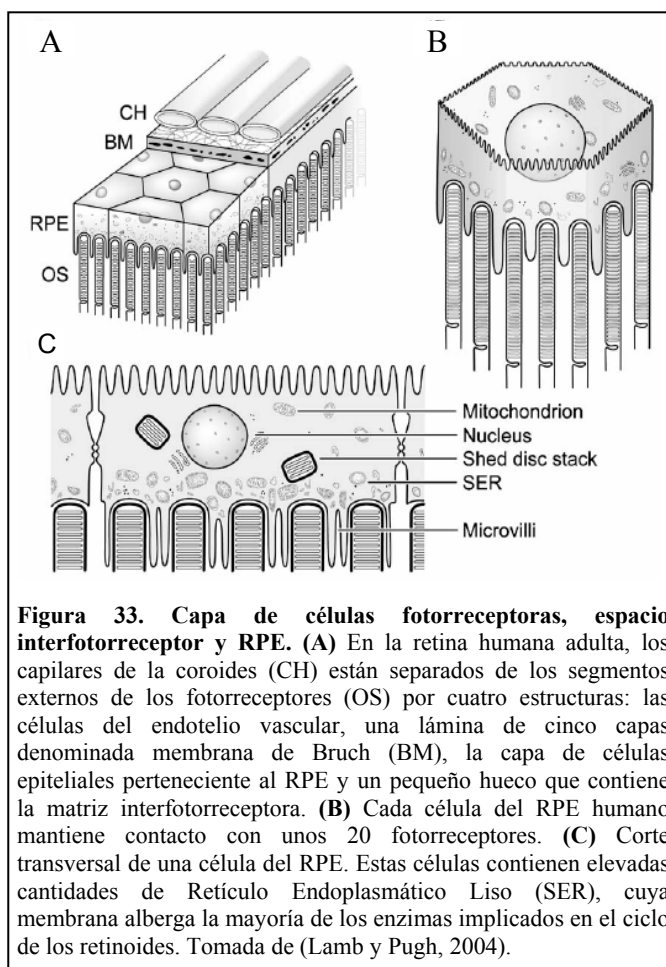
Las células que conforman la retina establecen interacciones entre ellas o con células de tejidos colindantes para mantener su función y su integridad estructural. Cualquier alteración en estos mecanismos de interacción causaría la degeneración de la retina. En ocasiones, mutaciones de genes expresados exclusivamente en los bastones (como la rodopsina) provocan distrofias que se complican con la muerte postergada de los conos vecinos (Cideciyan *et al.*, 1998; Banin *et al.*, 1999). Independientemente de la mutación, las vías de degeneración de los bastones conducen hacia la apoptosis (Portera-Cailliau *et al.*, 1994; Travis, 1998; Dunaief *et al.*, 2002; Rohrer *et al.*, 2004). En cuanto a los conos, no se conoce íntegramente el mecanismo degenerativo secundario responsable de su muerte, pero todo parece indicar que es inducido a través de interacciones celulares (Wong, 1997; Banin *et al.*, 1999; Mohand-Said *et al.*, 2001). Los fotorreceptores podrían estar protegidos de la degeneración gracias a la acción de factores celulares de supervivencia (Lavail *et al.*, 1998). En condiciones normales, los bastones liberarían RdCVF, un factor trófico esencial para la viabilidad de los conos (Mohand-Said *et al.*, 1998; Leveillard *et al.*, 2004). La muerte de los bastones causaría el cese de la liberación de RdCVF, con lo cual los conos dejarían de estar protegidos contra la degradación. El rescate de los fotorreceptores también podría estar mediado por las células de Müller, a través de la liberación de un factor secundario o un mecanismo de contacto celular (Harada *et al.*, 2000; Zack, 2000).

Las interacciones entre los fotorreceptores, las células de Müller y las células ganglionares también son determinantes para la retina. *CRB1* –un gen implicado en el establecimiento de la polaridad de las células (den Hollander *et al.*, 1999a)– mantiene las uniones adherentes entre los fotorreceptores y las células de Müller (Mehalow *et al.*, 2003), previniendo la deslaminación de la capa de células fotorreceptoras y la muerte de las neuronas de la retina (van de Pavert *et al.*, 2004; Meuleman *et al.*, 2004). Mutaciones en *CRB1* dan lugar a la aparición de una retina más gruesa, caracterizada por un patrón inmaduro de laminación de las capas constitutivas, que recuerda a la retina fetal (Jacobson *et al.*, 2003). Después de la deslaminación de la capa de fotorreceptores, se produce la muerte de las neuronas de las capas nucleares interna y externa, con la consiguiente degeneración retinal (van de Pavert *et al.*, 2004).

Las neuronas y las células de la glía establecen interacciones que involucran a la proteína USH2A, también conocida como usherina (Eudy *et al.*, 1998). USH2A presenta dos variantes de splicing (van Wijk E. *et al.*, 2004). Una de pequeño tamaño, catalogada como una proteína extracelular (Eudy *et al.*, 1998; Weston *et al.*, 2000; Bhattacharya *et al.*, 2002), y otra de ~600 kDa que está anclada a la membrana. La variante corta –expresada en diversos tejidos– está implicada en el desarrollo y estabilización de las sinapsis y resulta crítica para la homeostasis de la retina (Eudy *et al.*, 1998; Bhattacharya *et al.*, 2002). Normalmente, esta variante se encuentra asociada a colágeno tipo IV en la membrana basal (Bhattacharya *et al.*, 2004). La variante larga es la forma predominante de

usherina en la retina y se expresa específicamente en los fotorreceptores. En mamíferos, usherina se localiza en un microdominio de la membrana físicamente restringido al hueco semicircular apical del segmento interno que rodea el cilio conector. Usherina interactuaría con las proteínas de superficie de las protrusiones de membrana adyacentes y/o la superficie del cilio conector, sentando las bases de su función en el mantenimiento a largo plazo del fotorreceptor (Liu *et al.*, 2007). Defectos en cualquiera de las dos variantes provocan la degeneración de los fotorreceptores.

La interacción entre los fotorreceptores y el RPE también presenta gran relevancia en el mantenimiento de la integridad de la retina. Las uniones estrechas que se establecen entre las células del RPE constituyen una barrera contra el paso de sustancias, protegiendo a la retina de cualquier posible elemento agresor difundido por la circulación coroidea (Lamb y Pugh, 2006) (Figura 33). De hecho, el RPE representa una parte de la barrera hemato-encefálica al instaurar la barrera hemato-retiniana. Aparte de esta función protectora, el RPE está implicado en otras muchas funciones, entre las que destacan: la adhesión de la retina a la coroides subyacente, el transporte activo de materiales desde los capilares coroideos hasta los fotorreceptores, el mantenimiento de la composición de la matriz interfotorreceptora, el reciclado de los retinoides, la absorción –por parte de los gránulos de melanina– de los fotones no captados por los pigmentos visuales y la fagocitosis de las puntas envejecidas de los segmentos externos de los fotorreceptores (Kivela y Uusitalo, 1998; Lamb y Pugh, 2004).



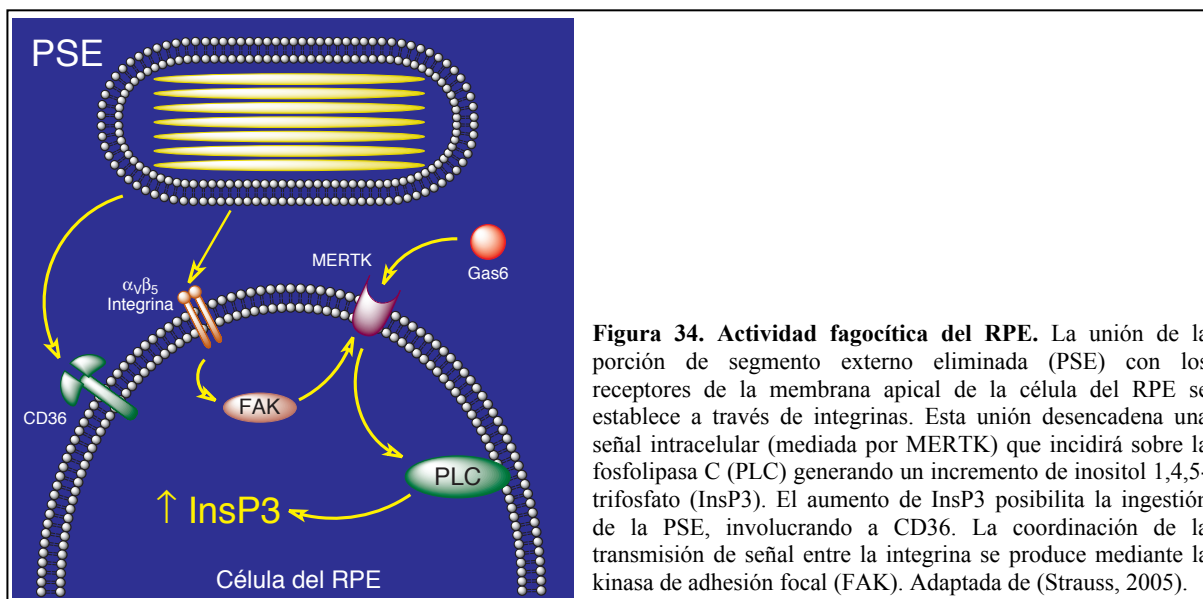
Los segmentos externos son compartimentos especializados repletos de discos, los cuales albergan la mayor parte de la maquinaria molecular necesaria para la fototransducción. Dichos discos son renovados constantemente, incorporándose los recién sintetizados a la base del segmento externo, al mismo tiempo que se eliminan los más antiguos (en grupos de 10 a 30 unidades) cuando alcanzan la parte apical. Esto provoca el desplazamiento de los discos a lo largo del segmento externo, generando el recambio total de este compartimento cada 10 días (Young, 1967; Young, 1971). El proceso de renovación resulta esencial para la visión y se cree que fomenta la supervivencia de los fotorreceptores

y de las células del RPE (Mukherjee *et al.*, 2007). Los grupos de discos eliminados son fagocitados por el RPE, que se encarga de reciclar los retinoides y los lípidos de membrana a la célula fotorreceptora (Young y Bok, 1969; Bibb y Young, 1974). La interacción coordinada de los fotorreceptores y el RPE regulará la longitud de los segmentos externos, así como la correcta estructura del fotorreceptor para la percepción de la luz (Strauss, 2005). Aquellas mutaciones que trastornan esta interacción podrían alterar la longitud normal de los segmentos externos –haciendo que estos fuesen más largos o más cortos– lo que conduciría a la degeneración de la retina (Travis, 1998).

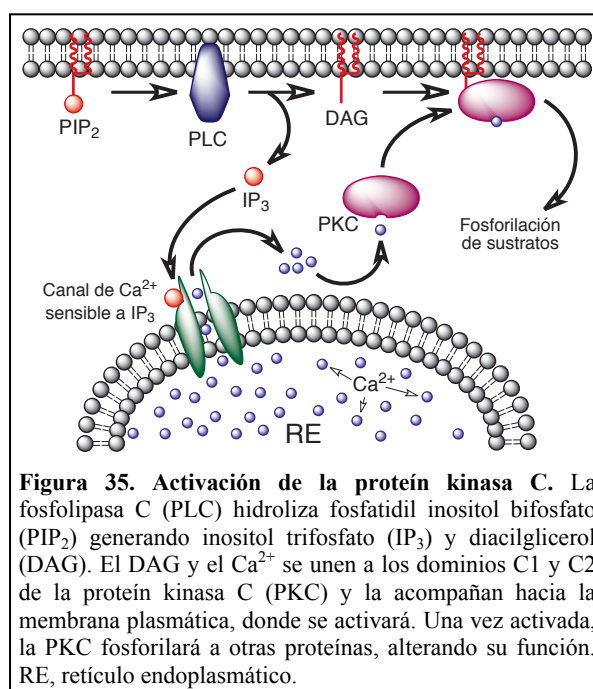
En la retina humana cada célula del RPE está en contacto con un promedio de 23 fotorreceptores (22 bastones y un cono en la retina ecuatorial y 23 conos en la fovea) (Gao y Hollyfield, 1992). Las porciones distales de los segmentos externos, desprendidas como resultado del proceso continuo de renovación, serán fagocitadas por las células del RPE. El proceso de fagocitosis de los segmentos externos presenta tres etapas (Heth y Schmidt, 1992). En la primera, se produce la interacción extracelular, y consiguiente unión específica, de la porción desprendida del segmento externo con los receptores de las membranas apicales de las células del RPE (Hall y Abrams, 1987). Esta unión parece estar mediada por los receptores de $\alpha_v\beta_5$ -integrina (Finnemann *et al.*, 1997; Miceli *et al.*, 1997; Finnemann y Rodríguez-Boulan, 1999; Zhao *et al.*, 1999; Finnemann y Silverstein, 2001; Finnemann, 2003), siendo imprescindible su previa activación por la proteína quinasa C (Lewis *et al.*, 1996; Finnemann y Rodríguez-Boulan, 1999). La $\alpha_v\beta_5$ -integrina es necesaria para la unión, pero no para la internalización del segmento externo (Finnemann *et al.*, 1997).

En la segunda etapa, el receptor tirosín quinasa c-mer (MERTK) traduce la unión específica segmento externo – RPE en la activación de una cascada de señalización que facilitará su ingestión (Hall y Abrams, 1987; Heth y Marescalchi, 1994; McLaughlin *et al.*, 1994; Hall *et al.*, 1996; Hall *et al.*, 2001). La activación de los receptores de $\alpha_v\beta_5$ -integrina no sólo es esencial para la unión del segmento externo, sino que también es importante para la activación de MERTK. La interacción de los receptores de $\alpha_v\beta_5$ -integrina y los de MERTK durante la iniciación de la fagocitosis está mediada por la activación de una quinasa de adhesión focal (*Focal Adhesion Kinase*, FAK) (Finnemann, 2003). Así, el segmento externo unido a los receptores de $\alpha_v\beta_5$ -integrina activaría a la FAK, la cual fosforilaría a MERTK, activando la consiguiente cascada de señalización. Si ambos tipos de receptores ($\alpha_v\beta_5$ -integrina y MERTK) están implicados en la unión y reconocimiento del segmento externo, entonces, se requerirá la presencia de proteínas adicionales para la ejecución de este proceso. El receptor de $\alpha_v\beta_5$ -integrina reconoce, predominantemente, a la vitronectina (Panetti *et al.*, 1995; Miceli *et al.*, 1997). No obstante, ensayos *in vitro* sobre fagocitosis de los segmentos externos, reflejan que la vitronectina –por si misma– no varía la capacidad de fagocitosis (Finnemann *et al.*, 1997). Por lo tanto, es muy probable que otras proteínas de superficie de los segmentos externos se unan a la $\alpha_v\beta_5$ -integrina mediando el proceso de fagocitosis. En cuanto al receptor MERTK, este presenta una elevada especificidad hacia Gas6 (*Growth-arrest-specific protein 6*). Gas6 es requerida para la correcta fagocitosis de los segmentos externos (Hall *et al.*, 2001; Hall *et al.*, 2002). Sin embargo, la

interacción entre los receptores de fagocitosis, las proteínas intermediarias y los segmentos externos no está totalmente establecida.



La presencia del receptor MERTK es relevante en el proceso de internalización del segmento externo (Vollrath *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2002; Duncan *et al.*, 2003). De hecho, aquellas células que no presentan dicho receptor son incapaces de internalizarlo, a pesar de que puedan unirse a él (Chaitin y Hall, 1983). No obstante, cabe la posibilidad de que pueda producirse una fagocitosis inespecífica (Heth y Marescalchi, 1994). La unión del segmento externo a las células de RPE que presentan receptores de MERTK, genera un incremento de la concentración intracelular de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) (Figura 34); no evidenciado en aquellas células sin receptores de MERTK o en los casos de fagocitosis inespecífica. El incremento de IP₃ se produce por la activación de una fosfolipasa C (PLC) de la membrana plasmática de las células del RPE. Esta PLC hidroliza fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) generando diacilglicerol e IP₃. El incremento en la concentración intracelular de IP₃ también causa el aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular libre. Cuando los niveles de DAG y el Ca²⁺ alcanzan unas concentraciones adecuadas, se unirán a la proteína quinasa C y esta será translocada a la membrana plasmática, donde se activará su sitio catalítico (Figura 35). La proteína quinasa C permanecerá activada hasta que descienda la señal de activación generada por el segundo mensajero, el nivel de Ca²⁺ o la producción de



DAG por la fosfolipasa C. La activación de la cascada de señalización con IP₃ como segundo mensajero, origina un incremento del número de proteínas fosforiladas (Heth y Schmidt, 1992).

La actuación conjunta de los niveles de IP₃ y Ca²⁺ regula la fagocitosis. El incremento de los niveles de IP₃ activaría la ingestión de los segmentos externos, mientras que el incremento de los niveles de DAG y Ca²⁺ activaría la proteína quinasa C e interrumpiría la fagocitosis (Rodríguez de Turco *et al.*, 1992; Heth y Marescalchi, 1994). La incapacidad para ingerir el segmento externo mostrada por aquellas células del RPE sin receptores de MERTK, se debe a la ausencia del incremento de los niveles de IP₃. El incremento de los niveles de Ca²⁺ puede activar otro sistema de segundo mensajero mediado por cAMP, el de la fosfolipasa A₂-eicosanoides (Rodríguez de Turco *et al.*, 1992). Aunque el sistema IP₃/Ca²⁺ es elemental para el inicio de la fagocitosis, el sistema de segundo mensajero de cAMP resulta ser un importante modulador de la tasa de fagocitosis (Hall *et al.*, 1993). De hecho, un incremento en los niveles de cAMP reduciría la actividad fagocítica (Gregory *et al.*, 1994). Ambos sistemas de segundos mensajeros pueden interactuar y pueden estar regulados por la serotonina vía proteína quinasa C (Osborne *et al.*, 1993; Nash y Osborne, 1995; Nash *et al.*, 1997).

La fagocitosis de los segmentos externos también está regulada por ritmos circadianos (Lavail, 1976; Young, 1978; O'Day y Young, 1978; Besharse y Hollyfield, 1979; Lavail, 1980; Flannery y Fisher, 1984), encontrando el pico máximo de esta actividad inmediatamente después de la exposición a la luz (Teirstein *et al.*, 1980). El complejo patrón de la regulación circadiana sobre la eliminación y fagocitosis de los segmentos externos presenta diferencias entre conos y bastones (Nguyen-Legros y Hicks, 2000). La eliminación de los segmentos externos de los conos difiere unas 10-16 horas de la eliminación de los segmentos externos de los bastones y está principalmente restringida al primer estadio de la fase oscura (la noche). No obstante, en ambos tipos de fotorreceptores, este control depende de un reloj circadiano de la retina (Cahill y Besharse, 1993), pero no está totalmente establecido como este reloj interviene en el inicio de la fagocitosis (Nguyen-Legros y Hicks, 2000). Es muy probable que la coordinación entre el reloj circadiano y la fagocitosis pueda deberse a un transmisor, la dopamina (Besharse y Spratt, 1988; Nguyen-Legros y Hicks, 2000). De hecho, la regulación negativa de la fagocitosis debida al incremento de los niveles de cAMP (Hall *et al.*, 1993) y la intervención de receptores de dopamina en la activación de la adenilato ciclasa, sugieren que la regulación circadiana puede ser mediada por el sistema dopamina/melatonina (Reme *et al.*, 1986; Cahill y Besharse, 1993; Nguyen-Legros y Hicks, 2000; Nir *et al.*, 2002). En este sentido, se ha podido comprobar un nuevo rol de los receptores de integrinas. Aquellos ratones que han perdido los receptores de $\alpha_v\beta_5$ -integrina, presentan una alteración de la sincronización de la fagocitosis de los segmentos externos y no muestran el máximo de fagocitosis después de la exposición a la luz (Nandrot *et al.*, 2004).

Por último, en la tercera etapa, se producirá la activación de varios sistemas enzimáticos con la intención de movilizar los elementos citoesqueléticos y otros constituyentes implicados en la inclusión de partículas y su digestión. El receptor de macrófagos CD36 regula la internalización de la porción

del segmento externo (Ryeom *et al.*, 1996a; Ryeom *et al.*, 1996b; Sparrow *et al.*, 1997; Finnemann y Silverstein, 2001). CD36 interacciona con el receptor TLR4 (*Toll-Like Receptor 4*) adaptando el metabolismo de las células del RPE para degradar las porciones de segmento externo ingeridas (Kindzelskii *et al.*, 2004). El proceso de ingestión de fagosomas es saturable y dependiente de la temperatura. Además, no todos los fagosomas unidos a la membrana apical serán ingeridos. Después de una fase de ingestión es necesario un periodo de descanso de 2-3 horas antes de volver a introducir más fagosomas (Hall y Abrams, 1987). Una vez introducidos en el citoplasma de las células del RPE los fagosomas comienzan a ser digeridos (Nguyen-Legros y Hicks, 2000). La digestión ocurre mayoritariamente en el polo basal de las células donde los fagosomas se fusionan con los lisosomas generando los fagolisosomas. El proceso normal de digestión es rápido. Así, los segmentos externos de los conos que han sido fagocitados durante la noche son reducidos a cuerpos residuales fluorescentes (lipofuscina), al mismo tiempo que los discos de los bastones son eliminados por la mañana. La progresiva acumulación de lipofuscina en el citoplasma de las células del RPE no limita la capacidad fagocítica de la célula (Finnemann *et al.*, 2002). Sin embargo, el ambiente interno de la célula puede volverse perjudicial, ya que el principal componente de la lipofuscina, A₂E, es una molécula altamente tóxica (McBee *et al.*, 2001; Sparrow *et al.*, 2003). Las células del RPE con altas concentraciones de A₂E degradan eficientemente las proteínas de los segmentos externos ingeridos, pero presentan grandes problemas para digerir los fosfolípidos (Finnemann *et al.*, 2002). Esto podría deberse a la inhibición selectiva de A₂E sobre la fosfolipasa A₂ y la fosfolipasa C. Alternativamente, A₂E podría retrasar la digestión de los segmentos externos al bloquear selectivamente el transporte de lípidos, impidiendo su entrada en el lisosoma. El retraso en la degradación de los lípidos originaría el depósito de material no digerido en el interior de la célula del RPE, lo que podría contribuir a su degeneración.

I.4.5.1. Genes responsables de RP implicados en interacciones celulares

I.4.5.1.1. Protooncogen c-MER receptor tirosín kinasa

Símbolo: <i>MERTK</i> (OMIM: +604705)	Proteína codificada: 19 exones, 999 a.a.
Otros alias: <i>MER</i>	Función: Fagocitosis de los segmentos externos
Región cromosómica: 2q13	Actividad catalítica: ATP+a[P]-L-tyr→ADP+a[P]-L-tyrP
Posición: 112372662-112503416	Especificidad de tejido: No expresada en linfocitos B y T
Patologías asociadas: arRP	Localización subcelular: Membrana

[P], Proteína; tyr, Tirosina; tyrP, Tirosina fosfato.

El análisis de una librería de expresión B-linfoblastoide λ gt11 humana, permitió aislar el cDNA que codificaba la tirosín kinasa transmembrana c-mer (Graham *et al.*, 1994). MERTK (c-mer), es expresada en monocitos, tejido epitelial, tejido reproductivo y numerosas líneas neoplásicas de células B y T. El gen *MERTK* humano, inicialmente localizado en la región cromosómica 2q14.1 (Weier *et al.*, 1999), pertenece a la familia de receptores kinasa *MER/AXL/TYRO3* (Graham *et al.*, 1994). Su estructura comprende 19 exones que codifican una proteína de 999 aminoácidos (110 kDa) con varios dominios funcionales: dos Inmunoglobulina tipo C-2, dos Fibronectina tipo III, uno transmembrana y uno tirosín kinasa, el cual contiene la inusual secuencia KWIAIES (Graham *et al.*, 1994; Gal *et al.*, 2000). El RNA que codifica a MERTK puede sufrir splicing alternativo, generando nuevas isoformas de la proteína (Graham *et al.*, 1994). Las 8 isoformas actualmente conocidas de MERTK, presentan gran variación de tamaño y diferente reordenamiento de exones e intrones (UCSC Genome Browser on Human; Mar. 2006 Assembly).

MERTK comenzó a ser relacionado con la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores, cuando D'Cruz *et al.* demostraron que era el gen responsable de la distrofia retinal de las ratas RCS (*Royal College of Surgeons*) (D'Cruz *et al.*, 2000). Exámenes histológicos de la retina de estas ratas revelaron un anormal acúmulo de pequeñas porciones de los segmentos externos entre la capa de fotorreceptores y el RPE, debido a la pérdida de actividad fagocítica del RPE (Dowling y Sidman, 1962; Herron *et al.*, 1969; Bok y Hall, 1971). El hallazgo de mutaciones en el ortólogo humano de *MERTK* cosegregando con individuos afectados de arRP evidenció la implicación de los defectos de la actividad fagocitaria del RPE en las patologías de la retina (Gal *et al.*, 2000). Desde el primer estudio mutacional de *MERTK* realizado por Gal *et al.* han aparecido nuevas mutaciones implicando a este gen como responsable de arRP (McHenry *et al.*, 2004; Tschernutter *et al.*, 2006). Mutaciones en *MERTK* explican un 1% de los casos de arRP (Hartong *et al.*, 2006).

I.4.5.1.2. Homólogo del gen *crumbs* de *Drosophila*

Símbolo: <i>CRB1</i> (OMIM: +604210)	Proteína codificada: 12 exones, 1406 a.a.
Otros alias: P82279	Función: Morfogénesis del receptor
Región cromosómica: 1q31.3	Especificidad de tejido: Retina, cerebro, testículo
Posición: 195504031-195714208	Localización subcelular: Membrana
Patologías asociadas: arRP con PPRPE, arRP, arLCA, adPPCRA	Propiedades: Se asocia con MPDZ, MPP4 y MPP5 en la membrana limitante externa

RET3C11, un cDNA específico de retina clonado por den Hollander *et al.* (den Hollander *et al.*, 1999c), codifica una proteína (CRB1) homóloga a la proteína crumbs de *Drosophila melanogaster* (den Hollander *et al.*, 1999a). La proteína crumbs está implicada en la polaridad apical-basal, las

interacciones célula-célula y la morfogénesis de los fotorreceptores (den Hollander *et al.*, 1999a; Pellikka *et al.*, 2002); mientras que CRB1 es esencial para la integridad de la membrana limitante externa y la morfogénesis de los fotorreceptores (Mehalow *et al.*, 2003) y el mantenimiento de la polarización (van de Pavert *et al.*, 2004). Además, el hecho de que las retinas con mutaciones en *CRB1* estén engrosadas y desestructuradas indica una probable función de CRB1 en el proceso apoptótico del normal desarrollo de la retina (Jacobson *et al.*, 2003).

CRB1 fue asignado a la región cromosómica 1q31-q32.1 (den Hollander *et al.*, 1999c), que contenía un locus (RP12) implicado en una forma severa de arRP (van Soest *et al.*, 1994). La co-localización de RP12 y *CRB1* promovió la búsqueda de mutaciones causales de RP en ese gen. El análisis de *CRB1* reveló la presencia de varias mutaciones cosegregando con esta forma severa de arRP, caracterizada por la preservación del RPE paraarteriolar (PPRPE) (den Hollander *et al.*, 1999a; Bernal *et al.*, 2003b; den Hollander *et al.*, 2004). Estudios posteriores asociaron nuevas mutaciones de *CRB1* a arLCA (den Hollander *et al.*, 2001; Lotery *et al.*, 2001a; Bernal *et al.*, 2003b; Hanein *et al.*, 2004), a arRP sin PPRPE (Lotery *et al.*, 2001b; Bernal *et al.*, 2003b), a arRP asociada a vasculopatía exudativa similar a la de Coats (den Hollander *et al.*, 2001; den Hollander *et al.*, 2004), o a atrofia corioretinal paravenosa pigmentaria (PPCRA) autosómica dominante (McKay *et al.*, 2005). Mutaciones en *CRB1* representan el 6,5% de los casos de arRP (Daiger *et al.*, 2007).

I.4.5.1.3. Usherina

Símbolo: <i>USH2A</i> (OMIM: +608400)	Proteína codificada: 72 exones, 5202 a.a.
Otros alias: <i>USH2</i>	Función: Implicada en visión y audición
Región cromosómica: 1q41	Especificidad de tejido: Ampliamente distribuida
Posición: 213862859-214663361	Localización subcelular: Membrana
Patologías asociadas: arRP, arUSH tipo 2	Propiedades: Interactúa con colágeno IV, fibronectina, USH1C y WHRN

El locus del síndrome de Usher tipo II (*USH2*) se localizó en el tercio distal del brazo largo del cromosoma 1 (Kimberling *et al.*, 1990; Lewis *et al.*, 1990). El hallazgo de una familia afectada por Usher tipo II que no cosegregaba con *USH2* propició que este locus fuese renombrado como *USH2A*. Un posterior refinamiento de la región 1q41 redujo la extensión del locus *USH2A* a 2,1 cM (Kimberling *et al.*, 1995). Finalmente, tras acotar el intervalo a ~1 cM, Eudy *et al.* identificaron al gen *USH2A* (Eudy *et al.*, 1998). La proteína codificada por este gen contiene dominios laminina EGF (*Epidermal Growth Factor*) y dominios fibronectina tipo III, señalando a usherina como una posible proteína de la matriz extracelular específica de tejido o una molécula de adhesión celular (Eudy *et al.*, 1998). La interacción entre el dominio laminina de usherina y el dominio 7S del colágeno tipo IV es

esencial para la estabilización de la usherina en la membrana basal (Bhattacharya *et al.*, 2004). Usherina puede encontrarse en un gran número de tejidos, pero sólo se expresará en la membrana basal de las estructuras y capilares del ojo y el oído, del intestino delgado y del colon (Bhattacharya *et al.*, 2002). El normal desarrollo y homeostasis de las membranas basales de la retina y el oído interno dependen de la presencia de usherina. Individuos con Usher tipo II presentan gran afectación de ojo y oído, a pesar de que intestino delgado y colon no muestren aparentes consecuencias.

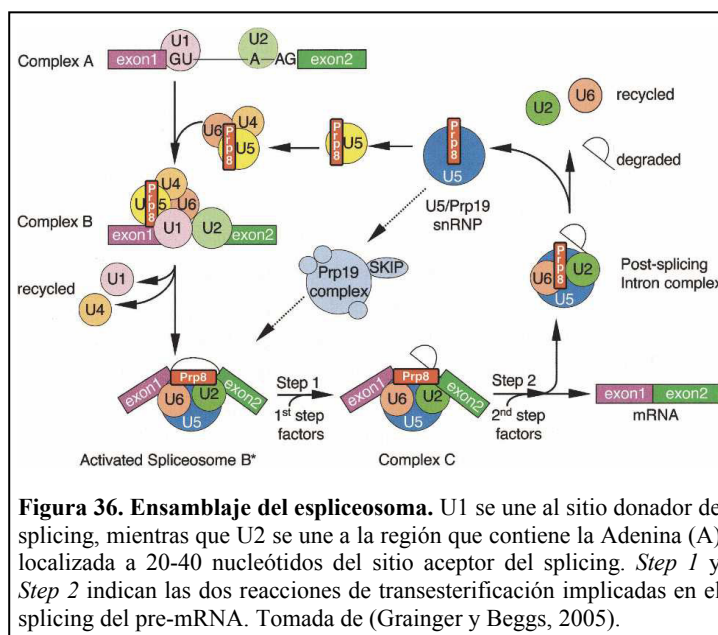
El consiguiente examen del gen *USH2A* reveló la presencia de tres diferentes mutaciones cosegregando con Usher tipo II (Eudy *et al.*, 1998). Análisis posteriores identificaron nuevas mutaciones en *USH2A* responsables de Usher tipo II (Weston *et al.*, 2000; Seyedahmadi *et al.*, 2004; van Wijk E. *et al.*, 2004) o de arRP sin pérdida de audición (Rivolta *et al.*, 2000; Rivolta *et al.*, 2002a; Bernal *et al.*, 2003a; Seyedahmadi *et al.*, 2004). Uno de los casos de RP sin pérdida de audición identificado por Rivolta *et al.* estaba causado por una heterodisomía uniparental paterna con parcial isodisomía del cromosoma 1 (Rivolta *et al.*, 2002a). El individuo en cuestión era homocigoto para la mutación Cys759Phe, a pesar de que su madre no era portadora y su padre era heterocigoto no afecto. Tras descartar una posible hemizigosidad, debida a una delección materna de la región cromosómica que contiene a *USH2A*, se procedió al escrutinio de ambas copias del cromosoma 1 del individuo afectado con marcadores microsatélites. Los resultados confirmaron la homocigosidad de los marcadores distales de ambos brazos y la heterocigosidad de los más cercanos al centrómero. La región homocigota (isodisómica) incluía el locus de *USH2A*, de ahí la presencia en homocigosis del alelo mutado.

Mutaciones en *USH2A* son responsables del 10 % de los casos de arRP (Daiger *et al.*, 2007).

I.4.6. Procesado del RNA mensajero

La característica presencia de secuencias no codificantes (intrones) dentro del genoma de eucariotas, puede alterar la transcripción de los genes. Por lo tanto, los intrones deben ser eliminados antes de que la célula utilice la información contenida en el gen. Cualquier fallo en el proceso de reconocimiento y eliminación de los intrones (splicing), puede generar un mRNA alterado que acarreará unas desastrosas consecuencias. La precisa excisión de los intrones del pre-mRNA se produce en el espliceosoma, un complejo macromolecular altamente dinámico constituido por cinco pequeños RNAs nucleares (snRNAs) y unas 200 proteínas (Zhou *et al.*, 2002a; Valadkhan, 2007). Cada molécula de snRNA se une a proteínas específicas y constituyen las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs). En mamíferos, el espliceosoma se ensambla de forma secuencial sobre el pre-mRNA mediante la unión de cinco snRNPs: U1, U2, U4/U6, U5 y U4/U6:U5 tri-snRNP (Zhou *et al.*, 2002b). U1 es la primera snRNP en asociarse al pre-mRNA, interactuando con el sitio de splicing de la región 5'. En ese momento, el snRNA de U1 comienza a emparejarse en el extremo 5' del intrón, comprometiendo al pre-mRNA para su procesado (Figura 36). Posteriormente, la snRNP

U2 se asocia con la región del punto de bifurcación del intrón para formar un pre-espliceosoma o complejo A. Los snRNAs U4 y U6 muestran una gran complementariedad de secuencia, por lo que se encuentran habitualmente emparejados formando el U4/U6 di-snRNP. A su vez, U4/U6 di-snRNP interactúa con U5 snRNP para formar U4/U6:U5 tri-snRNP, el cual se asociará con el pre-espliceosoma para formar el complejo B. La formación del espliceosoma con capacidad catalítica o complejo C requerirá una intrincada serie de reordenamientos de las proteínas y el RNA, catalizados por NTPasas RNA-dependientes/RNA helicasas. Tras la finalización de la reacción de splicing, el espliceosoma se disociará y se volverá a reensamblar sobre otros pre-mRNAs para su procesamiento (Grainger y Beggs, 2005).



Existe una serie de factores de splicing asociados a los espliceosomas que están codificados por genes implicados en enfermedades genéticas. Tal es el caso de los factores U4/U6-61K, codificado por *PRPF31* (Vithana *et al.*, 2001; Makarova *et al.*, 2002); de U4/U6-90K, codificado por *PRPF3* (Chakarova *et al.*, 2002); de U5-220K, codificado por *PRPF8* (McKie *et al.*, 2001) y de PAP-1 (Maita *et al.*, 2004b). Mutaciones en estos genes pueden causar defectos en el procesamiento del pre-mRNA.

I.4.6.1. Genes responsables de RP implicados en el procesamiento de mRNA

I.4.6.1.1. Factor 3 de procesamiento de pre-mRNA

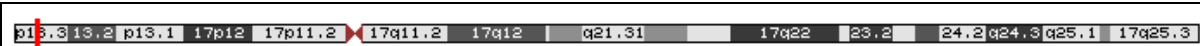
Símbolo: <i>PRPF3</i> (OMIM: *607301)	Proteína codificada: 16 exones, 683 a.a.
Otros alias: <i>HPRP3</i>	Función: Eliminación de intrones del pre-mRNA
Región cromosómica: 1q21.2	Especificidad de tejido: Retina, hígado, riñón y sangre
Posición: 148560642-148592294	Localización subcelular: Núcleo
Patologías asociadas: adRP	Propiedades: Interactúa con PPIH, HPRP3P y PRPF4

El locus RP18, identificado en una familia danesa cosegregando con adRP, fue asignado a la región 1p13-q23 del cromosoma 1 humano (Xu *et al.*, 1996). La búsqueda del gen responsable de RP contenido en este locus, concluyó con el hallazgo de *PRPF3* en 1q21.2 (Heng *et al.*, 1998). El gen

PRPF3 (*Precursor RNA Processing Factor 3*), codifica una proteína de 90 kDa asociada a la ribonucleoproteína nuclear pequeña (snRNP) U4/U6 (Lauber *et al.*, 1997). *PRPF3* es un factor esencial para el splicing del pre-mRNA (Wang *et al.*, 1997).

El análisis mutacional del gen *PRPF3* en individuos afectados de adRP, reveló la presencia de varias mutaciones (Chakarova *et al.*, 2002). Este hallazgo permitió señalar a los defectos del proceso de splicing como causa de la degeneración de la retina observada en estos individuos. No obstante, Jones *et al.* ya habían intuido esta posibilidad en 1990, afirmando que el descenso de los niveles de mRNA apreciado en individuos con RP se debía a la muerte de los fotorreceptores o a defectos genéticos que alteran la expresión del mRNA en la retina (Jones *et al.*, 1990). Mutaciones en el gen *HPRP3* representan el 1% de los casos de adRP (Sullivan *et al.*, 2006a).

I.4.6.1.2. Factor 8 de procesado de pre-mRNA

	
Símbolo: <i>PRPF8</i> (OMIM: *607300)	Proteína codificada: 43 exones, 2335 a.a.
Otros alias: <i>PRPC8</i>	Función: Eliminación de intrones del pre-mRNA
Región cromosómica: 17p13.3	Especificidad de tejido: Ampliamente expresada
Posición: 1500673-1534926	Localización subcelular: Núcleo
Patologías asociadas: adRP	Propiedades: Forma parte del complejo U5 snRNP

La comparación de la secuencia del cDNA de *PRPF8* con bases de datos de ESTs humanas, permitió reasignar la posición del locus RP13 a la región cromosómica 17p13.3 (Luo *et al.*, 1999). *PRPF8* es un factor de splicing altamente conservado asociado al complejo U5 snRNP, el cual forma parte de los espliceosomas mayor y menor.

La secuenciación del gen *PRPF8* en individuos afectados de RP cosegregando con RP13, permitió reconocer mutaciones responsables de adRP (McKie *et al.*, 2001; Kondo *et al.*, 2003; Martínez-Gimeno *et al.*, 2003). Todas estas mutaciones se encuentran en el último exón de *PRPF8*. Muchas de ellas afectan a aminoácidos altamente conservados sugiriendo la implicación del extremo C-terminal de *PRPF8* en una importante función (Grainger y Beggs, 2005). Mutaciones en *PRPF8* explican un 3% de los casos de adRP (Sullivan *et al.*, 2006a).

I.4.6.1.3. Factor 31 de procesamiento de pre-mRNA

Símbolo: <i>PRPF31</i> (OMIM: *606419)	Proteína codificada: 14 exones, 499 a.a.
Otros alias: <i>PRP31</i>	Función: Eliminación de intrones del pre-mRNA
Región cromosómica: 19q13.42	Especificidad de tejido: Ampliamente expresada
Posición: 59310649-59326954	Localización subcelular: Núcleo
Patologías asociadas: adRP	Propiedades: Une a U4/U6 y U5 snRNP para formar U4/U6·U5 tri-snRNP

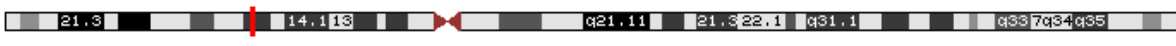
En algunas familias ligadas al locus RP11, los individuos portadores del gen mutado pueden estar severamente afectados o, por el contrario, no presentar ningún síntoma de RP. La expresividad del gen contenido en este locus estaría regulada por una forma “todo o nada” de penetrancia incompleta denominada expresividad bimodal (Al-Magthteh *et al.*, 1996). Probablemente, el mecanismo de penetrancia incompleta observado en RP11 este influenciado por el nivel de expresión del alelo salvaje homólogo (McGee *et al.*, 1997; Vithana *et al.*, 2003; Rivolta *et al.*, 2006).

Los eventos de recombinación observados en las familias ligadas a RP11 permitieron reducir la extensión del locus a un intervalo de ~6 cM, localizado en la región cromosómica 19q13.4 (McGee *et al.*, 1997). Finalmente, mediante clonación posicional, Vithana *et al.* identificaron el gen responsable de RP en el locus RP11: *PRPF31* (Vithana *et al.*, 2001). Este gen codifica una proteína de 61 kDa necesaria para la formación de U4/U6·U5 tri-snRNP (Makarova *et al.*, 2002). *PRPF31* es homólogo al factor de splicing Prp31p de levaduras, el cual también resulta esencial para constituir a U4/U6·U5 tri-snRNP y para el proceso de splicing del pre-mRNA (Weidenhammer *et al.*, 1996; Weidenhammer *et al.*, 1997).

El análisis de *PRPF31*, en busca de variaciones de secuencia patológicas, reflejó diversas mutaciones cosegregando con adRP (Vithana *et al.*, 2001; Martínez-Gimeno *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2004; Waseem *et al.*, 2007). Recientemente, Mordes *et al.* han confirmado que *PRPF31* es indispensable para el splicing del pre-mRNA de un grupo de genes específicos de los fotorreceptores, entre los que se encuentran *RDS* y *FSCN2* (Mordes *et al.*, 2007). Mutaciones en *PRPF31* inhibirán el proceso de splicing, ocasionando la síntesis de proteínas aberrantes que podrían inducir la degeneración del fotorreceptor (Vithana *et al.*, 2001; Makarova *et al.*, 2002) (Mordes *et al.*, 2007).

El porcentaje de casos de adRP, relacionados con mutaciones en *PRPF31*, se sitúa en torno al 8% (Sullivan *et al.*, 2006a; Sullivan *et al.*, 2006b).

I.4.6.1.4. Proteína RP9 o proteína asociada a la kinasa PIM1



Símbolo: <i>RP9</i> (OMIM: *607331)	Proteína codificada: 6 exones, 221 a.a.
Otros alias: <i>PAP-1</i>	Función: Proteína diana de la kinasa PIM1
Región cromosómica: 7p14.3	Especificidad de tejido: Ampliamente distribuida
Posición: 33100935-33115527	Localización subcelular: Núcleo
Patologías asociadas: adRP	Propiedades: Es fosforilada por PIM1

En 1993, Inglehearn *et al.* describieron un nuevo locus implicado en adRP mediante un análisis de ligamiento en una familia inglesa (Inglehearn *et al.*, 1993). Este locus (RP9) estaba acotado por los marcadores D7S435 –localizado por hibridación *in situ* en la región 7p13-p15.1– y D7S460. Un posterior análisis de esta región con otros marcadores redefinió la extensión del locus al intervalo de 1,6 - 4 cM delimitado por D7S484 y D7S526 (Inglehearn *et al.*, 1994). La secuenciación de unos de los genes contenidos en este intervalo reveló un cambio nucleotídico en el exón 5 (c.410A>T; H137L en proteína) en todos los individuos afectados de la citada familia inglesa. Además de otro cambio nucleotídico en el exón 6 (c.509A>G; D170G en proteína) en un único individuo afectado de RP (Keen *et al.*, 2002). Estos hallazgos confirmaron a dicho gen como el responsable de RP contenido en el locus RP9.

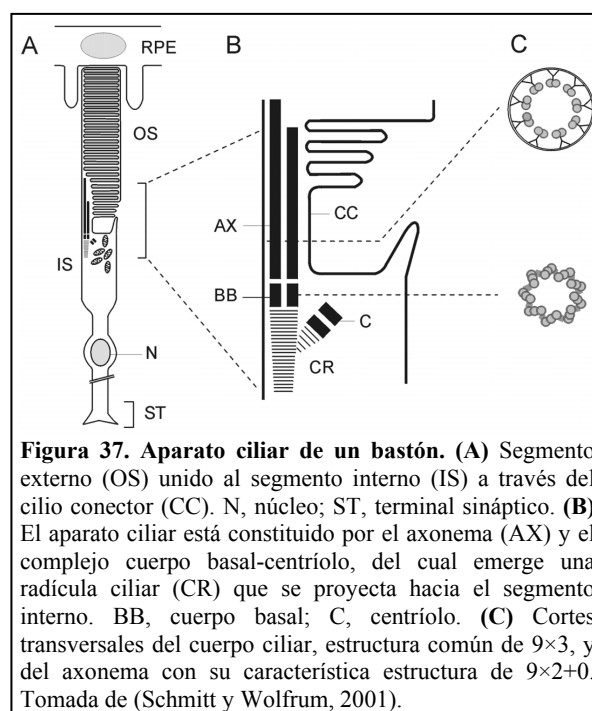
El gen *RP9* (*PAP-1*, *PIM-1 Associated Protein*) se expresa en diversos tejidos (Keen *et al.*, 2002). En el núcleo de las células, *PAP-1* suele estar asociado con factores de splicing como U2AF35 (Maita *et al.*, 2004b) o PRPF3 (Maita *et al.*, 2004a). Al igual que sucede en los componentes del U4/U5·U6 tri-snRNP –PRPF3, PRPF8 y PRPF31–, mutaciones en *PAP-1* causan RP. Por lo tanto, es bastante probable que *PAP-1* sea una proteína que conecte al U4/U5·U6 tri-snRNP con U2AF35 (Maita *et al.*, 2004b).

La mutación D170G provocaría una gran alteración de la actividad de splicing de *PAP-1* y un descenso en la proporción de *PAP-1* fosforilada (Maita *et al.*, 2004b). PIM1 podría regular la fosforilación de *PAP-1*. De hecho, el grado de fosforilación de *PAP-1* se correlaciona con su actividad de splicing. Por el contrario, la mutación H137L no causaría ningún efecto perjudicial sobre la actividad de splicing de *PAP-1*. Un estudio realizado sobre 200 familias con adRP, con el fin de conocer las prevalencias de las mutaciones de los genes conocidos, no identificó ninguna mutación patogénica en *PAP-1*. No obstante, encontraron una variante paráloga de la mutación H137L, es decir, el resultado de una amplificación simultánea de dos secuencias muy similares: la de *PAP-1* en 7p14.2 y la de un gen similar a *PAP-1* situado a 20 Kb del gen original. Aunque el rediseño de los primers eliminó este artefacto, surgió la duda de si la mutación H137L encontrada por Keen *et al.* era realmente una mutación. Esto podría ser la explicación de porque H137L no afecta la actividad de splicing de *PAP-1*.

I.4.7. Transporte intracelular y citoesqueleto

Los fotorreceptores de vertebrados son neuronas polarizadas con dos compartimentos funcionales perfectamente distinguibles: el segmento externo, responsable de la fotosensibilidad, y el interno, en donde tienen lugar la mayor parte de las reacciones metabólicas de la célula. El segmento externo es el resultado de la modificación sufrida por un cilio primario inmóvil con el fin de incrementar su sensibilidad a la luz. Cuanto más especializada está la estructura del cilio en la captación de luz, mayor capacidad tiene el fotorreceptor para recibir información del entorno. En los fotorreceptores maduros, la porción distal del segmento externo está tan modificada que ya no recuerda a un cilio. Sin embargo, una pequeña parte del cilio primario original, denominada cilio conector, permanece prácticamente inalterado y sin ninguna modificación. El cilio conector sería, entonces, el único nexo físico de unión entre los segmentos externo e interno del fotorreceptor y actuaría como un pequeño puente celular entre ambos compartimentos.

La estructura normal de los cilios primarios suele presentar diferentes subcompartimentos: el cuerpo basal, la zona de transición, el axonema, la membrana ciliar y la punta del cilio (Fliegeauf *et al.*, 2007). Los cuerpos basales –los cuales contienen a los centriolos– actúan como centros organizadores de los microtúbulos del fotorreceptor y a partir de ellos emergen los cilios (Troutt y Burnside, 1988b; Muresan *et al.*, 1993). La formación del cilio comprende la unión específica de proteínas en el área del cuerpo basal, donde se produce el ensamblaje de las subestructuras del axonema. La estructura del cilio conector es similar a la de la zona de transición de los cilios móviles, un pequeño compartimento proximal situado entre el cuerpo basal y el axonema. El axonema del cilio conector está constituido por microtúbulos y posee una estructura $9 \times 2 + 0$, caracterizada por la pérdida del par central de microtúbulos, los brazos de dineína y estructuras accesorias del cilio móvil (Figura 37). En los segmentos externos existen dos sistemas citoesqueléticos de microtúbulos: uno se encuentra en el axonema del cilio conector y otro en las muescas de las múltiples incisuras de los discos de los bastones de algunos vertebrados (Figura 38). Tanto en el axonema como en las incisuras, los microtúbulos están conectados mediante filamentos a las membranas adyacentes del segmento externo (Eckmiller, 2004). El prominente citoesqueleto de microtúbulos está compuesto por tubulinas convencionales, incluyendo a la γ -tubulina del



complejo del cuerpo basal. También se han podido reconocer proteínas motoras asociadas a microtúbulos como la kinesina II (Beech *et al.*, 1996; Marszalek *et al.*, 2000), un regulador de la GTPasa implicado en Retinitis Pigmentaria (RPGR) y su ligando (Hong *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2001), una proteína relacionada con nucleolina y una caseína quinasa II (Hollander *et al.*, 1999). Además, se han encontrado dos proteínas citoesqueléticas no convencionales, la centrina (Wolfrum y Salisbury, 1998) y la miocilina (Kubota *et al.*, 1997), componentes del citoesqueleto de actina. Aparte del citoesqueleto de microtúbulos, existe un conjunto de filamentos de actina –localizados en la porción distal del cilio conector– implicados en la morfogénesis de los discos (Schmitt y Wolfrum, 2001).

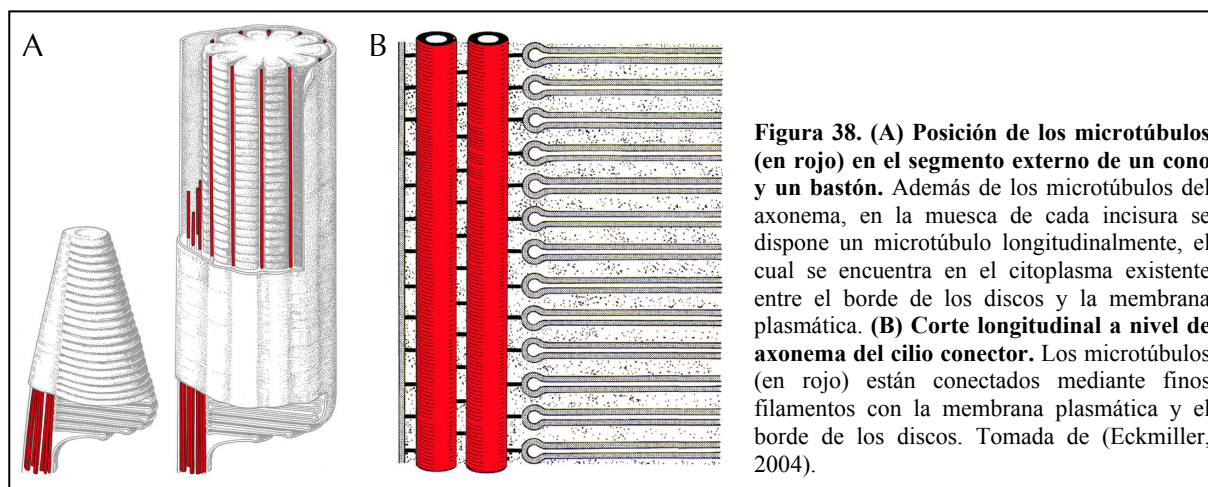


Figura 38. (A) Posición de los microtúbulos (en rojo) en el segmento externo de un cono y un bastón. Además de los microtúbulos del axonema, en la muesca de cada incisión se dispone un microtúbulo longitudinalmente, el cual se encuentra en el citoplasma existente entre el borde de los discos y la membrana plasmática. **(B) Corte longitudinal a nivel de axonema del cilio conector.** Los microtúbulos (en rojo) están conectados mediante finos filamentos con la membrana plasmática y el borde de los discos. Tomada de (Eckmiller, 2004).

En vertebrados, el eje longitudinal de cada fotorreceptor es activamente alineado hacia la pupila, puesto que estas células son más sensibles cuando la luz viaja a lo largo de sus ejes. Los mecanismos responsables de este alineamiento implican movimientos de los citoesqueletos de los fotorreceptores en respuesta a la dirección de la luz incidente (Eckmiller, 2004). Aquellos defectos genéticos que alteren los diferentes sistemas citoesqueléticos de microtúbulos del segmento externo, pueden ser responsables de las diferentes patologías que cursan con degeneración de la retina humana y de la gran variedad de fenotipos que generan.

El proceso de renovación continua del segmento externo exige el incesante aporte de proteínas y lípidos en la región basal, donde se produce la morfogénesis de los discos (Young, 1976). El cilio conector es el único puente directo entre los dos compartimentos del fotorreceptor. Por ello, todos los lípidos y proteínas sintetizados *de novo* en el segmento interno, llegarán hasta el externo mediante transporte intracelular a través del cilio conector (Liu *et al.*, 1999; Marszalek *et al.*, 2000; Wolfrum y Schmitt, 2000). Una vez hayan alcanzado el segmento externo, estas moléculas serán depositadas en la zona de la base para la formación de nuevos discos. Este transporte es vital para el fotorreceptor, puesto que cada día se desprende aproximadamente el 10% del segmento externo. En ratones, dicho proceso resulta en la completa renovación del segmento externo cada dos semanas (Pazour y Rosenbaum, 2002). La precisa sincronización de la síntesis, transporte y ensamblaje de las proteínas y

los lípidos en los discos, es fundamental para el correcto funcionamiento del fotorreceptor. Esto implica la existencia de un sistema de transporte de moléculas a lo largo del fotorreceptor y de un sistema citoesquelético que controle el normal desarrollo de los discos en formación (Rattner *et al.*, 2004).

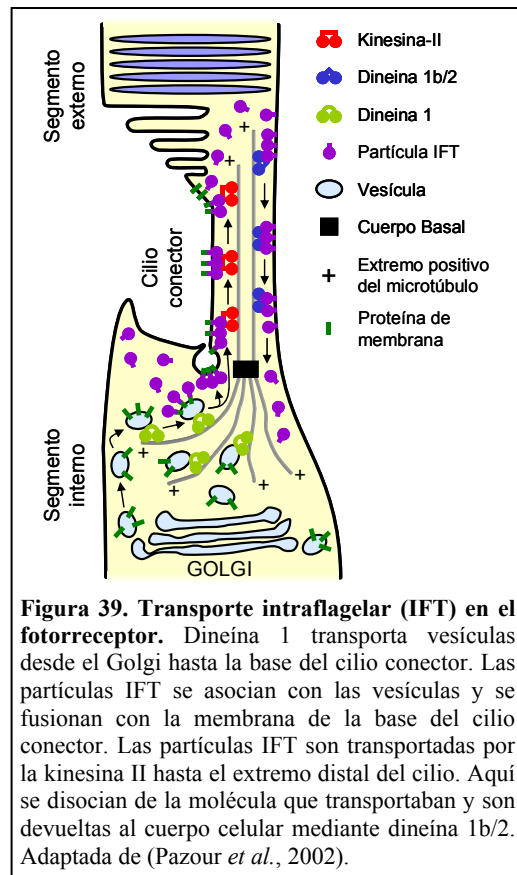
El transporte de proteínas y sus precursores a través del borde del compartimento ciliar y a lo largo de los axonemas hacia sus sitios funcionales se realiza mediante transporte intraflagelar (IFT) (Rosenbaum *et al.*, 1999). Esta forma de transporte es primordial para el ensamblaje y mantenimiento del segmento externo de los bastones (Rosenbaum y Witman, 2002). IFT es un sistema de motilidad intracelular por el cual grandes complejos de proteínas, denominados partículas IFT, son transportados bidireccionalmente entre la membrana y los microtúbulos del cilio. Las partículas IFT no son componentes del axonema ni de la membrana. Sin embargo, pueden transportar proteínas pertenecientes al axonema o a la membrana. En ratones, las mutaciones en una de estas proteínas encargadas del IFT (IFT88), conducen a un desarrollo aberrante de los segmentos externos y a la progresiva degeneración de los fotorreceptores. Los segmentos externos aberrantes muestran un alineamiento incorrecto de los discos, los cuales están vesiculados o situados de forma paralela al cilio conector. Además, los segmentos internos y los cuerpos celulares de los fotorreceptores de estos ratones retienen la opsina, produciéndose un acumulo extracelular de vesículas con alto contenido en opsina (Pazour *et al.*, 2002).

La polaridad de los microtúbulos del segmento interno, con sus extremos negativos asociados con la base del cilio (Troutt y Burnside, 1988a), sugiere que las vesículas de membrana generadas en el aparato de Golgi son transportadas hasta el cuerpo basal mediante dineína 1. En la base del cilio conector, donde las partículas de IFT están más concentradas, se produce la asociación de estas partículas con la superficie de las vesículas y los componentes del axonema ciliar, así como con proteínas solubles del segmento externo, tales como transducina y arrestina. Una vez que las vesículas se hayan fusionado con la membrana plasmática adyacente al cilio, el complejo es movilizado en dirección al segmento externo (transporte anterógrado) por la kinesina-II (kinesina heterotrimérica KIF3) (Kozminski *et al.*, 1995). Kinesina-II ha sido localizada en el cilio conector de vertebrados (Beech *et al.*, 1996; Whitehead *et al.*, 1999) y es la encargada del transporte anterógrado de opsina y arrestina en los fotorreceptores de mamíferos (Marszalek *et al.*, 2000). En ratones, defectos específicos de en la subunidad KIF3A de la kinesina-II, provocan la acumulación de opsina y arrestina en el segmento interno (Marszalek y Goldstein, 2000). Ya en el segmento externo, las partículas de IFT se separan de su carga y la membrana es reconvertida en discos a través de un mecanismo que implica a la miosina VIIA. Ratones con defectos en el gen de la miosina VIIA acumulan opsina en el cilio conector (Liu *et al.*, 1999). En el segmento externo, las proteínas solubles de la maquinaria de la fototransducción y el citoesqueleto se asociarán con complejos proteicos. Las partículas de IFT que habían alcanzado el extremo distal pueden asociarse con componentes de la maquinaria de transducción y regresar a la base del cilio (transporte retrógrado) impulsados por dineína

citoplasmática 1b/2 (Pazour *et al.*, 1999; Porter *et al.*, 1999). Cuando llegan a la base del cilio, las partículas de IFT vuelven a formar parte del pool de partículas de IFT y comienza el ciclo de nuevo (Figura 39).

Mutaciones en 3 proteínas localizadas en el cilio conector –miosina VIIa (Liu *et al.*, 1999), KIF3A (Marszalek *et al.*, 2000) y RPGR (Hong *et al.*, 2000)– conducen a la acumulación de proteínas de la fototransducción en el cilio conector y/o el cuerpo celular, sugiriendo un defecto en el transporte vectorial de proteínas desde el segmento interno hasta el externo. Este defecto conduciría, finalmente, a la muerte de la célula fotorreceptora. La relación entre las enfermedades degenerativas de la retina en humanos y la disfunción del cilio conector se hace patente tras la observación de que mutaciones en RPGR (localizada en el cilio conector) representan un 20% de los casos de Retinitis Pigmentaria (Hong *et al.*, 2003). El hecho de que RPGR interactúe con IFT88, así como con varias proteínas motoras del microtúbulo (Khanna *et al.*, 2005), hace probable que esta proteína esté involucrada en el IFT. Además, las proteínas RPGRIP1 y RP1,

implicadas en la patogénesis de Retinitis Pigmentaria, también se localizan en el cilio conector (Fliegauf *et al.*, 2007). El síndrome de Usher (USH) es una enfermedad heterogénea que, en raros casos, puede estar asociada a la alteración congénita del aparato mucociliar. Defectos en la estructura normal del axonema ciliar, provocan la total ausencia de cilios en las células, generando una mayor predisposición a las infecciones de las vías respiratorias altas y bajas (Tosi *et al.*, 2003). La mayoría de las proteínas USH se localizan en el cilio conector o la membrana periciliar (Reiners *et al.*, 2003; Reiners *et al.*, 2006), donde se implicarán en el IFT, específicamente en el transporte de rodopsina (Wolfrum y Schmitt, 2000).



I.4.7.1. Genes responsables de RP implicados en el transporte intracelular y el citoesqueleto

I.4.7.1.1. Proteína similar a *tubby*

Símbolo: <i>TULP1</i> (OMIM: *602280)	Proteína codificada: 15 exones, 542 a.a.
Otros alias: <i>O00294</i>	Función: Transporte intracelular
Región cromosómica: 6p21.31	Especificidad de tejido: Retina, cerebro
Posición: 35573629-35588625	Localización subcelular: Citoplasma
Patologías asociadas: arRP, arLCA o arEORD	Propiedades: Splicing alternativo en exones 5'

En 1997, North *et al.* identificaron el gen *TUB*, homólogo humano del gen *tub* murino (North *et al.*, 1997). Mutaciones en *tub* ocasionan el fenotipo obeso *tubby*, degeneración retinal o pérdida auditiva (Heckenlively *et al.*, 1995; Kleyn *et al.*, 1996; Noben-Trauth *et al.*, 1996). Además, describieron dos nuevos miembros de esta familia génica: *TULP1* (*Tubby Like Protein 1*) y *TULP2* (North *et al.*, 1997). Pese a las diferencias en la región N-terminal, la similitud del extremo C-terminal indica una probable función común para las proteínas codificadas por estos tres genes. Sin embargo, ninguna de ellas puede compensar la falta de las otras, puesto que se expresan en diferentes tejidos (Ikeda *et al.*, 1999). El splicing alternativo de la región 5' del pre-mRNA condicionaría la expresión de estos genes en los distintos tipos de tejidos (North *et al.*, 1997; He *et al.*, 2000).

TULP1 se localizó en la región cromosómica 6p21.3 (North *et al.*, 1997), dentro del intervalo definido para el locus RP14 (Banerjee *et al.*, 1998b). Este gen codifica una proteína expresada en los segmentos internos, el soma y las sinápsis de bastones y conos (Milam *et al.*, 2000). Sin embargo, *TULP1* no ha podido ser detectada en los segmentos externos ni en el núcleo (Hagstrom *et al.*, 2001). Un análisis mutacional, realizado en dos grandes familias de la República Dominicana ligadas a RP14, identificó una mutación en *TULP1* (IVS14+1G>A) presente en homocigosis en todos los individuos afectados (Banerjee *et al.*, 1998a). Posteriores análisis en *TULP1* describieron nuevas mutaciones relacionadas con arRP (Gu *et al.*, 1998; Hagstrom *et al.*, 1998; Paloma *et al.*, 2000), arEORD (*Early Onset Retinal Degeneration*) (Lewis *et al.*, 1999a) o con arLCA (Hanein *et al.*, 2004). Recientemente, ha sido definida una nueva mutación de *TULP1* (FA531-532dup) en una familia argelina cosegregando con arLCA o arEORD (Mataftsi *et al.*, 2007). Mutaciones en *TULP1* causan el 1% de los casos de arRP (Hartong *et al.*, 2006) y el 1,7% de los casos de arLCA (Daiger *et al.*, 2007).

El hallazgo de mutaciones que causan fenotipos patológicos, junto con su elevada expresión en bastones y conos, indican una posible función de *TULP1* en la fisiología de los fotorreceptores (Hagstrom *et al.*, 1998). Esta función no está bien definida y resulta controvertida. Inicialmente, las proteínas *tubby* fueron consideradas factores reguladores de la transcripción bipartitos (Boggon *et al.*, 1999). Se incluyeron en esta categoría por mostrar una región de unión al DNA en su extremo C-

terminal y poseer un extremo N-terminal con reminiscencias de los dominios de transactivación de muchos factores de transcripción. Posteriormente, Santagata *et al.* afirmaron que las proteínas tubby eran reguladores de la transcripción unidos a través del extremo C-terminal a fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato de la membrana plasmática (Santagata *et al.*, 2001). La cascada de señalización desencadenada por un receptor acoplado a proteína G promovería la activación de una fosfolipasa C- β . Las proteínas tubby se translocarían al núcleo en respuesta a la hidrólisis de fosfoinosítidos causada por la fosfolipasa C- β , proporcionando un enlace directo entre la señalización de las proteínas G y la expresión de determinados genes.


En contra de estas dos propuestas, Hagstrom *et al.* sugirieron que TULP1 podía estar relacionada con el transporte de rodopsina hacia el segmento externo (Hagstrom *et al.*, 2001). Tal hipótesis se fundamentaba en la ausencia de rodopsina exhibida por los segmentos externos y el núcleo de los fotorreceptores de ratones *tulp1*^{-/-}. En estos ratones, el exceso de rodopsina almacenado en el citoplasma del segmento interno se depositaba en vesículas ectópicas surgidas de las membranas plasmáticas laterales (Hagstrom *et al.*, 1999; Hagstrom *et al.*, 2001). Posteriormente, estas vesículas eran liberadas a la matriz interfotorreceptora, donde se iban acumulando.

Hagstrom *et al.* demostraron que TULP1 no se encuentra sujeta al núcleo ni al segmento externo de los fotorreceptores, invalidando cualquier suposición que asocie esta proteína con la morfogénesis de los discos o mantenimiento de los segmentos externos (Hagstrom *et al.*, 2001). También descartaron su función como factor de transcripción, puesto que TULP1 no tendría acceso al DNA genómico al no expresarse en el núcleo. De hecho, pudieron comprobar como ratones *tulp1*^{-/-} no presentaban mermas en la expresión de 7 genes específicos de los fotorreceptores.

Un estudio posterior mostró que TULP1 era una proteína citoplasmática; en ocasiones asociada a la membrana a través de la unión con fosfoinosítidos (Xi *et al.*, 2005). También se pudo comprobar como TULP1 interaccionaba con la proteína citoesquelética F-actina en los fotorreceptores. Ambas evidencias respaldaban la hipótesis que implicaba a TULP1 en el transporte intracelular de rodopsina; desde su lugar de síntesis en el segmento interno del fotorreceptor, hasta su destino final en el segmento externo.

Recientemente, se ha confirmado la interacción física entre TULP1 y la GTPasa Dinamina-1 en la capa plexiforme externa y los segmentos internos de los fotorreceptores (Xi *et al.*, 2007). Dinamina-1 esta relacionada con procesos de endocitosis, formación de vesículas, movilización de estas vesículas por el *trans*-Golgi y membrana plasmática, y reciclado de vesículas en las sinapsis neuronales. Esta interacción corrobora la función de TULP1 en la translocación polarizada de vesículas de proteínas entre los segmentos externos y los terminales sinápticos.

I.4.7.1.2. Regulador de GTPasa implicado en Retinitis Pigmentaria

	
Símbolo: <i>RPGR</i> (OMIM: *312610)	Proteína codificada: 19 exones, 815 a.a.
Otros alias: <i>Q92834-2</i>	Función: Mantenimiento del transporte de proteínas
Región cromosómica: Xp11.4	Especificidad de tejido: Ampliamente distribuida
Posición: 38013367-38071732	Localización subcelular: Cilio conector
Patologías asociadas: XlrRP, XldrRP, XICORD, XICOD, XlrAMD	Propiedades: Splicing alternativo (ORF15)

El análisis de ligamiento efectuado por Musarella *et al.* en cuatro familias con XIRP, permitió la identificación de un locus –RP3– en la región cromosómica Xp21 (Musarella *et al.*, 1988). Posteriormente, Meindl *et al.* determinaron que *RPGR* era el gen responsable de RP contenido en RP3 (Meindl *et al.*, 1996). *RPGR* codifica una proteína con 19 exones expresada en una amplia variedad de tejidos. Sin embargo, este gen muestra un complejo patrón de splicing alternativo mediado por múltiples potenciadores de splicing de los exones (Hong y Li, 2002). Además del transcrito constitutivo de 19 exones, se generarán varios transcritos que darán lugar a otras tantas isoformas de la proteína. Todas ellas compartirán un mismo extremo N-terminal seguido de una porción C-terminal de longitud y secuencia variables.

La región N-terminal de *RPGR* (RLD, *RCC1-like domain*) muestra cierta homología con *RCC1*, el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF, *Guanine Nucleotide Exchange Factor*) de la GTPasa Ran (Roepman *et al.*, 1996; Meindl *et al.*, 1996). Ran presenta una localización predominantemente nuclear y está implicada en el transporte nucleocitoplasmático de proteínas (Sazer, 1996). A tenor de lo comentado, se consideró una posible interacción de *RPGR* con la GTPasa Ran (Meindl *et al.*, 1996). Mediante esta asociación, *RPGR* estabilizaría el estado activado de la GTPasa tras su unión con GTP y promovería su anclaje a la membrana plasmática o a determinadas vesículas. Sin embargo, no se ha podido demostrar la actividad GEF de *RPGR* para Ran (Linari *et al.*, 1999).

Los estudios realizados con el sistema del doble híbrido de levaduras –empleando el extremo RLD de *RPGR* como cebo– identificaron la interacción con dos proteínas: *RPGRIP1* (proteína 1 de interacción con *RPGR*) (Boylan y Wright, 2000; Roepman *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2001) y *PDE6δ* (subunidad δ de la fosfodiesterasa 6 de los bastones) (Linari *et al.*, 1999). *RPGRIP1* contiene un dominio C-terminal de interacción con *RPGR* y varios tramos de espiral enrollada N-terminales, homólogos a los de las proteínas implicadas en el transporte vesicular (Roepman *et al.*, 2000). La firme asociación entre *RPGRIP1* y el axonema ciliar provoca el anclaje de *RPGR* al cilio conector (Hong *et al.*, 2001). Por lo tanto, resulta más que probable que *RPGR* y *RPGRIP1* desempeñen una función mediadora de los procesos de transporte vesicular en los fotorreceptores (Roepman *et al.*,

2000). Alteraciones de la estructura normal de la proteína RPGRIP1 están relacionadas con LCA (Dryja *et al.*, 2001) y arCORD (Hameed *et al.*, 2003).

Por otro lado, PDE6 δ es una proteína de unión a prenil implicada en la solubilización de la PDE de la membrana de los discos de los segmentos externos durante la fototransducción (Cook *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004). El complejo RPGR-PDE δ podría actuar como un inhibidor de la disociación del nucleótido guanina (GDI, *Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor*) de la subunidad α de alguna proteína G heterotrimérica (Linari *et al.*, 1999). Este modo de actuación podría compararse con el del complejo G $\beta\gamma$ de la transducina, el cual se comporta como un GDI manteniendo inactivada a la subunidad α . Los dos tipos de actuación de RPGR –como GEF o como GDI– implican su posible interacción con una proteína de unión a GTP todavía no identificada (Linari *et al.*, 1999).

Estudios más recientes han mostrado las interacciones entre una isoforma de RPGR (RPGR^{ORF15}), RPGRIP1 y la proteína nucleofosmina (NPM) –chaperona que se moviliza entre los nucleolos y el citoplasma– en el cuerpo basal de las células con cilios primarios y los centriolos de células de mamíferos en cultivo (Shu *et al.*, 2005). Del mismo modo, se ha podido reconocer la interacción entre RPGR y una proteína ciliar con dominio IQ, la nefrocistina-5 o IQCB1 (Otto *et al.*, 2005). Las interacciones de RPGR^{ORF15} con proteínas de mantenimiento estructural de los cromosomas localizadas en el axonema del cilio conector –SMC1 o SMC3– y con proteínas involucradas en el transporte mediado por microtúbulos –IFT88, kinesinas y dineínas– implican a esta isoforma de RPGR en la regulación del transporte ciliar (Khanna *et al.*, 2005). Un modelo de ratón deficiente para RPGR permitió comprobar como la ausencia de esta proteína provocaba la distribución ectópica de las opsinas (Hong *et al.*, 2000). Por lo tanto, RPGR estaría implicada en el mantenimiento de la distribución polarizada de proteínas a través del cilio conector, bien facilitando el transporte direccional, bien restringiendo la redistribución de la opsinas desde el segmento externo hacia el interno. Esta esencial función explicaría porque la expresión de la enfermedad esta limitada a la retina, a pesar de la amplia distribución de RPGR por los diferentes tejidos. Todo esto redundaría en la localización de RPGR en el cilio conector de los fotorreceptores. Defectos en el gen *RPGR* pueden inducir –además de RP– pérdida auditiva, sinusitis e infecciones crónicas recurrentes del tracto respiratorio (Iannaccone *et al.*, 2003; Zito *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2006). Dichas manifestaciones clínicas ponen de relieve la función ciliar de RPGR en tejido no retinal.


El primer análisis mutacional de *RPGR* realizado por Meindl *et al.* reveló la presencia de varias mutaciones responsables de XIRP ligada a RP3 (Meindl *et al.*, 1996). Estudios posteriores definieron nuevas mutaciones en *RPGR* asociadas a XIRP (Buraczynska *et al.*, 1997; Fujita *et al.*, 1997; Jacobson *et al.*, 1997; Bauer *et al.*, 1998; Fishman *et al.*, 1998a; Fishman *et al.*, 1998b; Dry *et al.*, 1999; Kirschner *et al.*, 1999; Miano *et al.*, 1999; Zito *et al.*, 1999; Sharon *et al.*, 2003b; Demirci *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2005; García-Hoyos *et al.*, 2006; Pelletier *et al.*, 2007; Shu *et al.*, 2007).

Los análisis de ligamiento realizados en familias con XIRP demostraron que un 70-75% de las familias cosegregaban con RP3 (Ott *et al.*, 1990; Buraczynska *et al.*, 1997; Miano *et al.*, 1999). Sin

embargo, las mutaciones encontradas en *RPGR* no justificaban un número tan elevado de casos. La posibilidad de un nuevo gen responsable de RP en este locus, o la presencia de mutaciones en regiones desconocidas de *RPGR*, explicaban la discrepancia entre la proporción de familias ligadas a RP3 y las familias que poseían mutaciones en *RPGR* (Buraczynska *et al.*, 1997). La secuenciación de una región de 172 Kb –conteniendo todo el gen *RGPR*– permitió reconocer un nuevo exón alternativo terminal (ORF15) en el extremo 3' (Vervoort *et al.*, 2000). ORF15 contiene al exón 15 y parte del intrón 15, codifica 567 aminoácidos y posee un dominio repetitivo rico en residuos de ácido glutámico y glicina. El análisis de ORF15 reveló la presencia de mutaciones en el 60% de los individuos con XIRP. La elevada proporción de mutaciones encontradas en este exón, en comparación con otras partes del gen, indica que ORF15 es un hot spot mutacional (Vervoort *et al.*, 2000). Numerosos estudios han reflejado mutaciones en ORF15 responsables de XIRP (Vervoort *et al.*, 2000; Yokoyama *et al.*, 2001; Aguirre *et al.*, 2002; Pusch *et al.*, 2002; Bader *et al.*, 2003; Koenekoop *et al.*, 2003; Rebello *et al.*, 2003; Zito *et al.*, 2003; Sharon *et al.*, 2003b; García-Hoyos *et al.*, 2006; Aleman *et al.*, 2007; Pelletier *et al.*, 2007; Shu *et al.*, 2007), de XICORD (Mears *et al.*, 2000; Demirci *et al.*, 2002; Sharon *et al.*, 2003b; Ebenezer *et al.*, 2005), de XldRP (Rozet *et al.*, 2002), de XICOD (Yang *et al.*, 2002), de XIRP asociada a vasculopatía exudativa similar a la de Coats (Demirci *et al.*, 2006) o de XlrAMD (*Atrophic Macular Degeneration*) (Ayyagari *et al.*, 2002). Aunque XIRP suele afectar solamente a hombres, varias mutaciones de *RPGR* –particularmente en ORF15– pueden causar sintomatología en las mujeres portadoras, simulando un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia incompleta (Mears *et al.*, 2000; Rozet *et al.*, 2002).

Mutaciones en el gen *RPGR* representan un 74,2% de los casos de XLRP (Daiger *et al.*, 2007). Estas mutaciones se encuentran en los exones 1 a 14 y, principalmente, en el exón ORF15 (Vervoort y Wright, 2002). No se han encontrado mutaciones en los exones 16 a 19 –incluyendo los exones alternativos ORF14, 15a, 15b1 y 15b2 por lo que no parecen ser necesarios para la normal función de la proteína en la retina. Esto contrasta con la gran cantidad de mutaciones que posee ORF15, indicando que *RPGR*^{ORF15} puede ser la isoforma más funcional del gen (Hong y Li, 2002).

I.4.7.1.3. Proteína RP1



Símbolo: <i>RP1</i> (OMIM: *603937)	Proteína codificada: 4 exones, 2156 a.a.
Otros alias: <i>ORP1</i>	Función: Transporte de proteínas
Región cromosómica: 8q12.1	Especificidad de tejido: Retina
Posición: 55691180-55705947	Localización subcelular: Cilio conector
Patologías asociadas: adRP, arRP	Propiedades: Primera MAP descrita en fotorreceptores

El locus RP1 fue localizado en la región pericentromérica del 8q mediante un análisis de ligamiento en una familia norteamericana con adRP (Blanton *et al.*, 1991). Diferentes grupos de investigación anunciaron, de forma simultánea, la identificación del gen causal contenido en RP1 (Guillonneau *et al.*, 1999; Pierce *et al.*, 1999; Sullivan *et al.*, 1999). La proteína codificada por *RP1* presentaba un posible dominio transmembrana, un motivo de cremallera de leucina, una región homóloga con la proteína BIF de *Drosophila melanogaster* y una región N-terminal con homología a la proteína asociada a microtúbulos (MAP) doblecortina humana (DCX) –involucrada en la migración neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso central– (Pierce *et al.*, 1999).

La presencia de RP1 en el cilio conector de bastones y conos sugirió su posible implicación en el transporte de proteínas desde el segmento interno hacia el externo (Liu *et al.*, 2002). Aparte de esta función, RP1 podría estar implicada en la regulación de la dinámica de los microtúbulos, el mantenimiento de la estructura y orientación del cilio conector o el bloqueo de difusión entre ambos segmentos del fotorreceptor. El examen de la retina del modelo murino *Rp1*^{-/-} evidenció la desorganización de los segmentos externos, la disposición anormal de la rodopsina en los segmentos internos y cuerpos celulares y la progresiva degeneración de los fotorreceptores (Gao *et al.*, 2002). Todo ello compatible con las sugerencias establecidas por Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2002). Otro modelo de ratón, portador en homocigosis de una mutación en *Rpl* (*Rpl*^{myc/myc}), mostró como grupos de 20-40 discos anormalmente largos se disponían de forma paralela u oblicua al eje longitudinal del segmento externo, causando la rápida degeneración del fotorreceptor (Liu *et al.*, 2003). Tal observación implicó a *Rp1* en la organización de los discos del segmento externo.

Posteriormente, se demostró que RP1 formaba parte del axonema e interactuaba con los microtúbulos a través del dominio DCX, controlando su longitud y estabilidad (Liu *et al.*, 2004). Estas afirmaciones ratificaban que RP1 era la primera MAP identificada en los fotorreceptores. Es posible que RP1 interactúe con miembros de las cascadas de señalización mediadas por JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) (Liu *et al.*, 2005). En tal caso, se establecería una relación bidireccional en la que RP1 podría ser fosforilada y, por lo tanto, regulada por JNK; al mismo tiempo que poseería una regulación por feedback sobre JNK. Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el cual JNK regula a

RP1 o como mutaciones en *RP1* pueden reducir específicamente las vías de señalización mediadas por JNK, originando un anormal patrón de expresión de genes.

Tras el cribado mutacional de *RP1* realizado por Sullivan *et al.*, Pierce *et al.* y Guillonnet *et al.*, numerosos autores han detallado toda una serie de nuevas mutaciones de este gen asociadas a adRP (Bowne *et al.*, 1999; Jacobson *et al.*, 2000; Payne *et al.*, 2000; Berson *et al.*, 2001; Dietrich *et al.*, 2002; Kawamura *et al.*, 2004; Gamundi *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2006) o arRP (Khaliq *et al.*, 2005; Riazuddin *et al.*, 2005).

Las mutaciones del gen *RP1* representan el 3,5% de los casos de adRP (Sullivan *et al.*, 2006a) y <1% de los de arRP (Hartong *et al.*, 2006).

I.4.7.1.4. Proteína RP2

Símbolo: <i>RP2</i> (OMIM: +312600)	Proteína codificada: 5 exones, 350 a.a.
Otros alias: O75695	Función: Estimula la actividad GTPasa de la tubulina
Región cromosómica: Xp11.3	Especificidad de tejido: Ubicua
Posición: 46581319-46626733	Localización subcelular: Membrana celular
Patologías asociadas: XIRP	Propiedades: Interactúa con Arl3 unido a GTP

En 1996, Thiselton *et al.* redefinían la extensión del locus RP2 a un intervalo de 5 cM restringido a la región cromosómica Xp11.3-p11.23 (Thiselton *et al.*, 1996). El escrutinio de este intervalo en 26 individuos afectados de XIRP –con el fin de reconocer posibles reordenamientos cromosómicos submicroscópicos– detectó la retrotransposición de un elemento LINE1 completo en uno de los sujetos analizados (Schwahn *et al.*, 1998). Este elemento se insertaba en un intrón de un gen desconocido expresado en retina y otros tejidos analizados. El análisis de este nuevo gen demostró que estaba mutado en seis pacientes con XIRP. Esta evidencia confirmó a dicho gen como el responsable de RP en el locus RP2.

La proteína codificada por el gen *RP2* muestra un tramo de 39 aminoácidos altamente hidrofílicos, seguidos de un dominio con homología al cofactor C humano (Schwahn *et al.*, 1998). Estudios previos sugieren que el cofactor C es una chaperona que puede asociarse a los microtúbulos, por lo que es considerada como una MAP (*Microtubule-Associated Protein*) (Tian *et al.*, 1996). Este cofactor está involucrado en el correcto plegamiento de la molécula de β -tubulina y su asociación con la α -tubulina para formar los heterodímeros constitutivos de los microtúbulos. RP2, al igual que el cofactor C, puede estimular la actividad GTPasa de la β -tubulina (GAP-tubulina) en presencia del cofactor D (Bartolini *et al.*, 2002). Sin embargo, la heterodimerización de las subunidades de tubulina es competencia exclusiva del cofactor C. Mientras que Arl2 –*ADP ribosylation factor (ARF)-like 3*; una pequeña proteína de unión a GTP relacionada con Ras– es responsable de regular la función GAP-

tubulina ejercida por los cofactores C y D, Arl3 –unida específicamente a RP2– no modula tal función cuando es realizada por RP2 y el cofactor D. La mutación del único residuo de arginina conservado común entre RP2 y cofactor C (R118H en RP2 y R262A en el cofactor C), causa la pérdida de la función GAP-tubulina de ambas moléculas, contribuyendo a la degeneración de la retina. La gran similitud mostrada por RP2 con respecto al cofactor C indica su probable implicación en la biogénesis de tubulina.

Además, RP2 contiene sitios putativos de modificación acílica N-terminal mediante miristoilación y palmitoilación (Chapple *et al.*, 2000). La modificación acílica permite la asociación de RP2 con la membrana plasmática de las células de la retina (Grayson *et al.*, 2002). Por el contrario, la distribución del cofactor C se limita al citoplasma y el cilio conector, mientras que Arl3 se localiza en el cilio conector y otras estructuras microtubulares. La asociación entre Arl3 y los microtúbulos, junto con su localización en la membrana plasmática, sugieren que RP2 podría ser un nexo de unión entre la membrana y el citoesqueleto, facilitando el tráfico de membrana o los procesos de señalización celular. Mutaciones en los sitios de acilación –situados entre los 15 primeros aminoácidos N-terminales de RP2– ocasionarían la uniforme distribución citoplasmática de la proteína (Chapple *et al.*, 2000; Schwahn *et al.*, 2001). En células COS-7 y HeLa, las mutaciones en RP2 que causan el truncado del extremo C-terminal (2/3 de las variantes patogénicas) provocan la irregular diseminación de la proteína por el citoplasma (Schwahn *et al.*, 2001). Estas formas truncadas de la proteína serían eliminadas por la célula. La pérdida de la proteína y/o su errónea distribución intracelular podrían ser la base de la degeneración de los fotorreceptores en la mayoría de los casos de RP causados por mutaciones en *RP2*.

RP2 también posee una región con homología al dominio N-terminal de nucleósido difosfato kinasas (NDKs), requeridas para la síntesis de nucleósidos trifosfato (Miano *et al.*, 2001). Además de esta función, este dominio presenta actividad exonucleasa 3'-5', sugiriendo la posible implicación de RP2 en procesos de reparación de DNA (Yoon *et al.*, 2006).

Después del análisis mutacional efectuado por Schwahn *et al.* en *RP2* han sido identificadas nuevas mutaciones relacionadas con XIRP (Hardcastle *et al.*, 1999; Mears *et al.*, 1999; Mashima *et al.*, 2000; Sharon *et al.*, 2000; Thiselton *et al.*, 2000; Wada *et al.*, 2000; De Luca *et al.*, 2001; Miano *et al.*, 2001; Breuer *et al.*, 2002; Bader *et al.*, 2003; Sharon *et al.*, 2003b; Dandekar *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Pelletier *et al.*, 2007). Las mutaciones halladas en RP2 explican un 15,1% de los casos de XIRP (Daiger *et al.*, 2007).

I.4.7.1.5. Fascina retinal

Símbolo: <i>FSCN2</i> (OMIM: *607643)	Proteína codificada: 4 exones, 516 a.a.
Otros alias: <i>RFSN</i>	Función: Morfogénesis de los discos
Región cromosómica: 17q25.3	Especificidad de tejido: Retina
Posición: 77110012-77114632	Localización subcelular: Segmentos interno y externo
Patologías asociadas: adRP, adMD	Propiedades: Posee una variante proteica de 492 a.a.

En un intento por encontrar nuevos genes específicos de la retina, Saishin *et al.* aislaron un cDNA que contenía la secuencia de un nuevo miembro de la familia génica de las fascinas (Saishin *et al.*, 1997). Las fascinas –proteínas agrupadoras de actina– se entrecruzan con la F-actina formando haces enormemente ordenados en el interior de las extensiones celulares dinámicas (p.e: los filopodios de los conos de crecimiento neuronal) (Tubb *et al.*, 2000). Este nuevo gen, parálogo del gen Fascina (*FSCN1*), se denominó Fascina retinal (*FSCN2*) por su exclusiva expresión en retina (Saishin *et al.*, 1997; Tubb *et al.*, 2000). Más específicamente, su expresión está limitada a los segmentos interno y externo de los fotorreceptores (Saishin *et al.*, 2000). La localización cromosómica de *FSCN2* se determinó mediante FISH, ubicándolo en 17q25 (Tubb *et al.*, 2000). *FSCN2* no tiene una función totalmente definida. Sin embargo, la implicación de otras fascinas en la construcción de estructuras intracelulares sugiere que *FSCN2* puede estar relacionada con el ensamblaje de filamentos de actina en soporte a la morfogénesis de los discos.

Los análisis mutacionales de *FSCN2* mostraron que la mutación 208delG está asociada a adRP (Wada *et al.*, 2001) y a adMD (Wada *et al.*, 2003). Mediante la construcción de un modelo murino portador de la mutación 208delG en heterocigosis, se pudo comprobar que la haploinsuficiencia del gen de la *FSCN2* transtorna el mantenimiento y/o elongación de los discos del segmento externo, conduciendo a la degeneración del fotorreceptor (Yokokura *et al.*, 2005). También se han encontrado varios polimorfismos responsables de cambios aminoacídicos, pero no cosegregan con ninguna de las dos patologías (Gamundi *et al.*, 2005; Sullivan *et al.*, 2006a). Mutaciones en *FSCN2* representan <1% de los casos de adRP (Sullivan *et al.*, 2006a).

I.4.8. Genes responsables de RP con función desconocida

En este grupo se han incluido aquellos genes responsables de RP cuya función es desconocida o no está bien definida.

I.4.8.1. Inosina 5' monofosfato deshidrogenasa 1

Símbolo: <i>IMPDH1</i> (OMIM: *146690)	Proteína codificada: 17 exones, 514 a.a.
Otros alias: <i>IMPD1</i>	Función: Biosíntesis de nucleótidos guanina
Región cromosómica: 7q32.1	Actividad catalítica: $\text{IMP} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{XMP} + \text{NADH}$
Posición: 127819567-127837272	Especificidad de tejido: Ampliamente expresada
Patologías asociadas: adRP, adLCA	Propiedades: Homotetrámero

IMP, Inosina 5' monofosfato; XMP, Xantosina 5' monofosfato

El uso de marcadores microsatélite en un análisis de ligamiento de una familia española permitió que Jordan *et al.* localizaran un nuevo locus para adRP (RP10) en 7q31-q35 (Jordan *et al.*, 1993). La combinación de estos resultados con los de otro análisis de ligamiento de una familia americana ligada a RP10, consiguió disminuir la extensión inicial del locus a un intervalo de ~5 cM (McGuire *et al.*, 1996). El análisis de una tercera familia con adRP redujo el tamaño de la región crítica a 1 cM, un intervalo físico de ~1,7 Mb.

Un análisis comparativo de la expresión de ~6000 genes –mediante microarrays– en retinas de ratones salvajes y retinas de ratones a los que se le había delecionado el gen de la rodopsina (*Rho*^{-/-}), reveló una serie de transcritos cuyos niveles estaban reducidos en las retinas de los ratones *Rho*^{-/-} (Kennan *et al.*, 2002). El homólogo humano de uno de estos genes codificaba la Inosina 5' monofosfato deshidrogenasa tipo I humana (*IMPDH1*), un enzima esencial en la síntesis de ribonucleótidos de guanina. *IMPDH1*, previamente asignado a la región cromosómica 7q31.3-q32 (Gu *et al.*, 1994), se localizaba dentro del locus RP10. El análisis mutacional de *IMPDH1* en la citada familia española reflejó la presencia de una mutación en el exón 7 (Arg224Pro) cosegregando con adRP (Kennan *et al.*, 2002). En otro estudio, se comparó la expresión de genes en retinas de ratones normales con retinas de ratones *knockout* para *crx* (*crx*^{-/-}) (Bowne *et al.*, 2002). Los datos obtenidos mostraron como la expresión de uno de los transcritos (*IMPDH1*) estaba disminuida 6 veces con respecto a los niveles normales. La secuenciación de *IMPDH1* reflejó una mutación en el exón 7 (Asp226Asn) presente en todos los individuos afectados de tres familias no relacionadas con adRP ligada a RP10 y en ninguno de los controles.

Inicialmente, se consideró que el mal plegamiento y la agregación de la proteína *IMPDH1* mutada –más que por su reducida actividad enzimática– eran responsables del severo fenotipo

patológico apreciado en los individuos afectados (Aherne *et al.*, 2004). Sin embargo, Mortimer *et al.* demostraron que las mencionadas mutaciones no tenían efectos sobre la actividad enzimática, la estabilidad de la proteína o su agregación (Mortimer y Hedstrom, 2005). Aunque si encontraron que disminuían la afinidad de la unión con ácidos nucleicos y la capacidad de asociación con el RNA. Tal observación indicaba que las mutaciones alteraban al subdominio con función no definida de la proteína IMPDH1 (McLean *et al.*, 2004). Aunque IMPDH1 se expresa en muchos tejidos, los altos niveles de isoformas específicas de esta proteína en los fotorreceptores sugieren que la degeneración de la retina es secundaria a la pérdida de función de una o más de estas isoformas (Bowne *et al.*, 2006a). Sin embargo, la mutación responsable de la alterada función de las isoformas no tiene porque afectar a la actividad enzimática de la forma canónica de IMPDH1, mucho menos expresada en retina.

Posteriores estudios detallaron nuevas mutaciones de *IMPDH1* cosegregando con adRP (Grover *et al.*, 2004; Wada *et al.*, 2005) o adLCA (Bowne *et al.*, 2006b). Mutaciones en *IMPDH1* explican el 2,5% de los casos de adRP (Sullivan *et al.*, 2006a) y ~1% de los de adLCA (Daiger *et al.*, 2007).

I.4.8.2. Anhidrasa carbónica IV

Símbolo: <i>CA4</i> (OMIM: *114760)	Proteína codificada: 8 exones, 312 a.a.
Otros alias: <i>CA IV</i>	Función: Hidratación reversible del dióxido de carbono
Región cromosómica: 17q23.1	Actividad catalítica: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$
Posición: 55582131-55591686	Especificidad de tejido: Endotelio de los coriocapilares
Patologías asociadas: adRP	Localización subcelular: Membrana celular

En 1997, Bardien *et al.* redefinieron la localización del locus RP17 a 17q22 (Bardien *et al.*, 1997). El análisis de ligamiento realizado en dos familias sudafricanas con adRP situó a RP17 en un intervalo de 10 cM definido por los marcadores D17S1607 y D17S1874. Posteriormente, mediante un análisis de ligamiento en una familia danesa con adRP, den Hollander *et al.* recortaron la extensión de este locus a un intervalo de 7,7 cM delimitado por D17S1607 y D17S948 (den Hollander *et al.*, 1999b). No obstante, Bardien-Kruger *et al.* volverían a rebajar la extensión de RP17 gracias a los datos obtenidos del análisis de ligamiento de dos nuevas familias, acotando una región de 1 cM comprendida entre D17S1604 y D17S948 (Bardien-Kruger *et al.*, 1999). La secuenciación de genes candidatos de esta región reveló que uno de ellos –*CA4*– contenía una mutación que causaba un cambio aminoacídico en el codón 14 (R14W) (Rebello *et al.*, 2004). Esta mutación cosegregaba con el fenotipo patológico en dos familias con adRP y no se encontró en ninguno de los controles, confirmando que *CA4* era el gen responsable de RP contenido en RP17.

CA4 codifica un enzima que se ancla a la membrana plasmática a través de glicosilfosfatidilinositol (Waheed *et al.*, 1992). *CA4* se expresa en la superficie luminal de los capilares pulmonares y de los túbulos renales proximales (Brown *et al.*, 1990; Zhu y Sly, 1990). También tiene una elevada expresión en los coriocapilares, pero no es detectable en neuroretina (Hageman *et al.*, 1991). Rebello *et al.* han propuesto que la mutación R14W provoca la acumulación de formas no plegadas de la proteína en el retículo endoplasmático (ER) de las células endoteliales de los coriocapilares (Rebello *et al.*, 2004). Esto ocasionará el stress del ER, el cual inducirá la respuesta de proteínas no plegadas (UPR, *Unfolded Protein Response*) por parte de la célula. El stress crónico al que está sometido el ER causará la apoptosis de las células endoteliales, generando la isquemia de la retina y su consiguiente degeneración. Experimentos realizados en células COS-7 transfectadas con el alelo mutado R14W de *CA4*, han demostrado que el uso de ciertos inhibidores de la anhidrasa carbónica promueve el plegamiento de la proteína mutada y reduce los efectos apoptóticos ocasionados por la mutación (Bonapace *et al.*, 2004).

Por otro lado, mutaciones en *CA4* pueden causar la alteración de la regulación del pH efectuada por el complejo *CA4/NCB1*, induciendo la degeneración del fotorreceptor (Yang *et al.*, 2005). El mantenimiento del pH en el interior del fotorreceptor es vital para la fototransducción. Sin embargo, estas células contienen una alta carga ácida (ácido láctico, CO_2 , HCO_3^- o H^+) resultado de su elevada tasa metabólica. La eliminación de estos ácidos de la retina y el RPE por el flujo sanguíneo de los coriocapilares previene el descenso de pH en el interior del fotorreceptor. En la membrana de las células endoteliales de los coriocapilares, *CA4* se acopla funcionalmente con *NCB1* (*Na⁺/Bicarbonate Co-Transporter 1*) formando un complejo que produce HCO_3^- para el transporte a través de la membrana y, a su vez, consume HCO_3^- que le llega a través de la membrana. *NCB1* sería el encargado del transporte de HCO_3^- , mientras que *CA4* sería la responsable de la actividad catalítica del complejo.

Las mutaciones de *CA4* representan <1% de los casos de adRP (Sullivan *et al.*, 2006a).

I.4.8.3. Proteína similar a ceramida kinasa

Símbolo: <i>CERKL</i> (OMIM: *608381)	Proteína codificada: 13 exones, 532 a.a.
Otros alias: <i>Q49MI3-2</i>	Función: Desconocida
Región cromosómica: 2q31.3	Especificidad de tejido: Retina, cerebro, hígado, riñón ...
Posición: 182109650-182229996	Localización subcelular: Citoplasma, Núcleo, Nucleolo
Patologías asociadas: arRP	Propiedades: No fosforila a la ceramida

Mediante análisis de cosegregación y mapeo de homocigosidad con marcadores microsatélites y SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), Tusón *et al.* consiguieron reducir la extensión inicial del locus RP26 (2q31.2-q32.3) de 17,4 Mb hasta 2,5 Mb (Tusón *et al.*, 2004). Ninguno de los 5 genes

descritos o los 4 mRNAs parcialmente caracterizados contenidos en este intervalo mostraba variantes patogénicas en su secuencia. Sin embargo, la búsqueda exhaustiva en las bases de datos para localizar cDNAs no caracterizados o ESTs dentro en esta región, concluyó con el hallazgo de dos secuencias relacionadas: una EST y un cDNA incompleto de ojo/retinoblastoma. La proteína supuestamente codificada por estas dos secuencias mostraba homología con las ceramidas de eucariotas, la esfingosina y las diacilglicerol kinasas, sugiriendo que ambas secuencias correspondían a un gen no descrito hasta el momento. Esta proteína mostraba su mayor homología con la ceramida kinasa humana (CERK) (Sugiura *et al.*, 2002), por lo que el gen fue denominado *CERKL* (*Ceramide Kinase-Like*). La secuenciación de *CERKL* en los miembros de la familia donde se había descrito el locus RP26 reflejó una mutación en el exón 5 (R257X), la cual truncaba el dominio catalítico de la proteína (Tusón *et al.*, 2004). R257X se encontró en homocigosis en todos los individuos afectados de esta familia y en ninguno de los 170 controles. Esta observación confirmó que *CERKL* era el gen responsable de RP contenido en el locus RP26.

En humanos, *CERKL* se expresa en varios tejidos y entre ellos la retina (Tusón *et al.*, 2004). Mediante hibridación *in situ* en cortes de retina de ratón adulto, se comprobó que la expresión predominante de *Cerkl* se localiza en la capa de células ganglionares. Sin embargo, también se detecta una débil señal en la capa nuclear interna y la de fotorreceptores. Las ceramida kinasas convierten el metabolito esfingolípido ceramida en ceramida 1-fosfato (Sugiura *et al.*, 2002). Mientras que ceramida induce la apoptosis, ceramida 1-fosfato actúa como un citoprotector (Frago *et al.*, 2003). Por lo tanto, la deficiencia de *CERKL* podría variar los niveles de metabolitos esfingolípidicos e incrementar la sensibilidad del fotorreceptor y otras células de la retina hacia el estímulo apoptótico (Tusón *et al.*, 2004). El aumento de susceptibilidad hacia la apoptosis conduciría a la progresiva depleción de los fotorreceptores y, finalmente, a la ceguera.

Sin embargo, el mecanismo por el cual *CERKL* conduce a la degeneración de los fotorreceptores es muy discutido. Bornancin *et al.* han propuesto que la causa de la RP en individuos portadores de la mutación R257X en *CERKL* se debe a la acumulación de la proteína truncada en el núcleo (Bornancin *et al.*, 2005). Según estos autores, *CERKL* es una proteína que ejerce su actividad enzimática en el nucleolo. Mutaciones en *CERKL* podrían impedir su salida del núcleo, imposibilitando su normal función. Posteriormente, German *et al.* han afirmado que la ceramida es un mediador de la apoptosis en los fotorreceptores (German *et al.*, 2006). En estas células, el stress oxidativo incrementaría los niveles ceramida endógena al estimular la vía de biosíntesis *de novo*, aumentando la señal para entrar en apoptosis. El ácido docosahexanoico (DHA, el más abundante ácido graso poliinsaturado de la retina) protegería al fotorreceptor del stress oxidativo y del daño inducido por la ceramida, incrementando la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y glicosilando a la ceramida para prevenir su acumulación. Recientemente, Inagaki *et al.* han identificado una señal de localización nuclear (NLS, *Nuclear Localization Signal*) en la forma mutada de *CERKL* R257X (Inagaki *et al.*, 2006). La forma no mutada de *CERKL* se localiza en el núcleo y el

citoplasma. Mutaciones en la región NLS impiden que la proteína penetre en el núcleo, puesto que es demasiado grande para entrar por difusión pasiva. Estos autores han sugerido, además, que CERKL puede ser retenida en el nucleolo mediante una señal de localización nucleolar (NoLS).

Mutaciones en *CERKL* representan en torno al 1% de los casos de arRP (Hartong *et al.*, 2006).

I.4.8.4. Semaforina 4A

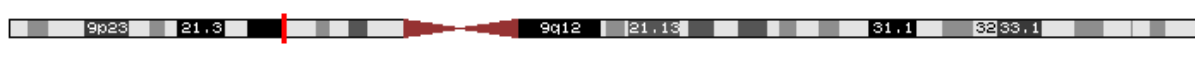
Símbolo: <i>SEMA4A</i> (OMIM: *607292)	Proteína codificada: 15 exones, 760 a.a.
Otros alias: <i>SEMAB</i>	Función: Inhibe la extensión axonal
Región cromosómica: 1q22	Especificidad de tejido: Retina y cerebro
Posición: 154390012-154414158	Localización subcelular: Membrana
Patologías asociadas: adRP, arRP, arCORD	Propiedades: Contiene un dominio sema

Las semaforinas comprenden una gran familia de proteínas filogenéticamente conservadas que pueden ser secretadas o permanecer unidas a la membrana (Fiore y Puschel, 2003). Aunque se las conoce por su importante función como repelentes axonales, las semaforinas han sido relacionadas con otros mecanismos biológicos como la organogénesis, la angiogénesis, la apoptosis de las neuronas, la transformación neoplásica y acciones en el sistema inmune (Pasterkamp y Kolodkin, 2003). Una de estas semaforinas, SEMA4A, –expresada en células dendríticas y células B– potencia la activación y la diferenciación de las células T *in vitro* y la generación de células T específicas de antígeno *in vivo* (Kumanogoh *et al.*, 2002).

Basándose en la tecnología *High-throughput retroviral gene-trapping*, Rice *et al.* generaron una mutación en el gen *sema4A* murino (Rice *et al.*, 2004). Los ratones portadores de esta mutación en homocigosis presentaban graves defectos en los fotorreceptores, los cuales morían antes del primer mes de vida. Esta precoz degeneración indicaba que Sema4A era esencial para el desarrollo de bastones y conos. Probablemente, Sema4A funcione como un ligando transmembrana para un receptor presente en los fotorreceptores.

El análisis mutacional del gen *SEMA4A* realizado en 190 individuos afectados de RP, CORD o LCA mostró la presencia de 3 mutaciones: D345H, F350C y R713Q (Abid *et al.*, 2006). La combinación de D345H y F350C –heterocigotos compuestos– se localizó en dos individuos con CORD y en otros dos con RP. La mutación R713Q se encontró en un individuo con ceguera congénita y en tres con RP. En los cuatro casos el patrón de herencia de la mutación era autosómico dominante. No se detectó ninguna de estas tres mutaciones en los 100 individuos control ni en los individuos no afectados analizados. Las mutaciones en *SEMA4A* explican <1% de los casos de adRP (Hartong *et al.*, 2006).

I.4.8.5. Proteína rica en arginina y serina de unión a Topoisomerasa I

	
Símbolo: <i>TOPORS</i> (OMIM: *609507)	Proteína codificada: 3 exones, 1045 a.a.
Otros alias: <i>P53BP3</i>	Función: ligasa E3 de ubiquitina y ligasa E3 de SUMO1
Región cromosómica: 9p21.1	Especificidad de tejido: Ampliamente expresada
Posición: 32530542-32542601	Localización subcelular: Núcleo
Patologías asociadas: adRP	Propiedades: Interactúa con p53, PARK7/DJ-1, Top1

Tras haber descartado los posibles loci responsables de RP en una familia francocanadiense, Papaioannou *et al.* describieron un nuevo locus (RP31) localizado en la región cromosómica 9p22-p13 (Papaioannou *et al.*, 2005). RP31 estaba flanqueado por los marcadores D9S285 y D9S1874, separados a una distancia genética de 31 cM (~22 Mb). La aproximación por clonación posicional –junto con el uso de la bioinformática– permitió identificar al gen *TOPORS* (*Topoisomerase I-binding RS protein*) como el responsable de RP contenido en el locus RP31 (Chakarova *et al.*, 2007). El escrutinio de este gen en busca de mutaciones causales evidenció el hallazgo de dos variantes patogénicas en dos familias afectadas de adRP. En la familia francocanadiense antes mencionada se halló una inserción heterocigota de 1 pb en el exón 3. Y en otra familia alemana se localizó una deleción de 2 pb en el exón 3. Ambas mutaciones provocaban un cambio de pauta e introducían un codón de terminación prematuro. Ninguna de estas mutaciones se encontró entre los 200 individuos control analizados.

TOPORS se expresa en muchos tejidos humanos, incluyendo la retina (Chakarova *et al.*, 2007). Esta proteína contiene un dominio RS (rico en arginina y serina), el cual está implicado en el splicing de pre-mRNA. Además, este dominio puede estar relacionado con el remodelado de la cromatina, la transcripción por RNA polimerasa II y la progresión del ciclo celular. La ausencia de la forma mutada de *TOPORS* en los individuos afectados sugiere que la haploinsuficiencia –más que un efecto dominante negativo– es la base molecular de la patología.

I.4.8.6. Homólogo de la proteína canina de degeneración progresiva de conos y bastones

Símbolo: <i>PRCD</i> (OMIM: *610598)	Proteína codificada: 4 exones, 54 a.a.
Otros alias: <i>CR600312</i>	Función: Desconocida
Región cromosómica: 17q25.1	Especificidad de tejido: Retina, RPE, células ganglionares
Posición: 72047767-72052047	Localización subcelular: Citoplasma
Patologías asociadas: arRP	Propiedades: Sitios de unión a CRX en el 5' UTR

En 1998, Acland *et al.* describieron un locus asociado a degeneración progresiva de bastones y conos (*prcd*) cerca de la región centromérica del cromosoma 9 canino (Acland *et al.*, 1998). Esta región cromosómica canina resultó ser ortóloga al extremo telomérico del brazo largo del cromosoma 17 humano (Bardien *et al.*, 1997; Acland *et al.*, 1998). En los perros, *prcd* se hereda como un carácter autosómico recesivo y causa un fenotipo equivalente al de la RP en humanos (Acland *et al.*, 1998).

Mediante análisis de desequilibrio de ligamiento, se logró reducir la extensión inicial del locus (~6,4 Mb) hasta 106 Kb (Goldstein *et al.*, 2006). El examen de una librería de ESTs de retina de perros identificó varios cDNAs parciales de posibles genes candidatos contenidos en el intervalo de interés (Zangerl *et al.*, 2006). El cDNA completo de uno de estos genes –*PRCD*– pudo ser clonado en perro, ratón y hombre. *PRCD* codifica una proteína de 54 aminoácidos en perro y hombre y una de 53 en ratón. Los 24 primeros aminoácidos de esta proteína –codificados por el exón 1– están altamente conservados en 14 especies de vertebrados. *PRCD* se expresa en retina, RPE y células ganglionares. Habitualmente, esta proteína se difunde por todo el citoplasma, aunque se ha podido comprobar que la forma mutada constituye agregados esféricos. Este anormal patrón de localización de *PRCD* puede resultar perjudicial para la función y/o interacciones con otras proteínas.


El análisis mutacional del gen *PRCD* canino mostró la transición de una G por una A en el nucleótido 5, provocando el cambio de una cisteína por una tirosina en el codón 2 (Zangerl *et al.*, 2006). Esta mutación se encontró en homocigosis en todos los perros afectados de *prcd* analizados y en ninguno de los controles. La misma mutación se halló –también en homocigosis– en un individuo humano afectado de arRP.

Actualmente, la función de *PRCD* es una absoluta incógnita. Sin embargo, su alta conservación entre vertebrados y la aparente ausencia de genes homólogos en invertebrados sugieren que puede estar relacionado con la estructura del fotorreceptor o el metabolismo de estas células (Zangerl *et al.*, 2006).

I.4.9. Los loci huérfanos de la RP

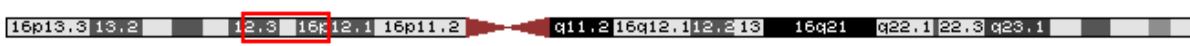
En este apartado se recogen los 10 locus asociados a RP en los cuales todavía no ha sido identificado el gen responsable. De estos, 5 corresponden a la forma autosómica recesiva de RP, 4 a la ligada al cromosoma X y 1 a la autosómica dominante (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>).

I.4.9.1. RP6 (OMIM: %312612)

	
Región cromosómica: Xp21.3-p21.2	Delimitado por: DXS28 y DXS164
Extensión: ~4,36 Mb	Modo de herencia: Ligado al cromosoma X


Con la intención de reconocer la posible heterogenidad de la XIRP y determinar con precisión la localización de los loci, Ott *et al.* realizaron un análisis de ligamiento multilocus en 62 familias afectadas (Ott *et al.*, 1990). Los resultados obtenidos confirmaron la presencia de los dos locus previamente conocidos: RP2 y RP3. Pero, además, sugerían la posible existencia de un tercer locus situado entre RP3 y el telómero. Sin embargo, esta conclusión no estaba tan respaldada por los datos como en el caso de los otros dos locus.

I.4.9.2. RP22 (OMIM: %602594)

	
Región cromosómica: 16p12.3-p12.1	Delimitado por: D16S287 y D16S420
Extensión: ~6,42 Mb	Modo de herencia: Autosómico recesivo


Mediante análisis de ligamiento y mapeo de homocigosidad en 2 familias consanguíneas de la India con arRP, se identificó una región cromosómica homocigota que cosegregaba con RP (Finckh *et al.*, 1998). Este nuevo locus –con una extensión de 16 cM– se localizó en el brazo corto del cromosoma 16. En un intento por encontrar el gen causal contenido en este locus, estos autores secuenciaron el gen *CRYM* –codifica la cristalina μ – pero no hallaron ninguna variante patogénica en su secuencia.

I.4.9.3. RP23 (OMIM: %300424)

	
Región cromosómica: Xp22	Delimitado por: DXS1223 y DXS7161
Extensión: ~10,51 Mb	Modo de herencia: Ligado al cromosoma X


Un estudio con más de 34 marcadores microsatélites distribuidos a lo largo del cromosoma X mostró la cosegregación de un nuevo locus y RP en una familia con un fenotipo atípico de XIRP (Hardcastle *et al.*, 2000). Este nuevo locus se localizó en Xp22, abarcando una distancia genética de 15 cM. La secuenciación del principal gen candidato para RP en esta familia, *XLRS1*, no reflejó ninguna mutación en la región codificante, permitiendo su exclusión como gen responsable de RP en este locus.

I.4.9.4. RP24 (OMIM: %300155)

	
Región cromosómica: Xq26-q27	Delimitado por: DXS8094 y DXS8043
Extensión: ~7,77 Mb	Modo de herencia: Ligado al cromosoma X

A través de un análisis de ligamiento con 52 marcadores microsatélites repartidos por todo el cromosoma X en una única familia con XIRP, se pudo identificar un nuevo locus en Xq (Gieser *et al.*, 1998). RP24, con 23 cM de extensión, fue el primer locus de XIRP localizado en el brazo largo del cromosoma X.


I.4.9.5. RP25 (OMIM: %602772)

	
Región cromosómica: 6p12.1-q12	Delimitado por: D6S257 y D6S430
Extensión: ~11,03 Mb	Modo de herencia: Autosómico recesivo

En la retina, los receptores GABA pueden mediar la inhibición lateral de la respuesta a la incidencia de luz (Bormann y Feigenspan, 1995). Con la intención de conocer si la pérdida de estos receptores puede estar relacionada con RP, Ruiz *et al.* analizaron las regiones cromosómicas que contienen genes codificadores de las subunidades de tales receptores (Ruiz *et al.*, 1998). Mediante mapeo de homocigosidad de estas regiones en familias consanguíneas afectadas de arRP se identificó un nuevo locus de RP (RP25) en el cromosoma 6. Poco después, el análisis de una familia

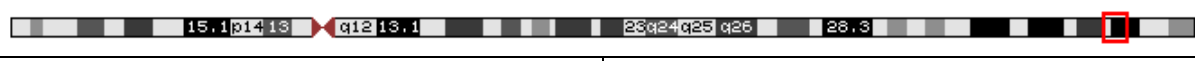
consanguínea paquistaní ligada a RP25 permitió recortar la extensión inicial del locus (16,1 cM) hasta los 2,4 cM (Khaliq *et al.*, 1999). Recientemente, Abd El-Aziz *et al.* han encontrado cosegregación de RP25 y arRP en tres familias chinas no consanguíneas, pero no han podido reducir la extensión del locus (Abd El-Aziz *et al.*, 2007).

I.4.9.6. RP28 (OMIM: %606068)

	
Región cromosómica: 2p16-p11	Delimitado por: D2S2225 y D2S296
Extensión: ~3,39 Mb	Modo de herencia: Autosómico recesivo

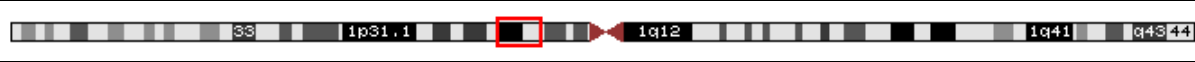
El locus RP28 se identificó mediante análisis de ligamiento y mapeo de homocigosidad en una familia consanguínea de la India afectada de arRP (Gu *et al.*, 1999). RP28 fue localizado en una región de 16 cM del brazo corto del cromosoma 2. Estos autores descartaron a *VSLN1* como el gen responsable de RP en este locus. El análisis de una segunda familia consanguínea –también originaria de la India afectada de arRP y ligada a RP28, delimitó la extensión del locus a un intervalo de 1,06 cM (Kumar *et al.*, 2004).

I.4.9.7. RP29 (GeneID: 54110)

	
Región cromosómica: 4q32-q34	Delimitado por: D4S3035 y D4S2417
Extensión: ~3,65 Mb	Modo de herencia: Autosómico recesivo


El análisis de ligamiento realizado en una familia consanguínea paquistaní afectada de arRP concluyó con el hallazgo de un nuevo locus de esta patología en el brazo largo del cromosoma 4 (Hameed *et al.*, 2001). En este mismo estudio, el análisis mutacional de dos genes candidatos contenidos en RP29 – *M6a* y *CLCN3*– no reveló ninguna mutación asociada a la RP, siendo excluidos como genes causales.

I.4.9.8. RP32 (OMIM: %609913)

	
Región cromosómica: 1p21.3-p13.3	Delimitado por: D1S2896 y D1S457
Extensión: ~8,93 Mb	Modo de herencia: Autosómico recesivo


La identificación del locus RP32 fue resultado de un análisis de ligamiento realizado con marcadores microsatélites en una familia pakistaní afectada por una severa forma de arRP (Zhang *et al.*, 2005). Este locus abarca una región de 10,5 cM del brazo corto del cromosoma 1, situada a 7,1 Mb de *ABCA4*. La secuenciación de 5 genes candidatos –*OLFM3*, *GNAI3*, *LOC126987*, *FLJ25070* y *DKFZp586g0123*– y 6 ESTs contenidos en este locus no reveló la presencia de mutaciones causales.

I.4.9.9. RP33 (OMIM: %610359)

	
Región cromosómica: 2cen-q12.1	Delimitado por: D2S2159 y D2S1343
Extensión: ~9,43 Mb	Modo de herencia: Autosómico dominante

El locus RP33 –hoy en día el único asociado a adRP sin gen causal identificado– fue identificado a través de un análisis de ligamiento de todo el genoma en una familia china (Zhao *et al.*, 2006). Este locus se localiza en una región de 4,8 cM del brazo largo del cromosoma 2, situada en las cercanías del gen *MERTK* responsable de arRP. El análisis mutacional de los genes *SEMA4C*, *CNGA3* y *HNKIST* contenidos en RP33 no reflejó ninguna variante de secuencia patológica asociada a RP.

I.4.9.10. RP34 (OMIM: %300605)

	
Región cromosómica: Xq28-qter	Delimitado por: DXS8061 y DXS1108
Extensión: ~2,74 Mb	Modo de herencia: Ligado al cromosoma X

El genotipado y posterior análisis de ligamiento con marcadores microsatélite en una familia afectada de XIRP permitió la identificación de un nuevo locus de XIRP (Melamud *et al.*, 2006). El locus RP34 –localizado en la región subtelomérica del brazo largo del cromosoma X– alberga a más de 100 genes. La secuenciación de dos genes candidatos –*CNGA2* y *MPP1*– no reveló ninguna mutación patológica, permitiendo su exclusión como genes causales de RP en este locus.

II. OBJETIVOS

II.1. Identificar el gen responsable de Retinitis Pigmentaria en las familias 68 y R con el fin de profundizar en las bases moleculares de dicha patología

- II.1.1. Descartar los genes y loci de RP conocidos
- II.1.2. Delimitar una región candidata
- II.1.3. Examinar los genes en la región candidata
- II.1.4. Determinar la mutación causal

II.2. Evaluar la utilización de tecnología de genotipado *high-throughput* en el diagnóstico genético de Retinitis Pigmentaria.

- II.2.1. Buscar regiones candidatas en todo el genoma
- II.2.2. Identificar el gen responsable de RP

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. Familias del estudio

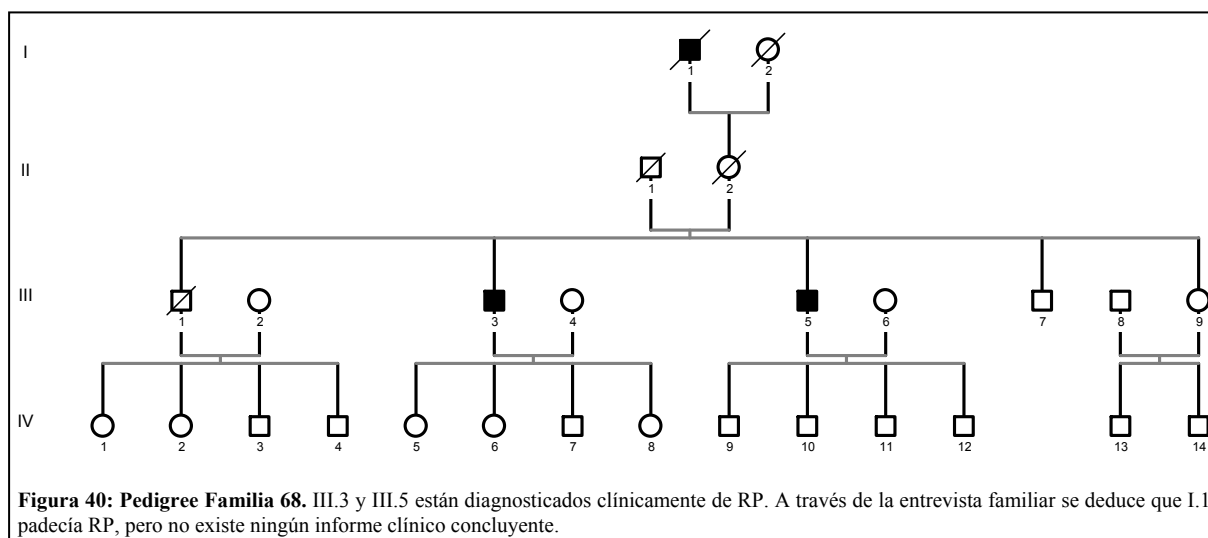
Las familias afectadas fueron recogidas a mediados de los años 90 (Blanco, 1998). Como fuente de búsqueda de estas familias se consultaron el Archivo de Historias Clínicas del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago y la lista de afiliados a la AGARP (Asociación Gallega de afectados por Retinosis Pigmentaria). Todos los individuos afectados cumplimentaron una encuesta epidemiológica que recogía información acerca de la sintomatología y edad de instauración de la patología, de la posible existencia de consanguinidad y de los antecedentes de RP en su familia. Esto sirvió como filtro para seleccionar los parientes de cada individuo afectado que debían ser explorados clínica y electrofisiológicamente para descartar afectación subclínica. Con ello, se consiguió la suficiente información para construir el árbol genealógico y establecer el patrón de herencia de la RP en cada familia.

III.1.1. Construcción de árboles genealógicos

La representación gráfica de los pedigríes se efectuó con el software GenoPro[®] 2007 v2.00 (GenoPro Inc., Montreal, Canadá), utilizando las normas convencionales de simbología: cuadrados para hombres y círculos para mujeres, individuos fallecidos representados con una línea diagonal superpuesta al símbolo del género e individuos afectados con el símbolo de género en fondo negro. La nomenclatura de cada individuo también se basó en las normas convencionales: numeración romana ascendente en relación con el orden de aparición de las generaciones y numeración arábica creciente de izquierda a derecha para los distintos individuos de cada generación. Las uniones consanguíneas se representaron con una doble línea entre ambos progenitores, mientras que las no consanguíneas presentaban una única línea.

III.1.2. Familia 68

Esta pequeña familia originaria de la costa occidental gallega presenta tres varones afectados de RP. Dos de ellos son hermanos e hijos de una pareja no afectada. La madre de estos dos individuos era hija de otro individuo afectado, por lo que se deduce que era una portadora asintomática de RP. Los datos anteriores avalan un modo de herencia mendeliana de RP en esta familia, compatible con un patrón de herencia ligado al cromosoma X (Figura 40). Al inicio de esta tarea investigadora, no se conocía la existencia de ningún otro familiar afectado de RP.



La segunda entrevista con los miembros de esta familia aportó nueva información sobre el individuo I.1. Este varón falleció a una edad avanzada presentando graves alteraciones visuales que, desde hacía ya bastantes años, solamente le permitían apreciar sombras. No existía ningún informe clínico que confirmase el diagnóstico de RP en este individuo, situación bastante comprensible al estar hablando de una persona nacida a finales del siglo XIX que vivió siempre en el medio rural. Ninguno de los miembros entrevistados recordaba la existencia de parentesco consanguíneo entre los individuos de la segunda generación. El primer hijo varón (III.1) falleció a la edad de 40 años sin presentar síntomas aparentes de la patología. De los cuatro hermanos supervivientes, solamente dos presentan un patrón clínico acorde con la sintomatología típica de la RP. Los dos afectados, de 63 (III.3) y 61 años (III.5), poseen informes oftalmológicos en los cuales son diagnosticados de RP. El mayor (III.3) solamente muestra –desde los 50 años– dificultad para adaptar la visión en condiciones de poca luz, como el amanecer o el anochecer. El otro individuo (III.5) presenta un glaucoma bilateral con elevada tensión ocular que le ha ocasionado, junto con la RP, la ceguera total desde los 57 años.

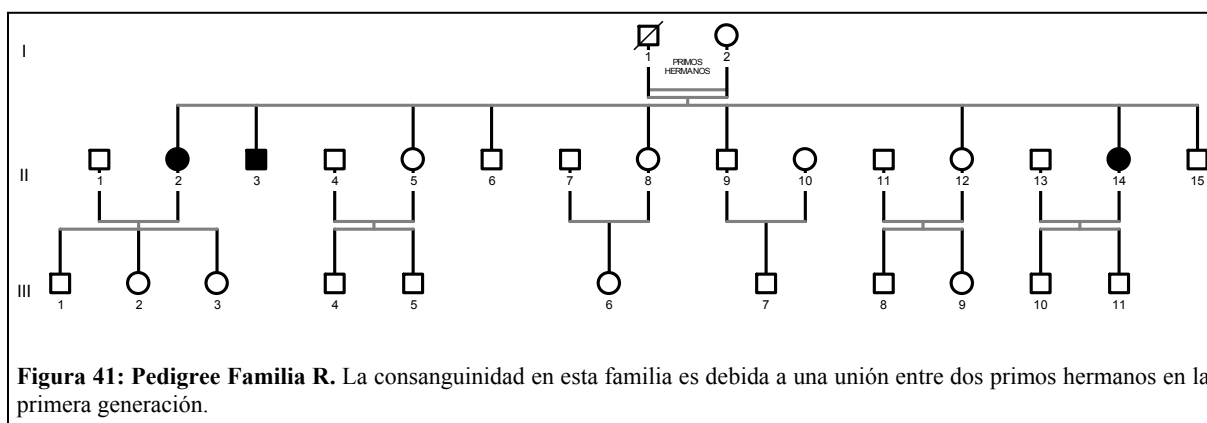
Tabla 1. Hallazgos clínicos de varones afectados y mujeres portadoras de la familia 68						
Individuo	Edad inicio	Ojo	Refracción	Agudeza Visual	Hallazgos oftalmoscópicos	Campo visual
III.3	35 (CN)	D	+1,25 +1,25x90	1	RP típica	Reducción concéntrica
		I	+1 +1x85	1	RP típica	Reducción concéntrica
III.5	20 (CN)	D	-1,25 -0,75x180	0,1	RP típica	Reducción concéntrica
		I	-1 -0,5x170	PL	RP típica	Reducción concéntrica
III.9	—	D	Plano	1	Normal	Normal
		I	Plano	1	Normal	Normal
IV.5	—	D	Plano	1	Normal	Normal
		I	Plano	1	Normal	Normal
IV.6	—	D	Plano	1	Normal	Normal
		I	Plano	1	Normal	Normal
IV.7	—	D	-11,75 -0,5x180	0,7	Fondo miópico	Anormal
		I	-14,75 -0,5x180	0,6	Fondo miópico	Anormal

D, derecho; I, izquierdo; CN, ceguera nocturna; PL, Percibe luz. Tomada de (Blanco, 1998).

III.1.3. Familia R

Originaria del interior de Galicia, esta familia presenta consanguinidad debido a una unión entre primos hermanos aparentemente sanos. Tres de los 9 hijos de esta unión, un varón y dos mujeres, presentan un cuadro clínico de RP. En los tres es evidente una gran alteración de la visión, tanto periférica como central, que disminuye su calidad de vida de forma patente, necesitando ayuda para la práctica totalidad de las actividades cotidianas. Las edades de los individuos afectados se sitúan en un rango que comprende la cuarta y quinta década de vida.

Considerando la consanguinidad de la familia, la aparente ausencia de enfermedad de los progenitores y la presencia de afectados de ambos sexos, se deduce que el modo de herencia mendeliano de la enfermedad en esta familia se corresponde con un patrón de herencia autosómica recesiva (Figura 41). Al contrario de lo que ocurre en la familia 68, en esta familia la instauración de la enfermedad es temprana y la clínica es mucho más agresiva.



III.2. Extracción de ácidos nucleicos

El material biológico utilizado como punto de inicio para la gran mayoría de las pruebas realizadas en esta tesis fue el DNA genómico. El RNA se extrajo para sintetizar el cDNA empleado en el análisis del efecto de la mutación IVS16+1G>T en la proteína MERTK.

III.2.1. Recogida de las muestras

Las muestras de la mayoría de los individuos seleccionados para este estudio fueron recogidas a mediados de los años 90. Tras consentimiento informado, se les extrajo 10 mL de sangre periférica mediante punción venosa. La sangre obtenida se separó en alícuotas de 700 μ L y se congeló a -80°C .

Todos los individuos posteriormente agregados a este estudio –al no ser incluidos en la primera fase de recogida de muestras debido a su corta edad o no estar presentes en dicho momento– fueron informados convenientemente y aceptaron que se les extrajese 10 mL de sangre periférica mediante punción venosa. Para tal fin se utilizó el sistema extractor Safety-Lok™ Blood Collection Set (Beckton Dickinson Vacutainer Systems, Preanalytical Solutions, Plymouth, UK) y la sangre fue recogida en tubos colectores con vacío BD Vacutainer™ K3E (Beckton Dickinson Vacutainer Systems) con Ácido Etilen Diamino Tetraacético (EDTA) tri-potásico al 15% como anticoagulante. Después de la extracción, estos tubos fueron refrigerados a 4°C hasta su tratamiento para el aislamiento de los ácidos nucleicos.

III.2.2. Extracción de DNA genómico

Las muestras sanguíneas mantenidas en congelación durante varios años evidenciaban cierto grado de degradación del DNA. El tiempo transcurrido desde la extracción sanguínea hasta su procesado, fue el factor determinante para escoger el método apropiado de extracción de DNA. Los dos métodos empleados para el aislamiento de DNA de las células sanguíneas fueron: Fenol–Cloroformo–Alcohol Isoamílico o la utilización del kit comercial QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)

III.2.2.1. Método de extracción de DNA genómico con Fenol–Cloroformo–Alcohol Isoamílico a partir de sangre total

Este método fue el de primera elección en todas aquellas muestras con cierta degradación del DNA debido al largo período de tiempo transcurrido desde la extracción sanguínea y/o a su mantenimiento en congelación. El material biológico de partida para este procedimiento fue la sangre de las alícuotas de 700 µL congeladas a -80°C. Tras su descongelación en baño húmedo a 37°C durante 2 minutos, el DNA fue aislado a través del siguiente protocolo:

- 1.- Centrifugación de las alícuotas descongeladas a 12000-13000 rpm durante 2 minutos.
- 2.- Extracción del sobrenadante (~ 650 µL) con pipeta, dejando unos 100 µL por encima del pellet.
- 3.- Resuspender el pellet de leucocitos obtenido con 800 µL de tampón B (Tris HCl 50mM; NaCl 150mM; EDTA 100mM; pH 8)
- 4.- Dividir el pellet resuspendido en dos alícuotas de 450 µL.
- 5.- Añadir 25 µL de SDS al 20% en cada uno de los dos tubos eppendorf que contienen las alícuotas de pellet resuspendido.
- 6.- Agregar 6 µL de Proteínasa K (20 mg/mL) a cada eppendorf.
- 7.- Incubar en baño húmedo a 60°C durante 1 hora.

- 8.- Transcurrido este tiempo, retirar los eppendorf del baño y realizar un spin para llevar todo el contenido al fondo.
- 9.- Añadir 80 μL de Perclorato Sódico 5M a cada eppendorf.
- 10.- Agregar 1 volumen ($\sim 500 \mu\text{L}$) de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1) a cada eppendorf y mezclar por inversión.
- 11.- Centrifugar a 12500-14000 rpm durante 10 minutos.
- 12.- Recoger el sobrenadante con pipeta y pasarlo a otro eppendorf.
- 13.- Repetir los pasos 10, 11 y 12.
- 14.- Añadir 1 volumen ($\sim 500 \mu\text{L}$) de Cloroformo:Alcohol Isoamílico a cada eppendorf y mezclar por inversión.
- 15.- Centrifugar a 12500-14000 rpm durante 10 minutos.
- 16.- Añadir 2 volúmenes ($\sim 1 \text{ mL}$) de etanol absoluto frío a cada eppendorf.
- 17.- Mezclar bien por inversión. El ovillo de DNA aparecerá rápidamente.
- 18.- Centrifugar a 12500-14000 rpm durante 3 minutos. Retirar el etanol por decantación.
- 19.- Añadir 500 μL de etanol al 80% frío a cada eppendorf.
- 20.- Centrifugar a 12500-14000 rpm durante 5 minutos. Retirar el etanol por decantación. Poner especial cuidado para no remover el DNA.
- 21.- Dejar secar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 22.- Resuspender en 100 μL de agua MilliQ estéril.
- 23.- Incubar en baño húmedo a 55°C durante toda la noche.
- 24.- Transcurrido este tiempo, retirar los eppendorf del baño y realizar un spin para llevar todo el contenido al fondo.
- 25.- Resuspender con pipeta y mezclar los dos eppendorf con el DNA extraído de las dos alícuotas correspondientes de cada muestra.

III.2.2.2. Método de extracción de DNA genómico con QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN) a partir de sangre total

Esta segunda opción se empleó para aislar el DNA de aquellas muestras en las que la extracción sanguínea se había realizado recientemente. El material biológico de partida para este procedimiento fue la sangre contenida en los tubos colectores de 10 mL refrigerados a 4°C . Sin embargo, solamente se necesitaron 2 mL de sangre, siendo los 8 restantes congelados a -20°C para su mantenimiento. Los 2 mL de sangre previamente separados fueron pipeteados en un tubo de centrifuga de 15 mL y se comenzó el proceso de aislamiento del DNA siguiendo este protocolo:

- 1.- Añadir 200 μL de Proteasa QIAGEN.
- 2.- Agregar 2,4 mL de buffer AL y vortear 3 veces durante cinco segundos cada vez.
- 3.- Incubar a 70°C durante 10 minutos.

- 4.- Añadir 2 mL de etanol absoluto y mezclar de nuevo con vórtex.
- 5.- Pipetear 3,3 mL de la mezcla obtenida a una columna QIAamp Midi introducida en un tubo de centrifuga de 15 mL. Cerrar la tapa y centrifuga a 3000 rpm durante 3 minutos.
- 6.- Retirar la columna QIAamp Midi, descartar el filtrado y volver a introducir la columna en el tubo de centrifuga de 15 mL. Cerrar la tapa y centrifugar a 3000 rpm durante 3 minutos.
- 7.- Retirar la columna QIAamp Midi, descartar el filtrado y volver a introducirla en el tubo de centrifuga de 15 mL.
- 8.- Añadir 2 mL de Buffer AW1 a la columna QIAamp Midi. Cerrar la tapa y centrifugar a 5000 rpm durante 1 minuto.
- 9.- Añadir 2 mL de Buffer AW2 a la columna QIAamp Midi. Cerrar la tapa y centrifugar a 5000 rpm durante 15 minutos.
- 10.- Introducir la columna QIAamp Midi en un tubo de centrifuga de 15 mL limpio y descartar el que contenía el filtrado.
- 11.- Pipetear 300 μ L de Buffer AE en la membrana de la columna QIAamp Midi y cerrar la tapa.
- 12.- Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y después centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos.
- 13.- Volver a pipetear estos 300 μ L de eluido en la membrana de la columna QIAamp Midi para lograr la máxima concentración de DNA. Cerrar la tapa y centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos.

III.2.2.3. Cuantificación del DNA

Después de la extracción –por cualquiera de los dos métodos– se resuspendió el DNA y su concentración fue cuantificada mediante el espectrofotómetro NanoDrop[®] ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). El ND-1000 es un espectrofotómetro de espectro total (220-750 nm) cuyo funcionamiento se basa en una tecnología que emplea la tensión superficial para mantener la muestra adherida a una pequeña superficie en la cual se medirá la concentración de DNA. Esto elimina la necesidad de cubetas u otro material similar y permite la limpieza del aparato, entre una y otra medida, en pocos segundos. El ND-1000 posee la capacidad de medir muestras altamente concentradas sin necesidad de diluirlas, precisando solamente de 1 μ L de muestra para conocer su concentración de DNA. Los pasos a seguir para medir la concentración de una muestra con este espectrofotómetro son:

- 1.- Con el pivote elevado, se carga 1 μ L de muestra bien resuspendida en el pedestal de medida inferior.

- 2.- Se baja el pivote y el pedestal superior se aproxima a 1 mm del inferior. En ese momento, la muestra depositada en el pedestal inferior establece contacto con el superior y forma un puente líquido entre ambos pedestales.
- 3.- Para la medida espectral, los dos pedestales se aproximan a 0,2 mm y una lámpara de xenón proporciona la luz que será analizada por el espectrofotómetro después de atravesar la muestra.
- 4.- Finalizada la medida, se levanta el pivote y se retira la muestra de ambos pedestales usando papel secante para evitar que queden residuos que puedan alterar las medidas posteriores.
- 5.- El proceso de medida se realizó por duplicado con cada muestra para comprobar si la muestra estaba bien resuspendida. Si entre las dos medidas existía una variación superior a 10 ng/ μ L la muestra debía ser resuspendida de nuevo. La concentración final de DNA de una muestra se obtuvo calculando la media aritmética de los datos de las dos medidas.

III.2.2.4. Conservación del DNA

El DNA extraído de la sangre de cada individuo se conservó a 4°C hasta su análisis. Los DNAs analizados, o aquellos cuyo análisis se pospuso durante más de 2 semanas, fueron almacenados en congeladores a -20°C.

III.2.3. Extracción de RNA

III.2.3.1. Obtención de la interfase de células blancas de cada individuo

La sangre periférica extraída y anticoagulada con EDTA fue centrifugada a 2800 rpm durante 10 minutos (sin freno) para separar las distintas células de acuerdo con su densidad. Después de la centrifugación, se observó que la sangre se separaba en una fracción superior plasmática, una inferior correspondiente a las células rojas y una capa interfase denominada *buffy coat* que contenía las células blancas. El procesado del *buffy coat* con la intención de obtener el RNA de las células blancas se basó en el protocolo inmediatamente citado:

- 1.- Extraer el *buffy coat* (~ 1mL) del tubo previamente centrifugado y pasarlo a uno limpio.
- 2.- Añadir 3 mL de solución de lisis celular. Sellar bien con parafilm, invertir varias veces e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 3.- Centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos a 18°C sin freno.
- 4.- Descartar sobrenadante con pipeta. Si el pellet está rojo se debe volver a repetir el paso de lisis celular. Si, por el contrario, está blanco se añade suero salino al 0,9 % hasta un volumen final de 10 mL. Sellar con parafilm e invertir varias veces.
- 5.- Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos.

- 6.- Retirar sobrenadante. Resuspender el pellet con pipeta y alicuotearlo en eppendorfs de 1,5 mL ($\sim 1 \times 10^7$ células en cada tubo).
- 7.- Añadir 500 μ L de suero salino al 0,9 % a cada eppendorf.
- 8.- Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos a 18°C.
- 9.- Retirar el sobrenadante con pipeta y añadir 600 μ L de buffer RLT a cada alícuota. El buffer RLT lisa el pellet, inactiva las RNAsas y asegura la purificación de RNA prácticamente intacto.
- 10.- Vortear vigorosamente y almacenar el pellet de células blancas resuspendido en RLT a -20°C hasta iniciar el proceso de extracción de RNA.

III.2.3.2. Aislamiento del RNA de las células blancas

El RNA total de las células blancas se aisló mediante el uso del RNeasy Mini Kit (QIAGEN), que permite la purificación de RNA a partir de células animales, tejidos animales, bacterias y levaduras en menos de 30 minutos. Este kit comercial combina las propiedades de unión selectiva de la membrana de sílica de las columnas con un sistema de tampones con alta concentración de sales, permitiendo la recuperación de más de 100 μ g de RNA (con tamaños superiores a las 200 bases) adheridos a esta membrana durante el proceso de aislamiento del RNA.

Tras descongelar una alícuota de células blancas de cada individuo, y vortearlas hasta lograr una completa homogeneización del pellet, se comenzó con el protocolo de extracción:

- 1.- Pasar todo el volumen de cada alícuota a las columnas QIAshredder Spin situadas dentro de su correspondiente tubo colector de 2 mL.
- 2.- Centrifugar a 14000 rpm durante 2 minutos.
- 3.- Desechar la columna y conservar el colector con el eluido. Poner la tapa a cada colector.
- 4.- Centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos.
- 5.- Pasar 500 μ L del sobrenadante a un tubo eppendorf de 1,5 mL.
- 6.- Añadir 500 μ L de Etanol al 70 % con el fin de conseguir las condiciones apropiadas para facilitar la unión del RNA a la membrana de las columnas.
- 7.- Resuspender la mezcla y pasar 700 μ L a la columna RNeasy Mini Spin situada dentro de un tubo colector de 2 mL.
- 8.- Centrifugar a 13000 rpm durante 30 segundos y descartar el eluido. El RNA queda adherido a la columna.
- 9.- Pasar los 300 μ L restantes del eppendorf, que contenía el sobrenadante y el etanol al 70 %, a la columna RNeasy Mini Spin utilizada anteriormente.
- 10.- Centrifugar a 13000 rpm durante 30 segundos y descartar el eluido.
- 11.- Añadir 350 μ L de buffer RW1 a la columna RNeasy Mini Spin.
- 12.- Centrifugar a 13000 rpm durante 30 segundos y descartar el eluido.

- 13.- Añadir 10 μ L de DNAasa I (RNase-free DNase set) y 70 μ L de buffer RDD a cada columna RNeasy Mini Spin.
- 14.- Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 15.- Añadir 350 μ L de buffer RW1 a cada columna RNeasy Mini Spin.
- 16.- Centrifugar a 1300 rpm durante 30 segundos. Desechar el colector e introducir la columna en un nuevo colector.
- 17.- Añadir 500 μ L de buffer RPE a cada columna RNeasy Mini Spin.
- 18.- Centrifugar a 13000 rpm durante 30 segundos y descartar el eluido.
- 19.- Añadir 500 μ L de buffer RPE a cada columna RNeasy Mini Spin.
- 20.- Centrifugar a 13000 rpm durante 2 minutos y descartar el eluido.
- 21.- Centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto y desechar el colector.
- 22.- Introducir la columna RNeasy Mini Spin en un eppendorf de 1,5 mL y agregar 30 μ L de agua libre de RNAsas.
- 23.- Centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto y desechar la columna RNeasy Mini Spin. El RNA estará en el eluido.

III.2.3.3. Conservación del RNA

Todas las alícuotas de células blancas no utilizadas para la extracción de RNA fueron congeladas a -20°C inmediatamente después de ser resuspendidas en tampón RLT. Por su parte, el RNA aislado de las alícuotas procesadas se mantuvo congelado a -20°C para evitar su degradación hasta que se utilizó para la síntesis de cDNA de primera cadena.

III.3. Análisis de marcadores genéticos polimórficos

El mapeo de genes responsables de una patología en humanos requiere marcadores genéticos. Un marcador genético es cualquier carácter mendeliano polimórfico que puede ser utilizado para seguir un segmento de un cromosoma a lo largo de un pedigree (Strachan y Read, 2004).

III.3.1. Análisis de marcadores microsatélites

Los STRs (*Short Tandem Repeats*) son pequeñas secuencias de DNA, de 2 a 5 nucleótidos de longitud, repetidas en tandem de 30 a 40 veces. El grado de polimorfismo de un STR vendría dado por el número de copias de la repetición que pueden observarse en una población de individuos.

III.3.1.1. Parámetros de selección de los STRs

La información necesaria para seleccionar los STRs se extrajo de el UCSC Genome Browser on Human; May 2004 Assembly (<http://genome.ucsc.edu/>). Los parámetros de selección de los STRs que constituyeron este estudio fueron:

1.- Su localización en el cromosoma. En todos los loci o genes analizados la primera aproximación empleaba dos STRs, flanqueando sus extremos 5' y 3', junto con un tercer STR interno situado, preferentemente, dentro de una región codificante.

2.- Excepto en aquellos casos puntuales en los que los STRs seleccionados habían sido empleados en estudios previos, y que podían ser marcadores de mapas de híbridos de radiación, el resto de los STRs escogidos debían cumplir la condición de ser marcadores de mapas genéticos.

3.- La heterocigosidad de los STRs fue un factor clave para su selección. Siempre que las condiciones lo permitiesen, se escogían los STRs que presentaban la heterocigosidad más alta para asegurar la mayor informatividad de estos marcadores en las familias analizadas.

4.- Tamaño del monómero de repetición. Debido a que la discriminación de los diferentes alelos en geles de acrilamida era más evidente cuando se utilizaban STRs tetraméricos, se decidió escoger, como primera opción, los STRs con mayor tamaño del monómero de repetición.

III.3.1.2. Primera fase: exclusión de los loci y genes conocidos

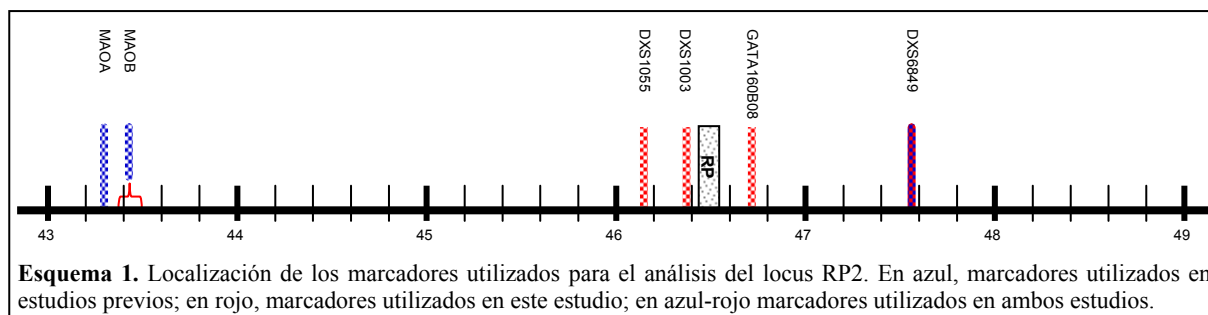
Hasta el momento solo se han descrito 6 loci del cromosoma X relacionados con RP. De ellos, solamente se han podido identificar dos genes causales. Los loci descartados en este estudio han sido:

III.3.1.2.1. Locus RP2



Xp11.3

El gen identificado en este locus como responsable de RP es el *RP2* (Schwahn *et al.*, 1998). Los STRs empleados en estudios previos para descartar este gen como responsable de RP en la familia 68 fueron MAOA, MAOB y DXS6849 (Blanco, 1998). En el presente estudio los STRs seleccionados para poder excluir este gen fueron el DXS1055, DXS1003, GATA160B08 y DXS6849 (Esquema 1).

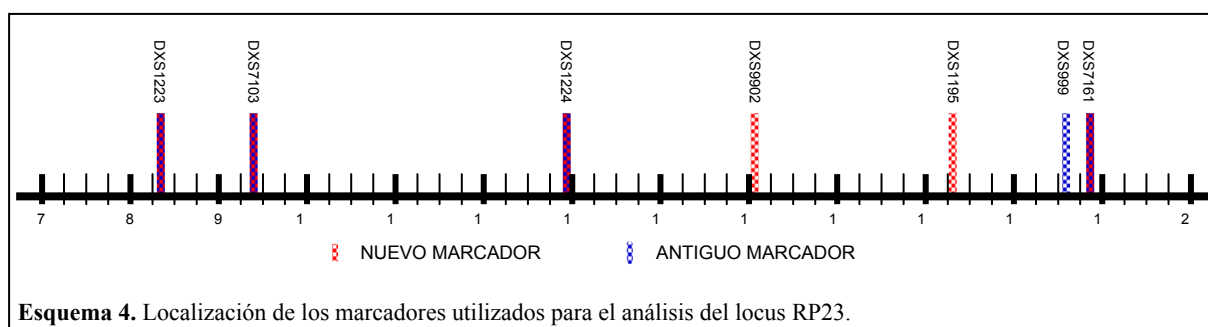


III.3.1.2.4. Locus RP23



Xp22.31-p22.13

Hasta el momento, no se ha identificado el gen responsable de RP en este locus. Los STRs empleados en estudios previos para delimitar este locus fueron el DXS1223, DXS7103, DXS1224, DXS999 y DXS7161 (Hardcastle *et al.*, 2000). En el presente estudio los STRs seleccionados para poder excluir este locus fueron el DXS1223, DXS7103, DXS1224, DXS9902, DXS1195 y DXS7163 (alias de DXS7161) (Esquema 4).

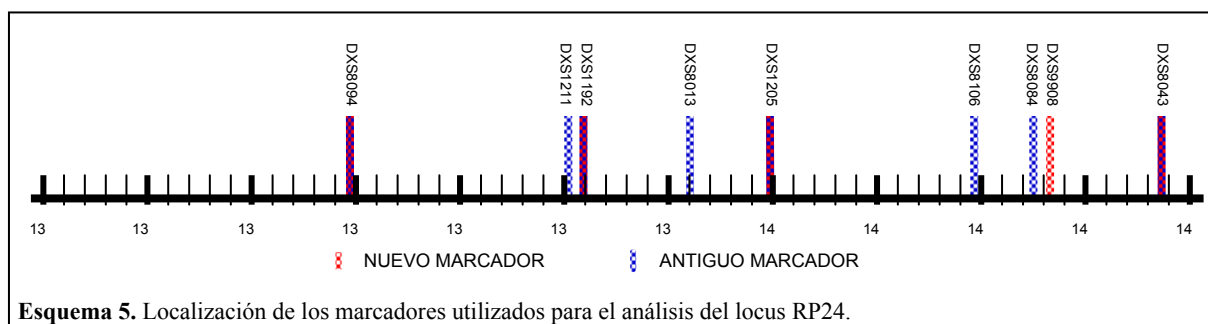


III.3.1.2.5. Locus RP24



Xq26.3-q27.3

Hasta el momento, no se ha identificado el gen responsable de RP en este locus. Los STRs empleados en estudios previos para delimitar este locus fueron el DXS8094, DXS1211, DXS1192, DXS8013, DXS1205, DXS8106, DXS8084 y DXS8043 (Gieser *et al.*, 1998). En el presente estudio los STRs seleccionados para poder excluir este locus fueron el DXS8094, DXS1192, DXS1205, DXS9908 y DXS8043 (Esquema 5).

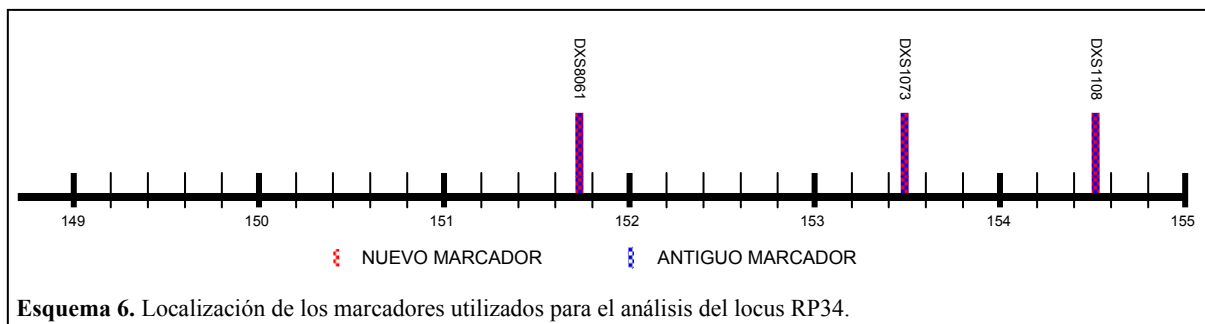


III.3.1.2.6. Locus RP34



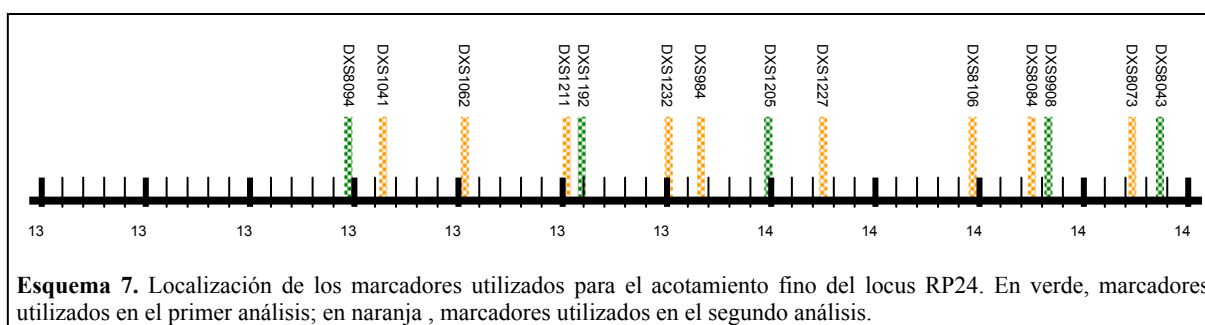
Xq28

Hasta el momento, no se ha identificado el gen responsable de RP en este locus. Los STRs empleados en estudios previos para delimitar este locus fueron el DXS8061, DXS1073 y DXS1108 (Melamud *et al.*, 2006). En el presente estudio, los STRs seleccionados para poder excluir este locus fueron el DXS8061, DXS1073 y DXS1108 (Esquema 6).



III.3.1.3. Segunda fase: Selección de STRs para acotamiento fino del locus RP24

En un segundo paso, el locus RP24 fue sometido a un análisis más exhaustivo. Para ello fueron seleccionados nuevos marcadores dentro la región delimitada por DXS8094 y DXS8043. Se intentó mantener entre ellos una distancia no superior a 1 Mb. Los STRs escogidos fueron DXS1041, DXS1062, DXS1211, DXS1232, DXS984, DXS1227, DXS8106, DXS8084 y DXS8073.



III.3.1.4. Tercera fase: Selección de STRs para análisis de las regiones susceptibles de albergar un locus responsable de RP en el brazo largo del cromosoma X

Esta fase se subdividió en cuatro etapas para facilitar el análisis y descarte de las regiones del brazo largo del cromosoma X que pudiesen contener un locus responsable de RP en la familia 68. En

todas las etapas los STRs fueron seleccionados manteniendo la premisa de estar separados entre si a ~ 5 cM.

III.3.1.4.1. Etapa I: análisis de la región subtelomérica del brazo largo



Xq27.3-q28

Los STRs seleccionados para el cribado de la citada región cromosómica constituyeron un grupo denominado “STS Markers terminales” que comprendía a: DXS8045, DXS8091, DXS8069 y DXS1073.

III.3.1.4.2. Etapa II: análisis de la región comprendida entre el centrómero y el locus RP24



Xq12-q25

Analizó la amplia región cromosómica existente entre el centrómero y el locus RP24. Al grupo de STRs seleccionados se les denominó “GATAs Xq” (la gran mayoría eran tetraméricos), el cual estaba formado por: DXS8380, DXS6800, DXS6793, DXS6803, DXS6801, DXS6789, DXS7126, DXS6797, GATA165B12 y DXS9909.

III.3.1.4.3. Etapa III: análisis de la región Centrómero-RP24 ampliada en ambos extremos



Xq11.1-q25

La región analizada amplió ligeramente, en ambos extremos, los límites de la analizada en la etapa anterior. En la selección de los STRs para analizar esta región primó su posición intercalada con respecto a los de grupo GATAs Xq. Este nuevo grupo de STRs se denominó “STSs Xq I” e incluía a: DXS8029, DXS986, DXS1217, DXS8077, DXS1106, DXS8088, DXS8064, DXS1001 y DXS8009

III.3.1.4.4. Etapa IV: análisis de la región Centrómero-RP24 reampliada en su extremo 3’



Xq12-q25

Con los STRs elegidos en esta etapa, se logró ampliar la región analizada en etapas previas hacia el extremo 3’. Al igual que en la etapa anterior, los nuevos STRs tenían posiciones intercaladas con respecto a todos los seleccionados hasta ahora. Este nuevo grupo se denominó STSs Xq II e incluyó a: DXS1213, DXS1275, DXS8101, DXS1221, DXS1002, DXS1196, DXS1203, DXS990, DXS8063, DXS8096, DXS1059, DXS1220, DXS8067, DXS8059, DXS8057 y DXS1047.

III.3.1.5. Cuarta fase: Selección de STRs para análisis de las regiones susceptibles de albergar un locus responsable de RP en el brazo corto del cromosoma X



Xp22.33-p11.21

Las regiones situadas entre los loci descartados del brazo corto del cromosoma X fueron examinadas mediante una serie de STRs denominada “STSs Xp” que contenía a: DXS7099, DXS7100, DXS1060, DXS996, DXS7593, DXS1226, DXS989, DXS1061, DXS1068, DXS8042, DXS993, DXS8080, DXS8083, DXS1039, DXS8023, DXS988 y DXS991.

III.3.1.6. Quinta fase: análisis de 10 STRs del cromosoma X con un décaplex del IPATIMUP (Instituto de Inmunología y Patología Molecular de la Universidad de Oporto)

Haciendo uso de la experiencia de esta institución en el análisis de STRs altamente informativos del cromosoma X, se procedió al estudio de la familia 68 con una batería de STRs previamente seleccionados que formaban parte de un “décaplex” de análisis del cromosoma X. Para diferenciarlos del resto de STRs seleccionados en etapas anteriores, se decidió imponer la nomenclatura de “Pt” a todos los analizados por el IPATIMUP. Estos 10 STRs eran: DXS8378, DXS7132, DXS9898, DXS6809, DXS101, GATA172D05, HPRTB, DXS8377, DXS7423 y DXS10011.

III.3.2. Análisis de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs)

Los SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) son variaciones de secuencia de un único nucleótido mucho más frecuentes a lo largo del genoma (~1 cada 290 pb) que los STRs (Kruglyak y Nickerson, 2001). Sin embargo, se estima que su informatividad es entre 2 y 3 veces menor que la de un STR (Kruglyak, 1997). De las diferentes fuentes de variación genética entre individuos, los SNPs destacan por ser el tipo más común de las variaciones de secuencia, ser abundantes en el genoma, ser estables y no mutar con facilidad y poseer relativa facilidad de genotipado.

III.3.2.1. Parámetros de selección de SNPs

Los datos necesarios para la recolección de los SNPs fueron obtenidos a partir de SNPBrowser v3.5 (Applied Biosystems), UCSC Genome Browser on Human; May 2004 Assembly (<http://genome.ucsc.edu/>) y dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). La selección de los SNPs para completar las regiones no analizadas por los STRs se basó en las siguientes premisas:

1.- Su localización en el cromosoma. Los SNPs seleccionados se situaban en regiones donde no había opción de escoger un nuevo STR o en regiones en las que se quería hacer un acotamiento más fino. Se emplearon SNPs con una separación entre ellos de 300 Kb a 1 Mb y no pertenecientes al mismo bloque haplotípico dentro de la población estudiada.

2.- La heterocigosidad de los SNPs. Se seleccionaron aquellos SNPs que presentasen mayor valor de heterocigosidad dentro de la región que se quería analizar y mantuviesen la distancia de separación fijada anteriormente.

3.- Frecuencia del alelo menor (MAF). No se seleccionaron aquellos SNPs, siempre que las condiciones lo permitieron, cuyo alelo menos frecuente se presentase en la población con una frecuencia inferior al 10 %.

La selección de SNPs se hizo dentro de las siguientes regiones:

III.3.2.2. I Región: definida entre los marcadores DXS996 y DXS 1223



Xp22.32-p22.31

Para su análisis se seleccionaron 9 SNPs separados a una distancia de aproximadamente 300 Kb. Los SNPs elegidos fueron: rs5916301, rs1882409, rs5916393, rs5989526, rs6529997, rs4830772, rs1179098, rs1454623 y rs1012417.

III.3.2.3. II Región: definida entre los marcadores DXS1224 y DXS 7163



Xp22.2-p22.13

Los 6 SNPs seleccionados para el análisis de esta región estaban separados a una distancia aproximada de 1 Mb. Esta región engloba al marcador DXS1195. Los SNPs escogidos fueron: rs4830881, rs4565623, rs2071182, rs1727974, rs9306755 y rs6633170.

III.3.2.4. III Región: definida entre los marcadores DXS1226 y DXS 9896



Xp22.11-p21.3

Separados a una distancia media de 1 Mb, los SNPs seleccionados dentro de esta región fueron: rs6629539, rs2520324, rs1018879, rs4358969, rs4898288, rs4428795 y rs196982. Esta región incluía a los marcadores DXS989 y DXS7106.

III.3.2.5. IV Región: definida entre los marcadores DXS9907 y DXS6679*Xp21.1-p11.4*

Ubicados con una separación aproximada de 1 Mb, los SNPs seleccionados para la exploración de esta región fueron: rs3788899, rs5971730, rs4636356, rs996563, rs6629087 y rs5964310. La región analizada englobaba al marcador DXS1110.

III.3.2.6. V Región: definida entre los marcadores DXS1068 y DXS 988*Xp11.4-p11.22*

Para su estudio se escogieron 8 SNPs separados entre sí a ~1 Mb: rs5917339, rs1023064, rs766117, rs4074014, rs533190, rs4824748, rs2382900 y rs4893622. Dentro de esta región se incluían los marcadores DXS1055, DXS1003, GATA160B08, DXS6849, DXS1039 y DXS8023.

III.3.2.7. VI Región: definida entre los marcadores DXS7132 y DXS 6800*Xq11.1-q21.1*

Los SNPs seleccionados para escrutar esta región: rs6525038, rs2206203, rs4562482, rs1171984, rs6525567, rs174211, rs242461 y rs4263894 estaban separados a 1 Mb aproximadamente.

III.3.2.8. VII Región: definida entre los marcadores DXS986 y DXS 1002*Xq21.1-q21.2*

En ella se han analizado los siguientes 7 SNPs separados a una distancia de ~1 Mb: rs3923574, rs2806641, rs5921935, rs212922, rs724982, rs929129 y rs242847. La región estudiada englobaba al marcador DXS6793.

III.3.2.9. VIII Región: definida entre los marcadores DXS8045 y DXS 7423*Xq27.3-q28*

Se necesitaron 5 SNPs separados a una distancia media de 1 Mb para analizar toda su extensión. Los SNPs seleccionados fueron: rs5965765, rs5951961, rs1419963, rs6649483 y rs658680. La región analizada incluía el marcador DXS8377.

III.3.3. Amplificación de STRs y SNPs por PCR

Tras la minuciosa selección de los marcadores polimórficos, se diseñaron los respectivos primers y se ajustaron las condiciones de PCR para lograr la amplificación más eficiente.

III.3.3.1. Diseño de los primers

Ambos primers, forward y reverse, se diseñaron mediante Primer Express v2.0 (Applied Biosystems), Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) y NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>). El parámetro de referencia utilizado para diseñar los primers fue que su T_M se ajustase a 60°C. Por lo tanto, dependiendo de la concentración de G y C de cada oligonucleótido, la longitud de los primers varió entre 18 y 27 nucleótidos.

Además de la importancia de mantener libre el extremo 3', con el diseño de primers se evitó la presencia de hairpins, palíndromos, repeats y dímeros entre un único primer o entre los dos primers utilizados para la amplificación de un fragmento de DNA. Esto se consiguió mediante el estudio de las ΔG de las posibles primers, que permitió escoger aquellos cuyas estructuras secundarias cumplían todos los preceptos impuestos anteriormente y eran más estables a 55°C (ΔG más alta).

III.3.3.2. Condiciones de amplificación

La amplificación de todos los STRs y SNPs se realizó de forma simplex (amplificación de un único STR o SNP por reacción de PCR). En general, y salvo modificaciones puntuales, el protocolo de amplificación fue el siguiente:

III.3.3.2.1. Termociclador

Para la realización de la PCR se emplearon indistintamente los termocicladores de Applied Biosystems: GeneAmp 2700 96-well (utiliza eppendorfs de 0,2 mL), GeneAmp 9700 96-well (eppendorfs de 0,2 mL) y Applied Biosystems 9800 Fast 96-well (eppendorfs de 0,1 mL).

III.3.3.2.2.- Mezcla de reacción

Para un volumen final de 50 μ L se añadieron 5 μ L de Buffer 10X, 3 μ L de $MgCl_2$ 25 mM, 1 μ L de cada primer a una concentración final de 10 μ M, 1 μ L de dNTPs 10 mM, 0,28 μ L de Taq polimerasa a 5 U/ μ L, 37,72 μ L de H_2O MilliQ autoclavada y 1 μ L de muestra de DNA.

III.3.3.2.3. Concentración de DNA

La concentración de DNA utilizada osciló entre 20 y 150 ng/μL como consecuencia del diferente rendimiento obtenido de la extracción de DNA de muestras antiguas o recientes.

III.3.3.2.4. Programa de amplificación

La temperatura de annealing fue un parámetro no constante debido a las distintas T_M de los primers. En todos los casos, la temperatura de annealing empleada en la primera prueba de PCR fue de 55°C. Esta temperatura se fue ajustando, dependiendo de la cantidad de productos inespecíficos obtenidos o de la cantidad de producto específico de PCR amplificado, hasta conseguir la temperatura de annealing óptima para cada pareja de primers. El programa designado para la amplificación de la mayoría de los STRs tenía los siguientes ciclos:

Desnaturalización inicial:	94°C	2 min.
40 ciclos de:		
Desnaturalización:	94°C	20 seg.
Annealing-Extensión:	55°C	1 min.
Mantenimiento:	4°C	ad infinitum.

Por otro lado, el programa diseñado para la amplificación de los SNPs contenía los siguientes pasos:

Desnaturalización inicial:	94°C	2 min.
35 ciclos de:		
Desnaturalización:	94°C	20 seg.
Annealing:	55°C	30 seg.
Extensión:	72°C	30 seg.
Mantenimiento:	4°C	ad infinitum.

III.3.3.2.5. Control de amplificación

Además de las muestras de DNA de los individuos estudiados, también se amplificó un control negativo para descartar la contaminación de la mezcla de reacción con DNA ajeno. El control negativo solamente contenía agua y la mezcla de reacción, por lo que no debía presentar amplificación de ningún tipo. En caso de presentarla, la PCR debería ser repetida de nuevo por posible contaminación de la mezcla de reacción o manipulación del material en condiciones no asépticas.

III.3.4. Electroforesis y detección de los productos amplificados

Los productos obtenidos de cada PCR fueron chequeados en geles de agarosa al 1,5 % para comprobar si la PCR había amplificado de forma correcta los fragmentos específicos de cada pareja de primers en todos los individuos analizados. Junto con los productos de PCR se cargaban 5-10 μL (30 $\text{ng}/\mu\text{L}$) de marcadores con diferentes bandas de tamaño conocido que permitieron comprobar que los tamaños de los amplicones se ajustaban a los obtenidos teóricamente cuando se diseñaron los primers. Los marcadores de tamaño (*ladders*) utilizados fueron: Phi X Hae III, pBR322 DNA-MspI digest, 50 pb *ladder* y 123 pb *ladder*.

Hecho esto, se procedió al análisis de los productos de PCR específicos de la pareja de primers diseñada para cada STR en geles de poliacrilamida (PAGE). Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida y un agente entrecruzador (cross-linker), la bis-acrilamida, en presencia de un iniciador y un catalizador. El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida de un gel condiciona su rango de separación, puesto que a mayor proporción menor es el tamaño del poro y mayor es el poder de resolución del gel. Como iniciador de la reacción se utilizó ión persulfato aportado en forma de Persulfato Amónico ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) y como catalizador N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED).

La electroforesis se realizó mediante tres métodos: electroforesis vertical, horizontal y capilar.

III.3.4.1. Electroforesis vertical en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes

El soporte utilizado para este tipo de electroforesis fue una cubeta modelo SE 410 de Hoefer, con dos cristales de 180 x 240 x 3 mm separados con dos spacers de 20 x 240 x 1 mm. Como fuente de alimentación se empleó la Hoefer PS 500 XT (500 V, 400 mA y 200 W). La electroforesis se programó a intensidad constante de 25 mA hasta que la muestra penetraba en el gel y 20 mA hasta el final de la carrera, siendo la duración aproximada de la misma de unas 4 horas. El protocolo para la ejecución de este tipo de electroforesis se basó en los siguientes puntos:

- 1.- Lavar los cristales y spacers con agua destilada y jabón neutro para eliminar suciedad o desechos de otros geles.
- 2.- Limpiar las superficies de los cristales y spacers con etanol al 96%, para eliminar lo que no haya sido arrastrado con el lavado anterior.
- 3.- Ensamblar los dos cristales, separados por dos spacers, situar una placa de aluminio por detrás (evitará que el gel se caliente demasiado una vez comenzada la electroforesis) y fijarlo todo mediante pinzas de presión. Se obtendrá, entonces, un armazón que servirá de soporte para la polimerización del gel. Por último, situar el peine que formará los pocillos que alojarán las muestras en el hueco existente entre ambos cristales.

- 4.- Introducir el armazón en el receptáculo de la base designado para la polimerización del gel y sujetarlo mediante las piezas plásticas específicas para tal efecto.
- 5.- Preparar la solución de Acrilamida/Bisacrilamida (19:1) para geles al 6% (volumen final de 40 mL) siguiendo las proporciones: 24 mL de H₂O MilliQ autoclavada; 12 mL de solución de Acrilamida/Bisacrilamida (19:1) al 20%; 4 mL de TBE 10X; 210 µL de Persulfato Amónico (APS) al 10% y 110 µL de TEMED.
- 6.- Cargar la solución en el hueco existente entre ambos cristales con aguja y jeringuilla. Esperar hasta que el gel esté completamente polimerizado (aproximadamente 25 minutos).
- 7.- Transcurrido este tiempo, retirar las piezas plásticas, sacar el armazón del receptáculo e introducirlo en la cubeta inferior del Hoefer. Llenar la cubeta con 250 mL de TBE 1X.
- 8.- Retirar el peine y limpiar los pocillos con TBE 1X para eliminar restos de Acrilamida/Bisacrilamida.
- 9.- Preparar las muestras para cargarlas en el gel. Para ello, añadir 3 µL de tampón de carga a 12 µL de producto de PCR de cada muestra y homogeneizar bien. Cargar las muestras en sus pocillos correspondientes.
- 11.- Colocar la cubeta superior del Hoefer sobre el armazón y fijarla con las piezas plásticas. Llenar la cubeta con 250 mL de TBE 1X.
- 13.- Encajar la pieza conductora de electricidad en ambas cubetas. Conectar a la fuente de alimentación y comenzar la electroforesis.

III.3.4.2. Electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes

El soporte físico empleado para polimerizar los geles estaba compuesto por dos cristales de 120 x 100 x 3 mm, separados mediante spacers de 1 mm de grosor. Una vez polimerizado el gel se disponía sobre la Flat Bed Apparatus FBE-3000 (Pharmacia Fine Chemicals), la cual se conectaba a la fuente de alimentación Electrophoresis Constant Power Supply 2000/300 (Pharmacia Fine Chemicals) (2000 V, 300 mA y 150 W). La electroforesis se programó a voltaje constante de 200 V, variando el tiempo de corrida de 60 a 90 minutos dependiendo del tamaño de los fragmentos analizados.

Los geles empleados en la electroforesis horizontal contenían una proporción T₉C₅ de Acrilamida/Cross-linker. Esta nomenclatura se obtiene de: $T = A+B$ y $C = (B/A+B) \times 100$; donde A es la cantidad en gramos de Acrilamida y B es la cantidad en gramos de cross-linker (en estos geles se utilizó Piperacina en vez de Bisacrilamida) diluida en 100 mL de Tris-HCl 0,375 M pH 8,8. De ello se deduce que la concentración final de Acrilamida/Piperacina utilizada en estos geles (9%) es superior a la de los geles de la electroforesis vertical (6%). El protocolo de preparación de geles de acrilamida T₉C₅ era el siguiente:

- 1.- Limpiar los cristales que actuarán como soporte para la polimerización del gel con etanol al 96% para eliminar suciedad, impurezas o restos de acrilamida de preparaciones anteriores.

- 2.- Impregnar la superficie del cristal que posee el molde de los pocillos con 40 μL de Repel-Silane ES (Dimetildiclorosilano al 2%, Pharmacia Biotech). La acción de este reactivo es evitar que la solución de Acrilamida/Piperacina se quede adherida a la superficie del cristal después de su polimerización.
- 3.- Recortar una lámina de Gel-Fix[®] for PAG (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) de 125 x 105 mm y adherirla al cristal sin moldes para los pocillos. Para ello se pondrá una gota de agua que cohesionará el Gel-Fix[®] a la superficie del cristal. Tras la polimerización de la solución T_9C_5 , el gel resultante quedará adherido al Gel-Fix[®] facilitando así su transporte o manipulación.
- 4.- Aproximar ambos cristales de tal modo que la lámina de Gel-Fix[®] quede hacia el interior.
- 5.- Fijar los cristales con pinzas de presión para evitar fugas de la solución T_9C_5 después de introducirla en el hueco existente entre ambos cristales.
- 6.- En un vaso de precipitados (PIREX de 25mL), se prepararon los reactivos del gel siguiendo esta receta: 4,4 mL de solución stock T_9C_5 (compuesta por 20 mL de Tris-HCl, 1,71 gr de Acrilamida y 0,09 gr de Piperazina); 350 μL de glicerol, que conferirán mayor consistencia y plasticidad al gel, evitando así su ruptura durante la manipulación; 25 μL de APS al 10% y 10 μL de TEMED.
- 7.- Verter la mezcla preparada anteriormente dentro del hueco entre ambos cristales. Uno de ellos posee una zona limada para facilitar la entrada de una punta de pipeta a través de la cual introduciremos la mezcla.
- 8.- Dejar polimerizar durante 20 minutos antes de proceder al desensamblaje de los cristales.
- 9.- Transcurrido este tiempo, separar los cristales y despegar el Gel-Fix[®] que llevará el gel adherido a su superficie. Situarlo encima de una superficie plana y cargar 1,5 μL de cada muestra en su pocillo correspondiente.
- 10.- Ubicar el gel sobre el Flat Bed Apparatus FBE-3000, conectar los electrodos a la fuente de alimentación previamente programada con el voltaje y el amperaje deseados y comenzar la electroforesis.

III.3.4.3. Electroforesis capilar en secuenciador con primers marcados con FAM

Al igual que las dos técnicas citadas anteriormente, la electroforesis capilar separa fragmentos de DNA según su tamaño. Esta técnica se basa en someter los fragmentos a una diferencia de potencial y lograr su migración a través de un capilar (no de un gel, principal diferencia con las otras dos técnicas) en cuyo interior se dispone la matriz electroforética, permitiendo separar fragmentos de DNA de cadena sencilla que se diferencian en una única base. En la electroforesis capilar, la doble capa iónica de la superficie interna de la pared del capilar debe ser inmovilizada mediante polímeros especialmente formulados para suprimir el flujo electro-osmótico (FEO). Esta supresión permite que

el DNA migre desde el cátodo hacia el ánodo sin la influencia del flujo del fluido y pase a través de la célula de detección. En ella, un láser ilumina los capilares desde ambos lados del array y excita los fluorocromos de los primers, generando la emisión de fluorescencia que es recogida y separada por su longitud de onda. Los primers estén marcados con fluorocromos para que los productos de PCR puedan ser detectados. Los datos crudos obtenidos se transfieren a un ordenador donde serán transformados mediante algoritmos quimiométricos para su posterior análisis.

Los primers empleados en este estudio, cuyos productos de PCR se analizaron a través de esta técnica, fueron marcados en el extremo 5' con carboxifluoresceína (FAM). La preparación de las muestras para el análisis con el secuenciador consistía en añadir 9 µL de formamida y 0,3 µL de GeneScan™ 500 LIZ™ Size Standard (como patrón de tamaño) a cada 1,5 µL de producto de PCR de cada muestra y desnaturalizarlas a 94°C durante 3 minutos.

El secuenciador empleado para el análisis fue el ABI 3130 xl (Applied Biosystems) de 16 capilares. Los datos se analizaron con el software Gene Mapper v3.02. La electroforesis se programó a voltaje constante de 200 V, variando el tiempo de corrida de 60 a 90 minutos dependiendo del tamaño de los fragmentos analizados.

III.3.5. Tinción de los geles

Acabada la electroforesis, debe verificarse que los tamaños de las bandas obtenidas se corresponden con los esperados para los distintos productos de PCR. Sin embargo, este punto incurre en una limitación técnica, puesto que las propiedades incoloras del DNA impiden la detección a simple vista de su acúmulo en los geles. Se precisa, para tal efecto, la utilización de compuestos visibles que se unan al DNA de forma específica e indiquen la posición exacta de la banda en el gel, tales como el Bromuro de Etidio y el Nitrato de Plata. Ambos compuestos fueron empleados en las tinciones realizadas en esta tesis.

III.3.5.1 Tinción con Bromuro de Etidio

La utilización de 3 µL de Bromuro de Etidio (10 µg/µL) disueltos en agarosa fundida (50 mL) permitió la visualización de los productos de PCR en este tipo de geles al exponerlos a luz ultravioleta. En el caso de los geles de poliacrilamida verticales, la visualización de las bandas se consiguió después de sumergirlos en una solución de Bromuro de Etidio (1 mg/mL) con agitación durante 15 minutos y exposición posterior a luz ultravioleta. En ambos casos, debido a la dificultad de conservación de los geles, tras la tinción se capturaron imágenes de cada gel analizado para crear un registro fotográfico que podría ser consultado en cualquier momento.

III.3.5.2. Tinción con nitrato de plata

Esta tinción proporciona mayor sensibilidad y resolución que la de Bromuro de Etidio. Sin embargo, es un proceso laborioso y lento que requiere muchos más pasos para procesar el gel. Las etapas que un gel de acrilamida debe pasar para ser teñido mediante este método son:

- 1.- Sumergir el gel en una solución de Etanol al 10% (25 mL Etanol + 225 mL de H₂O destilada) y dejar en agitación durante 10 minutos. Esto fija el DNA en la posición que ocupa en el gel cuando se detiene la electroforesis y se comienza con la tinción.
- 2.- Vaciar el Etanol y añadir una solución de ácido nítrico al 1% (2,5 mL HNO₃ en 247,5 mL de H₂O destilada). El ácido nítrico condiciona un cambio brusco de pH en el medio que favorecerá la unión específica del nitrato de plata al DNA.
- 3.- Retirar el ácido nítrico y añadir 250 mL de H₂O destilada, manteniendo en agitación durante 6 minutos. Se consigue, de este modo, que el medio no presente un pH excesivamente ácido que pueda alterar el proceso de tinción.
- 4.- Se desecha el H₂O destilada, se añade una solución de nitrato de plata al 0,2% (0,5 gr de AgNO₃ en 250 mL de H₂O destilada) y se tapa el recipiente con papel de aluminio para evitar la degradación del nitrato de plata con la luz.
- 5.- Vaciar el nitrato de plata y realizar dos lavados, durante 30 segundos cada uno, con 150 mL de H₂O destilada. De esta forma se eliminará todo el nitrato de plata no unido al DNA.
- 6.- Añadir una solución de carbonato sódico (7,5 gr de CO₃Na en 250 mL de H₂O destilada) y formaldehído al 0,02%. Así, se aportaría el medio básico necesario para promover el proceso de reducción característico del revelado.
- 7.- Comprobar que el gel esté sumergido durante el tiempo preciso en la solución de carbonato sódico/formaldehído. Si se sobrepasa el tiempo, las bandas se verán más claras y difuminadas, dificultando enormemente la lectura del gel.
- 8.- Desechar la solución de carbonato sódico/formaldehído y hacer un lavado con ácido acético al 10% durante dos minutos. Con ello se logrará detener la reacción de revelado.
- 9.- Vaciar el ácido acético y hacer dos lavados con 150 mL de H₂O destilada en cada uno para evitar que los restos de ácido acético dañen el gel.
- 10.- Agregar 50 mL de solución conservadora (48 mL de ácido acético al 5% + 2 mL de Glicerol) para aportar mayor plasticidad y resistencia al gel.
- 11.- Secar bien el gel antes de su almacenamiento.

III.3.6. Caracterización de los alelos

Los alelos de cada locus se diferenciaron según el patrón de migración en geles de acrilamida, asignando el valor “1” al de menor tamaño y aumentando el valor numérico a medida que incrementaba el tamaño de los alelos.

Los datos obtenidos de la electroforesis capilar proporcionaban el tamaño exacto del producto amplificado, con las variaciones pertinentes de longitud entre los distintos alelos de cada locus. Se siguió la norma anterior, de asignar un valor para cada tamaño, para denominar los diferentes alelos encontrados en cada locus analizado con el secuenciador de capilares.

III.3.7. Reconstrucción de los haplotipos. Análisis de cosegregación

Los genotipos de todos los STRs, incluidos los del décaplex del IPATIMUP, y de los SNPs fueron agrupados en una tabla y ordenados de forma descendiente en relación con su posición física en el cromosoma. Los datos así ordenados permitieron la reconstrucción de los haplotipos de los individuos para su posterior análisis. Para facilitar la interpretación de los resultados, se aplicó un código de colores en los cromosomas de los individuos de la generación III dependiendo del cromosoma X que heredaron de su madre (II.2) o de su padre (II.1). Uno de los cromosomas maternos se representó en rojo y el otro en violeta, mientras que el paterno se coloreó en verde. Los cromosomas de III.2 se representaron en color azul y amarillo para diferenciarlos de los cromosomas de II.2.

III.4. Análisis de genes responsables de RP autosómica recesiva

El análisis se realizó mediante un array diseñado por Pomares *et al.* que comprendía 21 genes a estudio (Pomares *et al.*, 2007). De estos genes, 17 eran responsables de formas de RP autosómica recesiva (*ABCA4*, *CERKL*, *CNGA1*, *CNGB1*, *CRB1*, *LRAT*, *MERTK*, *NR2E3*, *PDE6A*, *PDE6B*, *RGR*, *RHO*, *RLBP1*, *RPE65*, *SAG*, *TULP1*, *USH2A*), aunque cuatro de ellos también causaban amaurosis congénita de Leber o arLCA (*CRB1*, *LRAT*, *RPE65* y *TULP1*). Los cuatro genes restantes estaban implicados en arLCA (*AIPL1*, *CRX*, *GUCY2D* y *RPGRIP1*).

El desarrollo de este array estaba basado en dos pasos de selección de SNPs en los 21 genes estudiados. El primer paso valoró la informatividad de los SNPs más informativos de cada gen en diferentes poblaciones genéticas, resultando en la preselección de 7-10 SNPs por gen. El genotipado inicial de estos SNPs en las plataformas SNPlex (Applied Biosystems, Foster City, CA, US) o MassARRAY (Sequenom, San Diego, CA, US), sirvió como método de validación y evaluación de la capacidad de actuación de ambas plataformas. En el segundo paso de selección de SNPs, se

escogieron los cuatro SNPs más informativos de cada uno de los 21 genes y de un nuevo gen añadido, *RDH12* (exclusivo de arLCA). Estos 88 SNPs fueron incorporados en un array diseñado para la plataforma MassARRAY. Cualquiera de las dos plataformas resultó perfectamente válida para el análisis de los genes de RP autosómica recesiva.

III.4.1. Array de genes de RP autosómica recesiva en plataforma SNPlex

La plataforma SNPlex utiliza la ligación de oligonucleótido (OLA, *Oligonucleotide Ligation Assay*) en combinación con la tecnología PCR múltiPLEX para lograr la discriminación de los dos alelos de un SNP. El empleo de dos oligonucleótidos, diferenciados en su extremo 3' según la variante nucleotídica del SNP que posean, junto con un tercer oligonucleótido que hibrida con la región inmediatamente adyacente al SNP, permite la obtención de determinados productos de ligación. Mientras que todos los oligonucleótidos contienen las secuencias de primer universales, solamente los dos primeros incluyen una secuencia específica de cada variante del SNP denominada ZipCode. Los productos de ligación son amplificados a través de una PCR múltiPLEX que emplea como primers las secuencias universales presentes en los oligonucleótidos. Los amplicones resultantes son hibridados con una mezcla de sondas fluorescentes "ZipChute", complementarias a las secuencias ZipCode, claramente distinguibles entre sí según el patrón migratorio que presentan en electroforesis capilar. El reconocimiento del tipo de sonda ZipChute hibridada con cada oligonucleótido se efectuó con un secuenciador DNA Analyzer 3730xl (Applied Biosystems) y el software GeneMapper v3.5 (Applied Biosystems).

Todos los procesos y reacciones necesarias para el genotipado de las muestras se realizan en placas de 384 pocillos, pudiendo genotipar simultáneamente hasta 48 SNPs en cada muestra. El genotipado de los 175 SNPs pertenecientes a los 21 genes analizados con este chip (*RDH12* no estaba incluido) se realizó siguiendo este protocolo:

1.-Preparación del DNA genómico

- a) Diluir el DNA previamente purificado con la cantidad necesaria de TE 1X (10 mM de Tris HCl, 1mM de EDTA, pH 8) para alcanzar una concentración final de 50-200 ng/ μ L en un volumen de 12,5 a 150 μ L.
- b) Después de ajustar las concentraciones, proceder a la fragmentación del DNA genómico mediante calor para obtener mejores resultados en el genotipado. En una placa de 96 pocillos, dispensar 150 μ L de la solución de DNA, cubrir con un film adhesivo e introducir en un termociclador con el siguiente programa:

4°C	1 min.
99°C	10 min.
4°C	ad infinitum.

- c) Terminado el programa, retirar la placa y mantener en hielo. Ajustar las concentraciones de las muestras a 18,5 ng/μL diluyendo con TE 1X.
- d) Rotular las placas de reacción que se van a utilizar, dispensar 2 μL de DNA fragmentado de cada muestra (concentración final de 18,5 ng/μL) en su pocillo correspondiente, dejando vacíos los pocillos asignados a los controles de DNA, los controles sin muestra y los del *ladder* alélico.
- e) Añadir 1,26 μL de TE 1X y 0,74 μL de DNA control suministrado con el kit de SNPlex (~ 37 ng) en cada pocillo asignado a los controles de DNA. En los pocillos de los controles sin muestra cargar 2 μL de TE 1X. No añadir ningún reactivo a los pocillos del *ladder* alélico.
- f) Centrifugar la placa ligeramente para que todo el contenido se vaya al fondo del pocillo. Dejar en un lugar oscuro y libre de productos de PCR hasta que el líquido se evapore. Una vez evaporado, sellar la placa con film adhesivo, manteniéndola en oscuridad y a temperatura ambiente hasta su utilización.

2.- Fosforilación y ligación del DNA genómico

- a) Eliminar el film de sellado de las placas que contienen DNA genómico fragmentado y seco y pipetear 5 μL de OLA (*Oligonucleotide Ligation Assay*, Applied Biosystems) en cada pocillo, excepto en los reservados para el *ladder* alélico. Los 5 μL de OLA contienen 2,3 μL de H₂O libre de nucleasas; 2,5 μL de Master Mix de ligación de oligonucleótidos; 0,05 μL de Universal Linkers 48-plex; 0,1 μL de Ligation Probes y 0,05 μL de dATP 100X.
- b) Sellar la placa de reacción de 384 pocillos con el cobertor de placas ABI Prism[®] Optical Cover Compression Pad e introducirla en un termociclador con el siguiente programa:

1 ciclo de:	48°C	30 min.
1 ciclo de:	90°C	20 min.
25 ciclos de:		
Desnaturalización:	94°C	15 seg.
Annealing:	60°C	30 seg.
Extensión:	51°C	30 seg.
1 ciclo de:	99°C	10 min.
Mantenimiento:	4°C	ad infinitum.

- c) Terminado el programa del termociclador, retirar la placa y centrifugar ligeramente. En caso de no poder continuar con el proceso, mantener la placa a -20°C hasta su utilización.

3.- Purificación de los productos de la reacción de ligación

- a) Añadir, a cada pocillo de la placa de reacción de ligación, 5 μL de una mezcla de reacción con los siguientes reactivos: 4,2 μL de H₂O libre de nucleasas; 0,5 μL de Exonuclease Buffer 10X; 0,2 μL de Lambda Exonuclease y 0,1 μL de Exonuclease I.

- b) Sellar la placa con el cobertor, vortear y centrifugar ligeramente. Después de esto, introducirla en un termociclador programado con los siguientes ciclos:

37°C	90 min.
80°C	10 min.
4°C	ad infinitum.

- c) Terminado el programa, retirar la placa del termociclador y centrifugar ligeramente para que todo el líquido descienda al fondo del pocillo.
- d) Agregar 15 μL de H_2O libre de nucleasas a cada pocillo de la placa, vortear y centrifugar ligeramente.
- e) En caso de no poder continuar con el proceso, mantener la placa a -20°C hasta su utilización.

4.- Realización de la PCR

- a) Dispensar 7,9 μL de mezcla de reacción de PCR y 2,1 μL de producto purificado y diluido de la reacción de ligación en cada pocillo de las placas utilizadas para la PCR. La mezcla de reacción contiene los siguientes reactivos: 2,4 μL de H_2O libre de nucleasas; 5 μL de Amplification Master Mix 2X y 0,5 μL de Amplification Primers 20X.
- b) Sellar la placa con un cobertor e introducirla en un termociclador previamente programado con los siguientes ciclos:

Desnaturalización inicial:	95°C	10 min.
30 ciclos de:		
Desnaturalización:	95°C	15 seg.
Annealing-Extensión:	63°C	1 min.
Mantenimiento:	4°C	ad infinitum.

- c) Acabado el programa, retirar la placa del termociclador y proceder con el siguiente paso del proceso. En caso de no poder continuar, la placa podría ser almacenada a 4°C durante 24 horas o a -20°C durante un mes sin riesgo de degradación de los productos de PCR.

5.- Hibridación de los productos de PCR con las sondas ZipChute

- a) Vortear y después centrifugar brevemente las placas de PCR para que todo el líquido baje al fondo del pocillo.
- b) Lavar los pocillos de las placas de hibridación en tres ocasiones con 100 μL de tampón de lavado diluido 1:10 con agua desionizada. Eliminar el líquido sobrante de los lavados volteando las placas y golpeándolas ligeramente sobre un papel secante limpio.

- c) Añadir 17,5 μL de buffer de unión conteniendo el control positivo de hibridación (17,491 μL de buffer de unión y 0,009 μL de control positivo de hibridación) a la placa de hibridación de SNPLex.
- d) Transferir 1,5 μL de los productos de PCR contenidos en los pocillos de las placas de PCR a la placa de hibridación de SNPLex y mezclar bien.
- e) Cubrir la placa de hibridación con un cobertor e incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos en un horno rotatorio. Transcurrido este tiempo, sacar la placa del agitador y centrifugarla brevemente para agrupar el líquido en el fondo del pocillo.
- f) Destapar la placa de hibridación y retirar el sobrenadante de cada pocillo.
- g) Lavar cada pocillo tres veces con 100 μL de tampón de lavado diluido 1:10 con agua desionizada. Eliminar el exceso de líquido de los pocillos golpeando la placa volteada hacia abajo contra un papel secante limpio.
- h) Agregar 50 μL de NaOH 0,1 N a cada pocillo, sellar la placa con un cobertor e incubar la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- i) Destapar la placa de hibridación y retirar el sobrenadante de cada pocillo.
- j) Lavar cada pocillo cinco veces con 100 μL de tampón de lavado diluido 1:10 con agua desionizada. Eliminar el exceso de líquido de los pocillos.
- k) Añadir 25 μL de mezcla de hibridación a cada pocillo. La mezcla de hibridación contiene: 0,05 μL de ZipChute Mix 48-plex; 11,25 μL de desnaturalizante y 13,70 μL de tampón de dilución ZipChute.
- l) Cubrir la placa con un cobertor e incubar a 37°C durante una hora en un horno rotatorio.

6.- Elución de las sondas ZipChute

- a) Después de los 60 minutos de incubación a 37°C, retirar la placa de hibridación del agitador y desechar el sobrenadante de cada pocillo.
- b) Lavar los pocillos cuatro veces con 100 μL de tampón de lavado diluido 1:10 con agua desionizada. Después del último lavado, situar la placa boca abajo encima de varios papeles secantes y centrifugarlos a 1000 rpm durante 1 minuto para eliminar el buffer que podría quedar en los pocillos.
- c) Añadir 17,5 μL de mezcla de carga conteniendo el estándar de tamaño a cada muestra. La mezcla de carga está compuesta por: 0,6 μL de estándar de tamaño 48-plex y 16,9 μL de reactivo de carga.
- d) Cubrir la placa con un cobertor e incubarla a 37°C durante 30 minutos en un horno rotatorio.

7.- Electroforesis de las muestras

- a) Retirar la placa de hibridación del horno rotatorio, vortearla y centrifugarla brevemente.

- b) Transferir 7,5 μL de cada pocillo a los pocillos de una nueva placa.
- c) Cargar 1 μL de *ladder* alélico junto con 7 μL de mezcla de carga en los pocillos reservados e introducir la placa en el secuenciador para ser analizada. En caso de no correr la placa inmediatamente, sellarla y mantenerla a -20°C para su correcta conservación hasta que sea procesada.
- d) Los datos resultantes serán finalmente analizados con el software GeneMapper v3.5 para obtener el genotipo de cada uno de los SNPs que constituyen el chip.

III.4.2. Array de genes de RP autosómica recesiva en plataforma MassARRAY

La tecnología MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*) empleada por la plataforma MassARRAY (Sequenom) permite la detección e identificación de los productos de la reacción de discriminación alélica. Las dos estrategias de genotipado empleadas por esta plataforma -hME e IPLEX Gold- presentan dos fases en el proceso de genotipado de las muestras. En la primera, similar para ambas estrategias, se procede a la amplificación por PCR múltiple de los segmentos de DNA que albergan los SNPs de interés. Sin embargo, la reacción de discriminación alélica consumada en la segunda fase es diferente según la estrategia de genotipado empleada. En hME, una reacción de minisequenciación que genera productos alelo-específicos de 1 a 4 nucleótidos más largos que el primer MassEXTEND original, permite la discriminación alélica. El número máximo de SNPs por ensayo conseguidos con esta estrategia es de 15; pero el número final variará dependiendo del número de SNPs candidatos para hacer el diseño y la presencia de motivos en la secuencia, interacciones entre oligonucleótidos, etc. situando la media en 8 SNPs por ensayo.

Terminador	A	C	G	T
A	0	-24	16	55,9
C	24	0	40	79,9
G	-16	-40	0	39,9
T	-55,9	-79,9	-39,9	0

Tabla 2: Diferencias de masa existentes entre los productos de la reacción iPLEX Gold para un ensayo único. Tomada de iPLEX™ Gold Application Guide, Cap. 1, pág. 4, Noviembre 2006.

Por su parte, en iPLEX Gold solamente se produce la extensión de una base (*Single Base Extensión, SBE*). El pequeño desfase de masas observado entre los productos amplificados, debido a la diferencia de masa existente entre los nucleótidos finalmente añadidos en cada producto, se solventa mediante la incorporación de terminadores con masa modificada (Tabla 2). El uso de una única mezcla de terminación logra el aumento de la eficacia en el diseño de los plexes, permitiendo genotipar hasta 36 SNPs por ensayo, con una media de 24. Por último, el uso de cebadores de minisequenciación con diferentes tamaños permite la identificación de los picos correspondientes a los productos de cada SNP.

Todas las reacciones del proceso de genotipado tienen lugar en placas de 384 pocillos. Los productos obtenidos son transferidos de forma automatizada a la superficie del chip para su posterior lectura por el espectrómetro.

Los 88 SNPs que constituyen este chip (4 SNPs para cada uno de los 22 genes analizados) fueron genotipados siguiendo estas indicaciones:

1.- Aislamiento y cuantificación del DNA genómico

Antes de comenzar ninguna reacción para determinar la variación genética de un SNP con la plataforma MassARRAY, es preciso obtener DNA genómico de gran pureza para ser empleado como molde de amplificación de la PCR. Después del aislamiento, según los métodos referidos en el punto III.2.2. el DNA fue cuantificado y diluido en H₂O MilliQ Autoclavada hasta alcanzar una concentración de 50 ng/μL. El proceso de genotipado requirió entre 5 y 10 ng de DNA por reacción, por lo que el DNA genómico fue diluido a una concentración de trabajo de 5-10 ng/μL.

2.- Amplificación del DNA por PCR para genotipado

En el diseño de primers de reacciones múltIPLEX es particularmente importante evitar la formación de dímeros entre los distintos primers que constituyen la múltIPLEX. El tamaño óptimo del fragmento que contiene el sitio polimórfico amplificado por las parejas de primers seleccionadas oscilará entre las 80 y las 120 pb. Deben evitarse fragmentos superiores a las 400 pb.

Con el objeto de evitar confusiones en el espectro de masas y mejorar la eficiencia de la PCR, la masa del primer de amplificación debe ser diferente de la del primer de extensión y de sus productos de extensión. Para ello, se recomienda añadir una etiqueta genérica (5'-ACGTTGGATG-3') al extremo 5' de cada primer de amplificación. La amplificación de los fragmentos que incluyen el SNP de interés fue realizada siguiendo estas pautas:

- a) Preparar una mezcla de reacción de PCR con las siguientes cantidades de reactivos para cada pocillo: 1,85 μL de H₂O (pureza HPLC); 0,625 μL de PCR Buffer (10X; 15mM MgCl₂); 0,325 μL de MgCl₂ (25 mM); 0,1 μL de dNTP mix (25 mM de cada uno); 1 μL de Primer mix (500 nM de cada uno) y 0,1 μL de HotStarTaq[®] (5 U/μL).
- b) Agregar 1 μL de DNA genómico (5-10 ng/μL) en cada uno de los pocillos de la placa de 384 pocillos.
- c) Dispensar 4 μL de la mezcla de reacción de PCR en cada pocillo.
- d) Centrifugar la placa a 1000 rpm durante 1 minuto.
- e) Vortear la placa, sellarla con film y centrifugarla brevemente antes de iniciar el termociclado.
- f) Introducir la placa en el termociclador, al que previamente se le habrán programado los siguientes ciclos:

Desnaturalización inicial:	94°C	15 min.
45 ciclos de:		
Desnaturalización:	94°C	20 seg.
Annealing:	56°C	30 seg.
Extensión:	72°C	1 min.
Extensión final:	72°C	3 min.
Mantenimiento:	4°C	ad infinitum.

3.- Tratamiento con SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*).

El objetivo de este paso es desfosforilar los dNTPs no incorporados. El proceso se realizó siguiendo estas pautas:

- Preparar una solución con las siguientes cantidades de reactivos para cada pocillo: 1,53 μL de H_2O (pureza HPLC); 0,17 μL de SAP Buffer (10X) y 0,3 μL de enzima SAP (1,7 U/ μL).
- Sellar la placa con film y comprobar que los bordes están bien pegados.
- Centrifugar la placa a 1000 rpm durante 1 minuto.
- Incubar la placa respetando los siguientes tiempos y temperaturas:

37°C	40 min.
85°C	5 min.
4°C	ad infinitum.

4.- Ajuste de las concentraciones de primers de extensión.

Cuando se trabaja con multiPLEXes, es necesario ajustar las concentraciones de oligos para equilibrar las ratios señal-ruido. Un método general para el ajuste de primers consiste en dividir los primers en dos grupos dependiendo del tamaño. Todos los primers del grupo de mayor tamaño tendrán el doble de concentración (1,25 μM en los 9 μL finales de la reacción) que los del grupo de menor tamaño.

5.- Reacción iPLEX.

Para lograr la extensión de los primers con iPLEX se siguieron estos pasos:

- Preparar una mezcla de reacción de iPLEX Gold con las siguientes cantidades de reactivos para cada pocillo: 0,7395 μL de H_2O (pureza HPLC); 0,2 μL de iPLEX Buffer Plus (10X); 0,1 μL de iPLEX Termination Mix (45X); 0,94 μL de Primer mix (7 μM para los del grupo de menor tamaño y 14 μM para los de mayor tamaño) y 0,0205 μL de enzima iPLEX (220X).
- Retirar la placa de los productos de amplificación incubados con SAP del termociclador y centrifugarla a 1000 rpm durante 1 minuto. Desechar el film de sellado y añadir el volumen correspondiente de mezcla de reacción iPLEX Gold (2 μL) a cada pocillo.

- d) Sellar la placa con film, comprobar que los bordes estén bien pegados e introducirla en un termociclador con el siguiente programa de ciclos:

Desnaturalización inicial:	94°C	30 seg.
40 ciclos de:		
Desnaturalización:	94°C	5 seg.
5 ciclos de:	52°C	5 seg.
	80°C	5 seg.
Extensión final:	72°C	3 min.
Mantenimiento:	4°C	ad infinitum.

6.- Limpieza de los productos de la reacción iPLEX Gold.

Para optimizar el análisis de espectrometría de masas, se sometió a los productos de la reacción iPLEX a un desalamiento siguiendo estos pasos:

- Retirar la placa del termociclador, centrifugarla a 1000 rpm durante 1 minuto y desechar el film de sellado.
- Añadir 16 µL de H₂O nanopura a cada pocillo. Sellar la placa con film y centrifugarla a 1600 rpm durante 30 segundos o hasta que hayan desaparecido las burbujas de aire.
- Desechar el film y agregar 6 mg de resina (*Clean Resin*) a cada pocillo.
- Rotar la placa sobre su eje longitudinal durante cinco minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar la placa a 4000 rpm durante 5 minutos.

7.- Dispensado de las muestras a los *Bioarrays SpectroCHIP*[®].

Mediante el nanodispensador MassARRAY los productos purificados de la reacción iPLEX son depositados sobre un *SpectroCHIP*[®] para proceder a la adquisición de su espectro con el espectrómetro de masas MassARRAY Analyzer Compact. El análisis de los datos resultantes permitió obtener el genotipado de cada SNP de interés.

III.4.3. Análisis de Cosegregación

Los genotipos generados por las plataformas permitieron la reconstrucción de los haplotipos de cada individuo, necesarios para el análisis de cosegregación. Tanto la reconstrucción de los haplotipos, como el análisis de cosegregación, fueron elaborados de forma manual.

En familias consanguíneas, la inclusión de un gen debía ser confirmada mediante cosegregación y homocigosidad. Sin embargo, en las no consanguíneas, la cosegregación o la pérdida de informatividad de los marcadores fueron criterios independientes, válidos de por sí, para la inclusión de un gen.

III.5. Análisis Mutacional

Los genes no excluidos con el chip fueron analizados, mediante secuenciación directa, para descartar las mutaciones conocidas y localizar nuevas mutaciones potencialmente responsables de la patología.

III.5.1. Amplificación de los exones

La amplificación de los exones de *MERTK* y sus regiones fronterizas con los intrones requirió la utilización de nuevas parejas de primers, situando el forward en el intrón anterior al exón y el reverse en el posterior.

III.5.1.1. Diseño de los primers

Los primers fueron diseñados siguiendo las normas descritas en el punto III.3.3.1.

III.5.1.2. Mezcla de reacción

Para un volumen final de 25 μL se añadieron 2,5 μL de Buffer de PCR 10X; 1,5 μL de MgCl_2 25 mM; 1 μL de cada primer a una concentración final de 10 μM ; 0,5 μL de dNTPs 10 mM; 0,14 μL de Taq Polimerasa (PROMEGA, Madison, Wisconsin) a 5 U/ μL , 17,36 μL de H_2O MilliQ autoclavada y 1 μL de muestra de DNA cuya concentración era de 100-200 ng/ μL .

III.5.1.3. Programa de amplificación

Al igual que en el punto III.3.3.2.5., la temperatura de annealing se fue ajustando hasta conseguir la óptima para cada pareja (entre 55 y 62°C). Los tiempos de extensión variaron, entre 45 y 90 segundos, según el tamaño del fragmento amplificado. El programa para la amplificación de los exones poseía las siguientes fases:

Desnaturalización inicial:	95°C	2 min.
40 ciclos de:		
Desnaturalización:	94°C	30 seg.
Annealing:	de 55 a 62°C	30 seg.
Extensión:	72°C	de 45 a 90 seg.
Mantenimiento:	4°C	ad infinitum.

III.5.1.4. Control de amplificación

En la misma reacción de PCR se amplificaron las muestras de DNA de los individuos estudiados y un control negativo, cuya función era descartar la contaminación de la mezcla de reacción o la incorrecta manipulación del material en condiciones no asépticas.

III.5.2. Secuenciación directa de los exones amplificados

Los productos de PCR obtenidos de la amplificación de los exones fueron purificados en placas de filtrado MultiScreen (MILLIPORE, Billerica, Massachusetts) para eliminar el exceso de primers y dNTPs sobrantes de la PCR y los productos de PCR no extendidos en su total longitud. Se evitó, con este procedimiento, las posibles interferencias de estos compuestos en las reacciones de secuenciación. Una vez purificados, estos productos de PCR se utilizaron como molde de amplificación en las reacciones de secuenciación, las cuales se realizaron usando el BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 Kit (Applied Biosystems). Los productos obtenidos de las reacciones de secuenciación fueron sometidos a una nueva purificación en placas Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup Kit (MILLIPORE) para incrementar su pureza antes de ser analizados en el secuenciador ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

En las reacciones de secuenciación, la mezcla de reacción contenía 1 µL de BigDye; 0,3 µL de primer; 1 µL de Buffer de secuenciación; 2 µL de producto de PCR purificado y H₂O MilliQ Autoclavada para un volumen final de 10,3 µL. El programa de amplificación tenía los siguientes ciclos:

Desnaturalización inicial:	96°C	1 min.
26 ciclos de:		
Desnaturalización:	96°C	10 seg.
Annealing:	50°C,	5 seg.
Extensión:	60°C	4 min.
Mantenimiento:	4°C	ad infinitum.

Para cada producto de PCR se hizo una reacción de secuenciación con el primer forward y otra con el reverse, con el ánimo de conocer la secuencia del fragmento amplificado en la mayor extensión posible.

III.6. RT-PCRs y cDNAs

A través de la retrotranscripción inversa se obtuvo el DNA complementario (cDNA) de cada RNA mensajero, lo que permitió conocer el reordenamiento de los exones en el RNA y corroborar el efecto de las posibles mutaciones encontradas en el DNA.

El cDNA de primera cadena de cada muestra se sintetizó a través del siguiente protocolo:

- 1.- En un eppendorf, se mezclaron 2,1 μ l de H₂O DEPC y 5 μ l de RNA total (~3 μ g).
- 2.- La mezcla fue desnaturalizada a 65°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se retiraron las muestras del bloque térmico y se introdujeron en hielo inmediatamente.
- 3.- A cada eppendorf se le agregaron 12,9 μ l de mix, compuesta por 1X First-Strand Reverse Transcription Buffer, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 100 U SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, California), 25 mM pd(N)₆ Random Hexamer Primers, 1 mM de cada dNTP, y 20 U de RNAGuard RNase Inhibitor (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey)
- 4.- La mezcla de reacción fue incubada a 25°C durante 10 minutos, consecutivamente a 42°C durante 50 minutos y por último a 99°C durante 3 min. Con esta última incubación se logró la inactivación de la retrotranscriptasa por calor.

III.6.1. Diseño de los primers

El diseño de todos los primers utilizados en la amplificación de cDNA se realizó de acuerdo con las normas descritas en el punto III.3.3.1. En una primera etapa, se diseñaron los primers F₁ y F₂ (Forward) y R₁, R₂ y R₃ (Reverse) con la intención de amplificar diferentes fragmentos del cDNA. El primer F₁ se emparejaba con R₁, mientras que F₂ cumplía las condiciones necesarias para amplificar fragmentos junto con R₂ y R₃. El primer F₁ también amplificaba con R₂ y R₃. Los fines de esta estrategia eran la verificación del correcto reordenamiento de los exones en el cDNA, o por el contrario, la identificación de posibles alteraciones sufridas en el proceso de splicing.

En una segunda etapa, y debido a la interacción de varias isoformas del gen *MERTK* en la amplificación de los fragmentos de cDNA anteriormente citados, se procedió a la realización de una PCR nested amplificando un fragmento de 983 pb exclusivo de la isoforma con 19 exones mediante los primers F₃ (Forward) y R₄ (Reverse). El producto de PCR obtenido de la amplificación con F₃ y R₄ fue reamplificado con una pareja de primers interna: F₁ y R₁, evitando así cualquier amplificación inespecífica de isoformas de pequeño tamaño.

En la práctica, la eficiencia de amplificación del primer F₁ en las PCR resultó ser superior a la del F₂. Debido a este motivo, se desechó el primer F₂ y F₁ se combinó con los reverse R₁, R₂ y R₃ para la amplificación de tres fragmentos de distintos tamaños: 443 pb, 204 pb y 127 pb.

Tabla 3.- Primers diseñados para la amplificación a partir del cDNA	
PRIMER	SECUENCIA (5'–3')
F1	AATACGGGGACCTGCATACTTAC
F2	TATCCCGATTGGAGACAGG
F3	GCTTGGGAGTCAGTGAGGAAC
R1	GGGCTGCTCAACCTGTG
R2	CGAAGTCCGCAACACAGA
R3	CTGTTGCTCAGATACTCCATTCC
R4	CAGTGGAGCAAGGGTGGAG

III.6.2. Mezcla de reacción

La mezcla de reacción utilizada en la gran mayoría de las PCRs fue la misma que la empleada en el punto III.5.1.2. para la amplificación de los exones. Sin embargo, en la PCR nested de F4-R5 y F1-EX16R se empleó PCR Master Mix[®] (PROMEGA), una solución que contiene Taq polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y buffer en las concentraciones adecuadas para la eficiente amplificación de fragmentos específicos a partir de pocas copias en el cDNA. Para cada muestra se emplearon las siguientes cantidades de reactivos: 4 µL de PCR Master Mix, 4 µL de H₂O MilliQ Autoclavada, 0,5 µL de cada primer y 1 µL de cDNA.

III.6.3. Programa de amplificación

Se utilizó un programa con un único paso de annealing-extensión a 68°C cuya duración, dependiendo de la longitud del fragmento amplificado, fue de 150 seg. para amplificar el fragmento F3-R4 o de 90 seg. para amplificar el fragmento F1-R1.

Desnaturalización inicial:	94°C	2 min.
40 ciclos de:		
Desnaturalización:	94°C	30 seg.
Annealing- Extensión:	68°C,	90/150 seg.
Mantenimiento:	4°C	ad infinitum.

El programa de amplificación empleado cuando las PCRs se realizaban con PCR Master Mix (PROMEGA) constaba de los siguientes pasos:

Desnaturalización inicial:	95°C	15 seg.
35 ciclos de:		
Desnaturalización:	94°C	30 seg.
Annealing:	58°C	90 seg.
Extensión:	72°C,	90 seg.
Extensión final:	72°C	10 min.
Mantenimiento:	4°C	ad infinitum.

III.6.4. Control de amplificación

Además del control negativo utilizado para detectar posibles contaminaciones ocurridas durante la manipulación de los reactivos de PCR (empleado en todas las PCRs descritas en este trabajo), las RT-PCRs poseían un control adicional para detectar posibles contaminaciones de DNA a través del proceso de aislamiento del RNA de cada muestra. Este control amplificaba un fragmento del gen housekeeping humano *ABL1* (*Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1*), mediante el primer forward A2: TTCAGCGGCCAGTAGCATCTGACTT (situado en el exón 2), y el reverse CA3: TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTGC (situado en el exón 3).

Cuando no existía contaminación con DNA, el control solamente amplificaba el fragmento A2-CA3 en el RNA de cada muestra, observándose una única banda de 276 pb en los geles de agarosa. Por el contrario, si las muestras estaban contaminadas con DNA, además de la banda de 276 pb, aparecería otra banda de 839 pb cuyo tamaño se explicaba como la suma del fragmento A2-CA3 amplificado sobre DNA y las 563 pb correspondientes al intrón 2 englobado en ese fragmento.

III.6.5. Secuenciación

Las bandas de productos de PCR fueron extraídas del gel y purificadas mediante QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). La secuenciación de estos productos se hizo siguiendo el protocolo descrito en el punto III.5.2., sin necesidad de realizar la primera purificación en placas de filtrado MultiScreen (MILLIPORE, Billerica, Massachusetts).

III.7. Búsqueda por todo el genoma (*Whole Genome Scan*)

El avance de la tecnología y de la secuenciación del genoma humano han permitido idear una estrategia de búsqueda de regiones candidatas basada en el genotipado *high-throughput* de miles de marcadores SNPs distribuidos a lo largo de todo el genoma.

Para la realización de este punto de la tesis doctoral, se ha utilizado el GeneChip[®] Human Mapping 250K NspI Array que garantiza un potente y flexible genotipado de SNPs en un gran número de muestras, además de una alta cobertura de los marcadores entre las diferentes poblaciones.

III.7.1. GeneChip[®] Human Mapping 250K NspI Array

El GeneChip[®] Human Mapping 500K Array Set se compone de dos arrays: GeneChip[®] Human Mapping 250K NspI Array y GeneChip[®] Human Mapping 250K StyI Array los cuales se

diferencian por el enzima encargado de la digestión del DNA. La utilización de este Array Set reduce la complejidad de trabajar con todo el genoma al amplificar, con un único primer, fragmentos de 200 a 1100 pb resultantes de la digestión de 250 ng de DNA con Nsp I o con Sty I. En este estudio, solamente se empleó el GeneChip® Human Mapping 250K NspI Array con capacidad para genotipar 262264 marcadores SNP distribuidos a lo largo del genoma. El otro array, StyI, realiza un análisis ligeramente inferior, genotipando 238304 marcadores. El procedimiento seguido fue:

1.- Requerimientos del DNA genómico

- a) Debe ser de doble cadena, para que se pueda producir el paso de la digestión enzimática.
- b) Debe estar libre de inhibidores de la PCR, como el grupo hemo de la hemoglobina, las altas concentraciones de agentes quelantes (p.e. EDTA), o las altas concentraciones de ciertas sales utilizadas en la extracción del DNA genómico.
- c) No debe estar contaminado con otro DNA humano o de otros organismos, ya que la amplificación por PCR del DNA genómico ligado no es específica de humanos. Suficientes cantidades de DNA no humano pueden ser amplificadas en esta PCR comprometiendo los resultados de genotipado.
- d) El DNA no debe estar muy degradado. Se debe garantizar que el fragmento de DNA que contenga uno de los SNPs analizados, tenga los sitios de restricción intactos para que la ligación se produzca en ambos extremos del fragmento y la PCR se pueda llevar a cabo.

2.- Preparación de la placa

- a) Resuspender el DNA de cada muestra vorteándolo durante 3 segundos.
- b) Determinar la concentración de DNA de cada muestra.
- c) Dependiendo de las concentraciones obtenidas, diluir las muestras con tampón TE (10 mM Tris Hcl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) hasta alcanzar una concentración final de 50 ng/μL.
- d) Resuspender de nuevo las muestras diluidas vorteándolas durante 3 segundos.
- e) Alicuotear 5 μL de DNA de cada muestra (concentración final de 50 ng/μL) al pocillo correspondiente de una placa de 96 pocillos.
- f) Si se continúa con el procesado, la placa debe ser mantenida en hielo. Si el procesado se pospone, la placa deberá ser sellada con un film adhesivo y posteriormente mantenida en congeladores a -20°C.

3.- Digestión con el enzima de restricción

Durante este paso, el DNA genómico fue digerido por el enzima de restricción NspI. A cada pocillo de la placa se le añadió la mezcla de reacción de digestión. Hecho esto, se introdujo en un termociclador y se corrió el programa de digestión.

Se empleó un control negativo al inicio del procedimiento para valorar la presencia de contaminación. Como control positivo se utilizó el DNA genómico de referencia 103 distribuido con el GeneChip® Mapping 250K Assay Kits NspI. El protocolo empleado contenía los siguientes pasos:

- a) Vortear la placa durante 3 segundos para resuspender el DNA.
- b) Centrifugar la placa a 2000 rpm durante 3 segundos para que todo el volumen baje al fondo del pocillo. Mantenerla en hielo hasta su procesado.
- c) Preparar la mezcla de reacción de digestión mediante la siguiente receta:
1.- Añadir a cada pocillo: 11,55 µL de Agua MilliQ Autoclavada; 2 µL de Buffer NE 2 (10 X); 0,2 µL de BSA (Bovine Serum Albumin, 10 mg/mL) y 1 µL de Nsp I (10 U/ µL).
- d) Sellar la placa con film adhesivo.
- e) Vortear la placa durante 3 segundos.
- f) Centrifugar la placa a 2000 rpm durante 30 segundos.
- g) Cargar la placa en el termociclador y correr el siguiente programa de digestión:

37°C	120 min.
65°C	20 min.
4°C	ad infinitum.
- h) Al finalizar el programa, retirar la placa del termociclador y centrifugarla a 2000 rpm durante 30 segundos.
- i) Si se continúa con el procesado, la placa debe ser mantenida en hielo. Si el procesado se pospone, la placa deberá ser sellada con film adhesivo y mantenida a -20°C.

4.- Ligación

En esta fase, las muestras digeridas son ligadas usando los adaptadores Nsp. Se preparó la mezcla de reacción de ligación y se le añadió a cada muestra. Posteriormente, las placas se introdujeron en un termociclador y se corrió el programa de ligación. Terminado el programa, se procedió a la dilución de las muestras ligadas. El protocolo a seguir consistía en:

- a) Vortear la placa durante 30 segundos.
- b) Centrifugar la placa a 2000 rpm durante 30 segundos.
- c) Preparar la mezcla de reacción de ligación. Añadir a cada muestra: 0,75 µL de Adaptor Nsp I (50 µM); 2,5 µL de T4 DNA Ligase Buffer (10 X) y 2 µL de T4 DNA Ligase (400 u/ µL). El Adaptor Nsp I esta compuesto por dos oligonucleótidos específicos para la ligación a los sitios de restricción de Nsp, cuyas secuencias son:

5'-ATTATGAGCACGACAGACGCCTGATCTCATG-3'
3'-AATACTCGTGCTGTCTGCGGACTAGAp-5'
- d) Sellar la placa con film adhesivo, vortearla durante 3 segundos y centrifugarla a 2000 rpm durante 30 segundos.
- e) Cargar la placa en el termociclador y correr el siguiente programa de ligación:

16°C	180 min.
70°C	20 min.
4°C	ad infinitum.

- f) Terminado el programa de ligación, retirar la placa del termociclador y centrifugarla a 2000 rpm durante 30 segundos. Mantenerla en hielo.
- g) Diluir las muestras añadiendo 75 μ L de agua MilliQ Autoclavada a cada muestra.
- h) Sellar la placa con film adhesivo, vortearla durante 3 segundos y centrifugarla a 2000 rpm durante 30 segundos.
- i) Si se continúa con el procesado, la placa debe ser mantenida en hielo. Si el procesado se pospone, la placa deberá ser sellada con film adhesivo y mantenida a -20°C.

5.- PCR

El objetivo de este paso consiste en transferir cantidades iguales de cada muestra ligada a 3 nuevas placas de 96 pocillos. Tras preparar la mezcla de reacción de PCR y agregar la cantidad correspondiente a cada muestra, cada placa fue introducida en un termociclador para correr el programa de PCR. Se empleó un control negativo de PCR para valorar la presencia de contaminación. El protocolo seguido para el proceso de la PCR consistió en:

- a) Vortear la placa durante 3 segundos y después centrifugarla a 2000 rpm durante 30 segundos.
- b) Rotular la placa como “LIG” y mantenerla en hielo.
- c) Transferir 10 μ L de muestra de cada pocillo de la placa rotulada como “LIG” a cada pocillo correspondiente en las tres nuevas placas rotuladas como: P1, P2 y P3.
- d) Sellar las placas con film adhesivo y mantenerlas en hielo hasta su procesado.
- e) Preparar la mezcla de reacción de la PCR, sabiendo que cada muestra necesita: 39,5 μ L de Agua MilliQ Autoclavada; 10 μ L de TITANIUM Taq PCR Buffer (10X); 20 μ L de GC-Melt (5M); 14 μ L de dNTPs (2,5 mM de cada uno); 4,5 μ L de PCR Primer 002 (5'-ATTATGAGCACGACAGACGCCTGATCT-3', 100 μ M) y 2 μ L de TITANIUM Taq DNA Polymerase (50X).
- f) Añadir 90 μ L de la mezcla de reacción de PCR a cada muestra de las 3 placas. Sellar las placas con film adhesivo, vortearlas durante 3 segundos y centrifugarlas a 2000 rpm durante 30 segundos. Mantenerlas en hielo hasta que se introduzcan en los termocicladores.
- g) Cargar la placa en el termociclador y correr el siguiente programa de PCR:

Desnaturalización inicial:	94°C	3 min.
30 ciclos de:		
Desnaturalización:	94°C	30 seg.
Annealing	60°C	45 seg.

Extensión:	68°C,	15 seg.
Extensión final:	68°C,	7 min.
Mantenimiento	4°C	ad infinitum.

- h) Terminado el programa de PCR, retirar las placas del termociclador y centrifugarlas a 2000 rpm durante 30 segundos. Mantenerlas en hielo.
- i) Si se continúa con el procesado, la placa debe ser mantenida en hielo. Si el procesado se pospone, la placa deberá ser sellada con film adhesivo y mantenida a -20°C.

6.- Purificación y elución de los productos de PCR

En este paso, los productos de PCR obtenidos en las tres placas fueron diluidos con EDTA y purificados mediante placas de purificación. Después de ser eluidos, los productos de PCR fueron reconcentrados en una nueva placa de 96 pocillos. El protocolo empleado fue el siguiente:

- a) Vortear las 3 placas durante 3 segundos y después centrifugarlas a 2000 rpm durante 30 segundos.
- b) Añadir 8 µL de EDTA 0,1 M a cada pocillo de las 3 placas.
- c) Sellar las placas, vortearlas durante 3 segundos y después centrifugarlas a 2000 rpm durante 30 segundos.
- d) Cargar los productos de PCR de las placas P1, P2 y P3 en la placa de purificación (Cleanup Plate). Cada fila de las placas P1, P2 y P3 debe ser cargada en la fila correspondiente de la placa de purificación. El volumen final en cada pocillo de la placa de purificación será de unos 320 µL.
- e) Poner la placa de purificación encima del colector de vacío. Conectarlo y subir lentamente la presión hasta llegar a 600 mbar. Mantener esta presión hasta que los pocillos estén secos.
- f) Lavar los productos de PCR añadiendo 50 µL de Agua MilliQ Autoclavada en cada pocillo de la placa de purificación y secando en el colector de vacío durante 15-20 minutos. Realizar un total de 3 lavados.
- g) Tras el tercer lavado, y una vez que los pocillos estén bien secos, apagar el colector de vacío, retirar la placa y secar la parte inferior de la misma con papel absorbente.
- h) Añadir 45 µL de RB Buffer a cada pocillo de la placa.
- i) Situar la placa sobre un agitador orbital y agitar la placa a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- j) Transferir 45 µL de cada muestra eluida desde la placa de purificación hasta una nueva placa de 96 pocillos.
- k) Si se continúa con el procesado, la placa debe ser mantenida en hielo. Si el procesado se pospone, la placa deberá ser sellada con film adhesivo y mantenida a -20°C.

7.- Cuantificación y normalización

El fin de este paso es cuantificar los productos de PCR diluidos para conocer su concentración. Una vez determinada la concentración, se deberá normalizar cada reacción a 2 µg/µL en RB Buffer para mantener el pH correcto. El procedimiento para la consecución de este paso consistió en:

- a) Vortear la placa durante 3 segundos y después centrifugarla a 2000 rpm durante 30 segundos. Mantener la placa en hielo.
- b) Medir la concentración de producto de PCR de cada pocillo con un espectrofotómetro. Realizar esta operación por triplicado. El dato final de la concentración vendrá dado por la media de las tres medidas.
- c) Una vez conocida la concentración de producto de PCR de cada pocillo, deberán ser normalizadas a 2 µg/µL, o lo que es lo mismo, 90 µg de producto purificado de PCR en 45 µL de RB Buffer. Las muestras normalizadas se pasarán a una nueva placa de 96 pocillos.
- d) Sellar la placa con film adhesivo, vortearla durante 3 segundos y después centrifugarla a 2000 rpm durante 30 segundos. Mantener la placa en hielo.
- e) Si se continúa con el procesado, la placa debe ser mantenida en hielo. Si el procesado se pospone, la placa deberá ser sellada con film adhesivo y mantenida a -20°C.

8.- Fragmentación

En este paso los productos de PCR, previamente purificados y normalizados, serán fragmentados mediante el GeneChip® Fragmentation Reagent, que es una enzima DNasa I. Después de añadir la cantidad precisa de DNasa a cada pocillo, la placa se introducirá en un termociclador y se correrá un programa de fragmentación. Este proceso se basa en los siguientes pasos:

- a) Vortear la placa durante 3 segundos y después centrifugarla a 2000 rpm durante 30 segundos. Mantener la placa en hielo.
- b) Añadir 5 µL de Fragmentation Buffer (10X) a cada pocillo de la placa de 96 pocillos.
- c) Agregar 5 µL de GeneChip® Fragmentation Reagent diluido (0,05 U/µL).
- d) Sellar la placa con film adhesivo, vortearla durante 3 segundos y después centrifugarla a 2000 rpm a 4°C durante 30 segundos. Mantener la placa en hielo.
- e) Cargar la placa en el termociclador y correr el siguiente programa de fragmentación:

37°C	35 min.
95°C	15 min.
4°C	ad infinitum.

- f) Terminado el programa de fragmentación, retirar la placa del termociclador y centrifugarla a 2000 rpm durante 30 segundos. Mantener la placa en hielo.
- h) Iniciar inmediatamente el siguiente paso.

9.- Marcado (*labeling*)

Durante esta fase, las muestras fragmentadas serán marcadas mediante el GeneChip® DNA Labeling Reagent, que es un agente marcado con biotina para el marcaje terminal de los amplicones de

PCR fragmentados. Se preparará una mezcla de reacción de marcado, de la cual se agregará una cantidad determinada a cada muestra. Después se introducirá la placa en un termociclador y se correrá el programa de marcado. El protocolo de esa etapa fue el siguiente:

- a) Preparar la mezcla de reacción de marcado (labeling), asumiendo de que cada muestra necesita: 14 μL de TdT (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*) Buffer (5X); 2 μL de GeneChip[®] DNA Labeling Reagent (30 mM) y 3,5 μL de enzima TdT (30 U/ μL). El enzima TdT es el encargado de realizar el marcaje terminal de los amplicones de PCR fragmentados con el GeneChip[®] DNA Labeling Reagent.
- b) Agregar 19,5 μL de la mezcla de reacción de marcado a cada muestra.
- c) Sellar la placa con film adhesivo, vortearla durante 3 segundos y después centrifugarla a 2000 rpm durante 30 segundos. Mantener la placa en hielo.
- d) Cargar la placa en un termociclador y correr el siguiente programa de marcado:

37°C	4 horas
95°C	15 min.
4°C	ad infinitum.
- e) Terminado el programa de marcado, retirar la placa del termociclador y centrifugarla a 2000 rpm durante 30 segundos.
- f) Si se continúa con el procesado, la placa debe ser mantenida en hielo. Si el procesado se pospone, la placa deberá ser sellada con film adhesivo y mantenida a -20°C.

10.- Hibridación de la secuencia objetivo

Durante este paso, cada muestra será cargada en el GeneChip[®] Human Mapping 250K NspI Array. En primer lugar se preparará una mezcla de reacción de hibridación, de la cual una cantidad determinada será agregada a cada muestra. A continuación, las muestras precisan un proceso de desnaturalización en un termociclador para poder ser cargadas en el Genechip[®] Human Mapping 250K Array. Los arrays serán posteriormente introducidos en un horno GeneChip[®] Hybridization Oven 640 a 49°C durante 16-18 horas para que tenga lugar la hibridación.

El protocolo seguido para la consecución de este paso fue:

- a) Vortear la placa durante 3 segundos y después centrifugarla a 2000 rpm durante 30 segundos. Mantener la placa en hielo.
- b) Abrir el recipiente que contiene a los arrays, rotularlos para diferenciarlos y dejarlos a temperatura ambiente durante 10-15 minutos.
- c) Preparar la mezcla de reacción de hibridación, sabiendo que cada pocillo necesitará: 12 μL de MES (12X; 1,25 M); 13 μL de Solución de Denhardt (50X); 3 μL de EDTA (0,5 M); 3 μL de HSDNA (Herring Sperm DNA, 10 mg/mL); 2 μL de OCR, 0100 (Oligo Control Reagent); 3 μL de Human Cot-1 DNA[®] (1 mg/mL); 1 μL de Tween-20 (3%); 13 μL de DMSO (100%) y 140 μL de TMACL (*Tetramethyl Ammonium Chloride*, 5 M). El OCR es

una mezcla de 5 oligonucleótidos marcados con biotina, los cuales hibridan con regiones control de los GeneChip® Mapping 250K Arrays.

- d) Añadir 190 µL de la mezcla de reacción de hibridación a cada muestra.
- e) Sellar la placa con film adhesivo, vortearla durante 3 segundos y después centrifugarla a 2000 rpm durante 30 segundos.
- f) Cargar la placa en un termociclador y correr el siguiente programa de hibridación:

95°C	10 min.
49°C	ad infinitum.

- g) Cuando el programa haya finalizado, se mantendrá la placa a 49°C y se transferirán ordenadamente 200 µL de cada muestra al array. La placa que contiene el sobrante de las muestras se sellará con film adhesivo y se mantendrá a -20°C.
- h) Cubrir el septo de cada array con una pegatina redonda Tough-Spot®, introducirlos inmediatamente en el GeneChip® Hybridization Oven 640 -previamente programado a 49°C de temperatura y rotación de 60 rpm- y mantenerlos en esas condiciones de hibridación durante 16-18 horas.

11.- Lavado, tinción y escaneado de los arrays

Tanto el proceso de lavado como el de tinción de los arrays se realizaron automáticamente mediante la GeneChip® Fluidics Station 450. El protocolo de tinción de Affymetrix para este tipo de arrays consiste en una primera tinción con Streptavidin Phycoerythrin (SAPE), seguida de una amplificación con anticuerpos anti-streptavidin biotinilados y finalmente otra tinción con SAPE. Terminado el proceso de tinción, los arrays son rellenados con Array Holding Buffer antes de proceder a su escaneado en el GeneChip® Scanner 3000 7G.

El protocolo empleado contenía los siguientes pasos:

- a) Después de las 16-18 horas de hibridación, retirar el array e introducirlo en vial de microcentrífuga. Mantener en hielo durante el procedimiento o congelar a -80°C si se pospone su procesado.
- b) Rellenar completamente el array con 270 µL de Array Holding Buffer.
- c) Insertar el vial de microcentrífuga que contiene al array dentro del módulo designado de la GeneChip® Fluidics Station 450 para proceder con la tinción.
- d) Una vez teñido, retirar el array del módulo de la GeneChip® Fluidics Station 450 y comprobar que no contenga grandes burbujas de aire. En caso de tenerlas, rellenar el array con Array Holding Buffer con una pipeta y retirarlas.
- e) Si el array no contiene grandes burbujas de aire, debe ser escaneado antes de un período de 24 horas en el GeneChip® Scanner 3000 7G. Para ello se seguirán estas recomendaciones:
 - 1.- Limpiar la superficie de cristal del array con un tejido no abrasivo antes de ser escaneado.

- 2.- Retirar el exceso de fluido existente en la parte posterior del array, alrededor de los septos.
- 3.- Aplicar cuidadosamente una pegatina redonda a cada uno de los septos, comprobando que queden bien pegadas y no se formen burbujas debajo de ellas, para evitar la pérdida de fluidos del array durante el escaneado.
- 4.- Insertar el array en el escáner y comprobar el autofocus para asegurar que las pegatinas redondas no interfieran en el enfoque del escáner.
- 5.- Comenzar el escaneado. La imagen del array aparecerá progresivamente en la pantalla a medida que se escanea el array.
- 6.- Las imágenes generadas se almacenaron como archivos de extensión *.cel, y a partir de ellas se hizo el análisis de genotipado con el GeneChip[®] Genotyping Analysis Software (GTYPE) 4.0.

III.7.2. Análisis de ligamiento

Mediante el software easyLinkage Plus v5.08 (Hoffmann y Lindner, 2005) se combinaron los datos del pedigree, los genotipos obtenidos con los 262264 SNPs del array NspI y las distancias genéticas facilitadas por Affymetrix (DeCode), convirtiéndolos de forma automática a los formatos necesarios para el correcto funcionamiento de los programas de análisis de ligamiento de los que dispone este paquete informático. En un paso previo al análisis de ligamiento, easyLinkage realiza un escrutinio de los archivos de entrada con el fin de detectar incongruencias en el pedigree, SNPs con genotipos en blanco, SNPs con genotipos que presentan errores mendelianos y no mendelianos y SNPs en desequilibrio Hardy-Weinberg. Todos estos errores fueron eliminados antes de comenzar el análisis para evitar que su presencia interfiriese con los cálculos, magnificando o minimizando los valores de LOD. También se desecharon aquellos SNPs con ratios de genotipado correcto (*call rate*) inferiores al 95%. Los SNPs con genotipos no informativos fueron eliminados o mantenidos en base al tipo de análisis de ligamiento realizado.

Terminado el cribado de los datos se continuó con el análisis de ligamiento paramétrico efectuando, en primer lugar, un análisis *Two-Point* de todo el genoma con SuperLink v1.6. Para este análisis se desecharon todos los SNPs que presentaban un genotipo no informativo, se asumió que el patrón de herencia de RP en esta familia era recesivo con penetrancia completa, se utilizaron las frecuencias alélicas de población caucásica facilitadas por Affymetrix y se tomó 0,001 como frecuencia del alelo mutado. A partir de los datos obtenidos, se seleccionaron las regiones cromosómicas que presentaban valores de LOD superiores a 0,9 en autosomas y 0,7 en el cromosoma X. Posteriormente, y sin eliminar los SNPs no informativos, se realizó el análisis de ligamiento *Multipoint* en estas regiones de interés con GeneHunter 2.1r5. No se realizó ningún test de

desequilibrio de ligamiento para comprobar la posible formación de bloques haplotípicos –los cuales no garantizarían la completa independencia del SNP en el análisis de ligamiento– puesto que los SNPs utilizados en el array NspI ya habían sido previamente validados por Affymetrix en distintas poblaciones. Valores de LOD superiores a -2 fueron tomados como significativos para exclusión de ligamiento.

IV. RESULTADOS

IV.1. Capítulo I

Búsqueda del gen responsable de RP en la familia 68

IV.1.1. Análisis de marcadores microsatélites

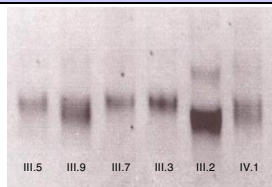
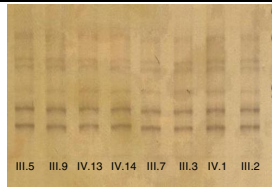
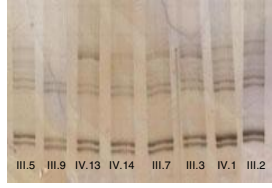
El número total de marcadores microsatélites seleccionados para el cribado del cromosoma X en toda su extensión fue de 92. Sin embargo, tras descartar aquellos cuya amplificación no fue efectiva, bien por la aparición de productos inespecíficos con PCRs altamente estrictas, bien por no alcanzar los parámetros de PCR más adecuados a pesar de las múltiples variaciones realizadas en ellos, el número final de STRs válidos para el análisis descendió a 72 (26 en el brazo corto y 46 en el brazo largo). Junto con estos 72 STRs, también se analizaron otros 10 pertenecientes a un décaplex del IPATIMUP. Se logró así alcanzar la cifra final de 82 STRs analizados a lo largo de las casi 155 Mb del cromosoma X (una media de 1 STR / 1,89 Mb).

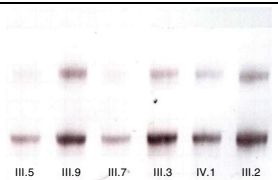
IV.1.1.1. Primera fase: Exclusión de loci y genes conocidos

El primer paso del análisis con STRs en la familia 68 consistió en descartar los genes y loci responsables de causar XIRP. Se analizaron los siguientes genes/loci:

IV.1.1.1.1. Gen RP2 (Locus RP2)

En todos los STRs previamente seleccionados para descartar el gen *RP2* se logró una amplificación efectiva. Ninguno de ellos mostró cosegregación con la RP. El STR DXS6849 resultó ser un marcador no informativo, al ser monomórfico en todos los individuos estudiados de esta familia.

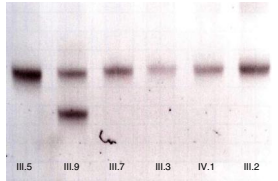
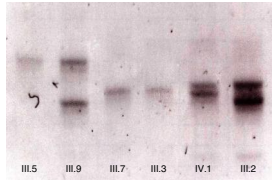
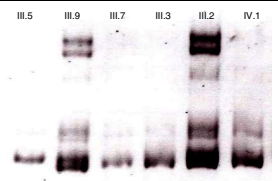
Tabla 4.- STRs analizados en el gen RP2.											
MARCADOR	GEL	III.5	III.9	IV.13	IV.14	III.7	III.3	III.1	IV.1	III.2	
DXS1055		3	2 3	ND	ND	3	3	3	3	2	2 1
DXS1003		2	2 2	2	2	1	1	1	1	2	2 2
GATA160B08		1	2 1	1	1	1	2	2	2	2	2 2

DXS6849		1	1	1	ND	ND	1	1	1	1	1	1
	III.5 III.9 III.7 III.3 IV.1 III.2											
El genotipo de los STRs del individuo III.1 fue inferido a partir del cromosoma X aportado a su hija (IV.1). Las siglas ND (No Disponible) indican aquellos STR que no fueron analizados en determinados individuos al no disponer de muestra de DNA suficiente.												

IV.1.1.1.2. Gen RPGR (Locus RP3)

A excepción de DXS8090, en el cual no se logró una amplificación efectiva al no conseguir las condiciones de PCR adecuadas (se indica como NF, No Funcional), todos los demás STR fueron correctamente amplificados. No se evidenció cosegregación de ninguno de estos STRs del gen *RPGR* con la RP.

Tabla 5.- STRs analizados en el gen RPGR.

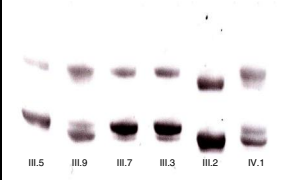
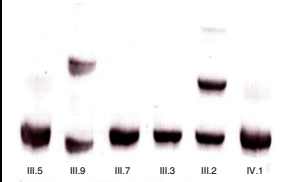
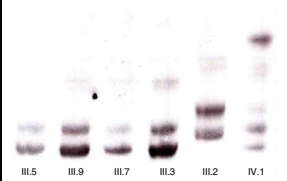

MARCADOR	GEL	III.5	III.9	IV.13	IV.14	III.7	III.3	III.1	IV.1	III.2
DXS8090	NF	NF	N F	N F	NF	NF	NF	NF	N F	N F
DXS1110		2	1	2	ND	ND	2	2	2	2
DXS6679		5	1	5	ND	ND	3	3	3	4
DXS1069		3	1	3	ND	ND	2	2	2	4
ND, No Disponible; NF, No Funcional										

IV.1.1.1.3. Locus RP6

Cuatro de los cinco STRs seleccionados para descartar el locus RP6 como responsable de RP en esta familia lograron una correcta amplificación. El marcador DXS1049 no se amplificó convenientemente debido a las amplificaciones inespecíficas de los primers diseñados para este marcador, aún en condiciones de PCR extremadamente estrictas. Al igual que *RP2* y *RPGR*, en

este locus tampoco se observó cosegregación de ninguno de los STRs con la RP. El marcador DXS 1214 presenta un único alelo en los hermanos de la generación III.

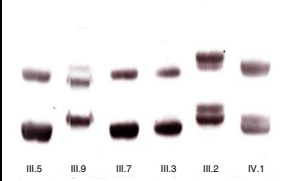
Tabla 6.- STRs analizados en el locus RP6.

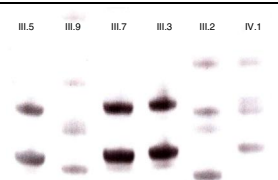
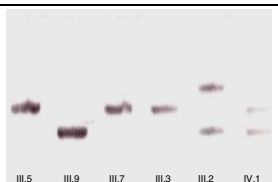
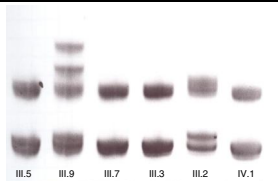
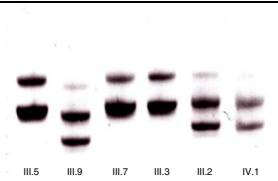
MARCADOR	GEL	III.5	III.9	IV.13	IV.14	III.7	III.3	III.1	IV.1	III.2			
DXS7106		2	2	1	ND	ND	2	2	2	2	1	1	1
DXS9896		2	4	1	ND	ND	2	2	2	2	2	2	3
DXS1214		1	1	1	ND	ND	1	1	1	1	2	2	3
DXS9907		1	2	1	ND	ND	2	2	2	2	1	1	1
DXS1049	NF	NF	N F	N F	NF	NF	NF	NF	NF	N F	N F	N F	N F

IV.1.1.1.4. Locus RP23

Solamente uno (DXS9902) de los seis STRs seleccionados para descartar el locus RP23 no logró una amplificación efectiva al no conseguir las condiciones de PCR idóneas. Ninguno de estos STRs reveló cosegregación de este locus con la RP. El marcador DXS1195 resultó ser monomórfico en prácticamente todos los individuos estudiados, a excepción de III.2 que era heterocigota.

Tabla 7.- STRs analizados en el locus RP23.

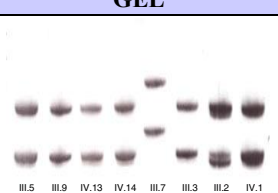
MARCADOR	GEL	III.5	III.9	IV.13	IV.14	III.7	III.3	III.1	IV.1	III.2			
DXS1223		1	4	2	ND	ND	1	1	1	1	2	2	3

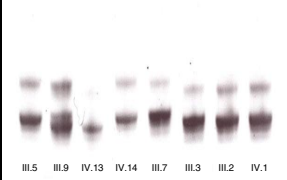
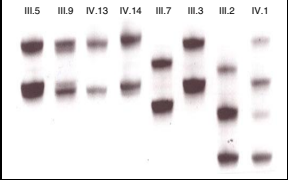
DXS7103		3	4	2	ND	ND	3	3	3	3	5	5	1
DXS1224		2	1	1	ND	ND	2	2	2	2	1	1	3
DXS9902	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
DXS1195		1	1	1	ND	ND	1	1	1	1	1	1	2
DXS7163		4	3	1	ND	ND	4	4	4	4	2	2	4

IV.1.1.1.5. Locus RP24

La extensión de los amplicones pertenecientes a los marcadores DXS1192 y DXS9908 no se realizó de forma eficiente a consecuencia de la gran complejidad observada en los ensayos de las PCRs para conseguir las condiciones ideales de amplificación. La observación de los genotipos de los tres marcadores válidos para el análisis, permite destacar claramente que el individuo III.7 (no afecto) presenta un cromosoma X diferente al de sus hermanos afectados (III.5 y III.3), y de sus hermanos no afectados (III.9 y III.1).

Tabla 8.- STRs analizados en el locus RP24.

MARCADOR	GEL	III.5	III.9	IV.13	IV.14	III.7	III.3	III.1	IV.1	III.2
DXS8094		2	2	2	2	3	2	2	2	2
DXS1192	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF

DXS1205		2	1	2	1	2	3	2	2	2	2	2	2
DXS9908	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
DXS8043		5	4	5	4	5	3	5	5	5	1	1	2

IV.1.1.1.6. Locus RP34

Todos los STRs previamente seleccionados para descartar este locus presentan una correcta amplificación. Ninguno de ellos mostró cosegregación con la RP.

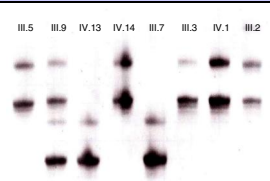
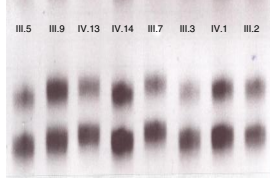
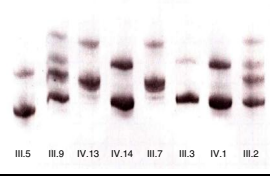
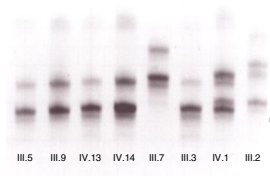
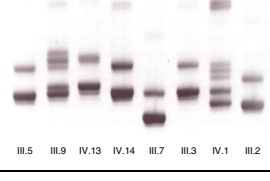
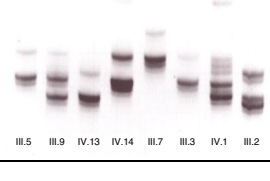
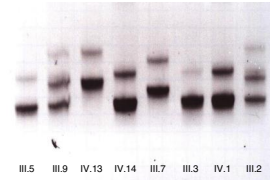
Tabla 9.- STRs analizados en el locus RP34.

MARCADOR	III.5	III.9	IV.13	IV.14	III.7	III.3	III.1	IV.1	III.2
DXS8061	3 (209)	1 (203) 2 (207)	1 (203)	1 (203)	3 (209)	3 (209)	2 (207)	2 (207) 1 (203)	1 (203) 2 (207)
DXS1073	4 (213)	1 (199) 1 (199)	1 (199)	1 (199)	4 (213)	4 (213)	1 (199)	1 (199) 3 (211)	3 (211) 2 (207)
DXS1108	1 (115)	2 (132) 2 (132)	2 (132)	2 (132)	1 (115)	1 (115)	2 (132)	2 (132) 1 (115)	1 (115) 2 (132)

Los números entre paréntesis indican los tamaños de los diferentes alelos obtenidos mediante electroforesis capilar. Los números situados encima de los paréntesis hacen referencia a los valores asignados a cada alelo tras la recodificación de los diferentes tamaños en valores numéricos crecientes.

IV.1.1.2. Segunda fase: Acotamiento fino del locus RP24

Siete de los nueve STRs seleccionados para realizar un acotamiento fino de este locus consiguieron amplificarse con éxito. Los marcadores DXS1232 y DXS8084, por el contrario, no pudieron amplificarse eficientemente debido a la dificultad para conseguir unas condiciones de PCR idóneas. Después de observar los genotipos de todos los STRs analizados se pudo comprobar que, al igual que sucedía en el primer análisis con STRs en este locus, el individuo III.7 hereda de su madre un cromosoma X diferente al heredado por el resto de sus hermanos.

Tabla 10.- STRs analizados en el acotamiento fino del locus RP24.																				
MARCADOR	GEL								III.5	III.9	IV.13	IV.14	III.7	III.3	III.1	IV.1	III.2			
DXS1041									2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	
DXS1062									1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	
DXS1211									1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	2	
DXS1232	NF								NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF		
DXS984									1	1	1	1	3	1	1	1	2	2	4	
DXS1227									3	4	3	4	3	1	3	3	3	2	2	
DXS8106									3	2	3	2	3	4	3	3	3	2	2	1
DXS8084	NF								NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF		
DXS8073									1	3	1	3	1	2	1	1	1	1	3	

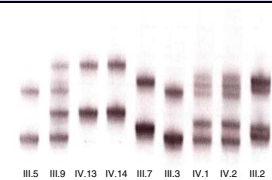
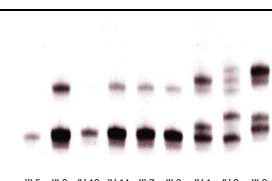
IV.1.1.3. Tercera fase: Análisis de las regiones susceptibles de albergar un locus responsable de RP en el brazo largo del cromosoma X

Las regiones cromosómicas del brazo largo situadas en ambos extremos de los loci o genes descartados como causantes de RP fueron también analizadas con STRs. Los resultados obtenidos en las cuatro etapas del análisis se detallan a continuación:

IV.1.1.3.1. Etapa I: análisis de la región subtelomérica del brazo largo

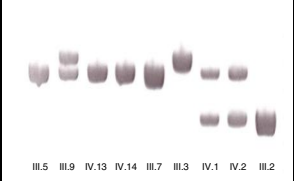
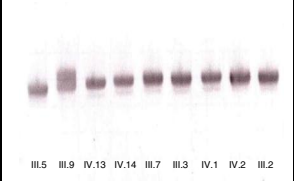
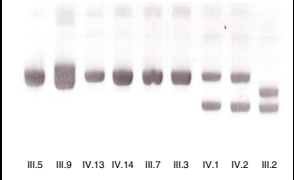
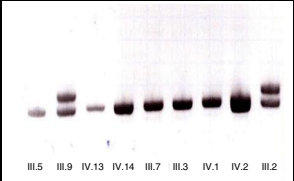
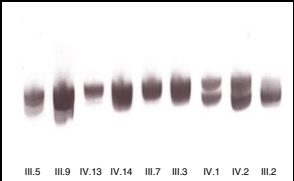
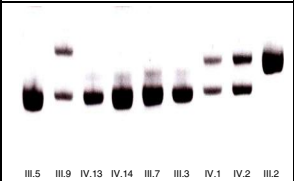
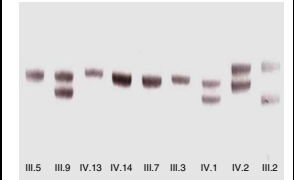
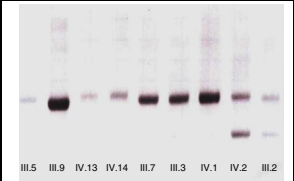
La amplificación de los marcadores DXS8091 y DXS1073 no fue efectiva al no poder alcanzar las condiciones de PCR idóneas. Sin embargo, los primers de DXS1073 fueron diseñados de nuevo, consiguiendo un resultado satisfactorio para este STR en el análisis del locus RP34. No se encontró cosegregación de ninguno de los STRs analizados con la RP.

Tabla 11.- STRs analizados en la región subtelomérica del brazo largo del cromosoma X.

MARCADOR	GEL	III.5	III.9	IV.13	IV.14	III.7	III.3	III.1	IV.1	IV.2	III.2				
DXS8045		1	5	1	5	5	3	1	1	1	4	1	4	4	2
DXS8091	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
DXS8069		1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	3	2	3	
DXS1073	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF

IV.1.1.3.2. Etapa II: análisis de la región comprendida entre el centrómero y el locus RP24

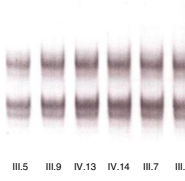
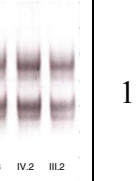
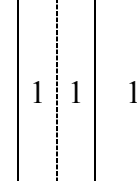
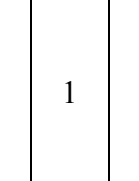

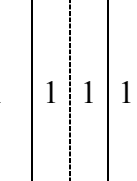
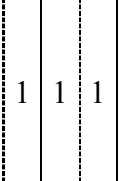
De los diez STRs seleccionados para el análisis de esta región cromosómica, solamente dos no lograron una eficiente amplificación. En el caso de DXS8380, debido a la gran dificultad para conseguir las condiciones de PCR ideales y en el de DXS6797, a causa de la amplificación de productos inespecíficos en condiciones de PCR altamente estrictas. Los resultados indican que de los 8 STRs válidos para el análisis, siete son no informativos. Por su parte, DXS6800, el único marcador informativo, no muestra cosegregación con la RP.

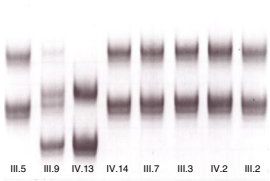
Tabla 12.- STRs analizados en la región comprendida entre el centrómero y el locus RP24.															
MARCADOR	GEL	III.5	III.9	IV.13	IV.14	III.7	III.3	III.1	IV.1	IV.2	III.2				
DXS8380	NF	NF	N F	N F	NF	NF	NF	NF	NF	N F	N F	N F			
DXS6800		3	4	3	3	3	3	4	3	3	2	3	2	2	1
DXS6793		1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DXS6803		3	4	3	3	3	3	3	3	3	1	3	1	1	2
DXS6801		1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
DXS6789		2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
DXS7126		1	3	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2
DXS6797	NF	NF	N F	N F	NF	NF	NF	NF	NF	N F	N F	N F			
GATA165B12		2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	1	3
DXS9909		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1

IV.1.1.3.3. Etapa III: análisis de la región centrómero-RP24 ampliada en ambos extremos

El marcador DXS1001 no logró una amplificación eficiente debido a la amplificación de productos de PCR inespecíficos a pesar de realizar la PCR en condiciones altamente estrictas. El resto de los STRs se amplificaron correctamente y en los respectivos geles se pudo observar que no eran informativos, a excepción del DXS986, que pese a ser informativo no mostró cosegregación con la RP.

Tabla 13.- STRs analizados en la región centrómero-RP24 ampliada en ambos extremos.

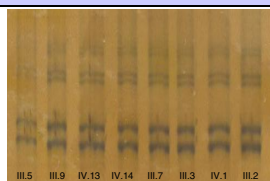
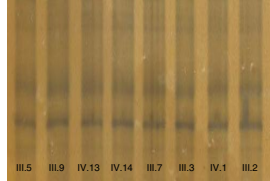

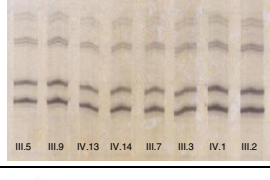
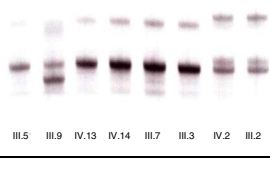
MARCADOR	GEL	III.5	III.9	IV.13	IV.14	III.7	III.3	III.1	IV.1	IV.2	III.2
DXS8029		1	1 1	1	1	1	1	1	1 1	1 1	1 1
DXS986		3	2 3	3	3	3	2	3	N D	N D	3 3 3 1
DXS1217		2	1 2	2	2	2	2	2	N D	N D	2 1 1 3
DXS8077		1	3 1	1	1	1	1	1	N D	N D	1 2 2 4
DXS1106		1	1 1	1	1	1	1	1	N D	N D	1 1 1 2
DXS8088		2	1 2	2	2	2	2	2	2 1	2 2	1 2
DXS8064		1	2 1	1	1	1	1	1	1 1	1 1	1 1

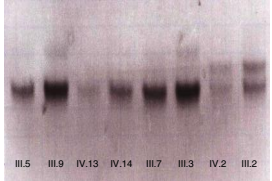
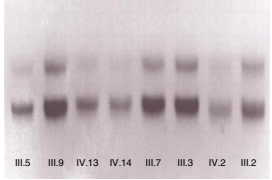
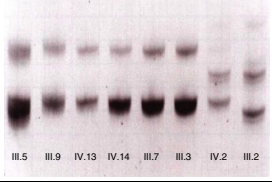
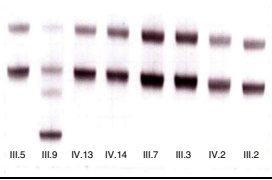
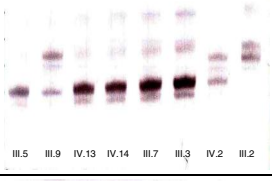
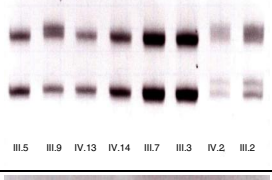
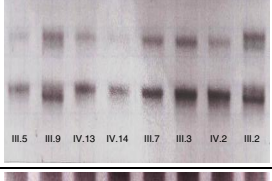
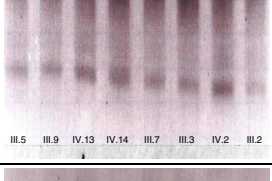
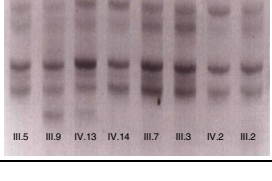
DXS1001	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
DXS8009		2	1	2	1	2	2	2	2	2	ND	ND	2	2	2	2

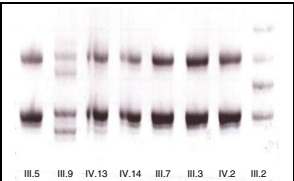
IV.1.1.3.4. Etapa IV: análisis de la región centrómero-RP24 reemplazada en su extremo 3'

El marcador DXS1196 no logró una amplificación eficiente a consecuencia de la imposibilidad para conseguir las condiciones ideales de PCR. Los 15 STRs restantes resultaron ser no informativos.

Tabla 14.- STRs analizados en la región centrómero-RP24 reemplazada en su extremo 3'.

MARCADOR	GEL	III.5	III.9	IV.13	IV.14	III.7	III.3	III.1	IV.1	IV.2	III.2				
DXS1213		1	1	1	1	1	1	1	1	ND	ND	1	1		
DXS1275		1	1	1	1	1	1	1	1	ND	ND	1	1		
DXS8101		1	1	1	1	1	1	1	1	ND	ND	1	1		
DXS1221		1	1	1	1	1	1	1	1	ND	ND	1			
DXS1002		2	1	2	2	2	2	2	ND	ND	2	3	3	2	
DXS1196	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF

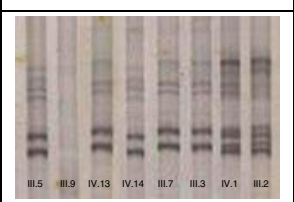
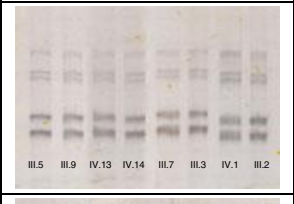
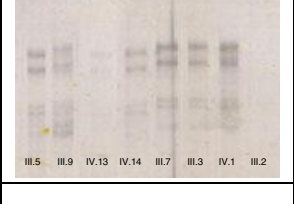
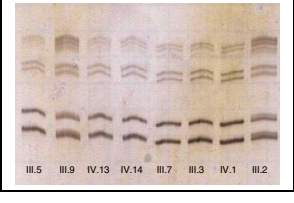
DXS1203		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	N D	N D	1	2	2	1
DXS990		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	N D	N D	1	1	1	1
DXS8063		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	N D	N D	2	3	3	1
DXS8096		2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	N D	N D	2	2	2	2
DXS1059		1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	N D	N D	1	2	2	3
DXS1220		1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	N D	N D	1	3	3	1
DXS8067		2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	N D	N D	2	2	2	3
DXS8059		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	N D	N D	1	1	1	1
DXS8057		3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	N D	N D	3	1	1	3

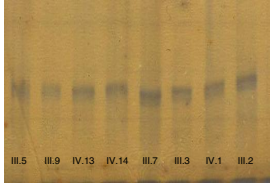
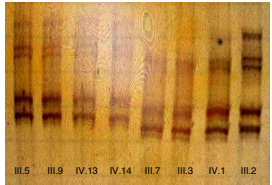
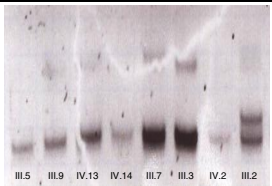
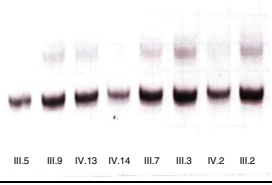
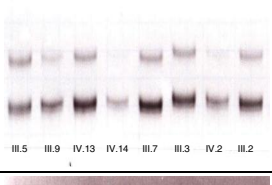
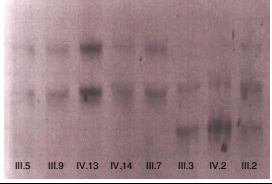
DXS1047		2	1	2	2	2	2	2	2	2	N	N	2	2	2	3
												D	D			

IV.1.1.4. Cuarta fase: análisis de las regiones susceptibles de albergar un locus responsable de RP en el brazo corto del cromosoma X

De los 17 STRs seleccionados para el análisis de esta región cromosómica, en 7 no se logró una amplificación eficiente a causa de la importante complejidad para conseguir las condiciones de PCR adecuadas. Los productos de PCR obtenidos a partir de los 10 STRs válidos para el análisis fueron corridos en geles de poliacrilamida, pudiéndose observar que 6 de ellos no eran informativos. Ninguno de los 4 marcadores informativos: DXS991, DXS7100, DXS996 y DXS1068, mostraron cosegregación con la RP.

Tabla 15.- STRs analizados en las regiones susceptibles de albergar un locus RP en el brazo corto del cromosoma X.

MARCADOR	GEL	III.5	III.9	IV.13	IV.14	III.7	III.3	III.1	IV.1	IV.2	III.2				
DXS7099	NF	NF	N F	N F	NF	NF	NF	NF	N F	N F	N F	N F	N F		
DXS7100		1	2	1	2	1	2	2	2	2	1	N D	N D	1	3
DXS1060		2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	N D	N D	1	1
DXS996		2	1	2	1	2	1	1	1	1	3	N D	N D	3	4
DXS7593	NF	NF	N F	N F	NF	NF	NF	NF	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F
DXS1226		1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	N D	N D	1	2

DXS989		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	N D	N D	1	1
DXS1061	NF	NF	N F	N F	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	N F	N F	N F	N F
DXS1068		3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	N D	N D	1	2
DXS8042	NF	NF	N F	N F	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	N F	N F	N F	N F
DXS993	NF	NF	N F	N F	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	N F	N F	N F	N F
DXS8080	NF	NF	N F	N F	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	N F	N F	N F	N F
DXS8083	NF	NF	N F	N F	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	N F	N F	N F	N F
DXS1039		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	N D	N D	1	1
DXS8023		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	N D	N D	1	1
DXS988		1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	N D	N D	2	2
DXS991		2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	N D	N D	1	1

IV.1.1.5. Quinta fase: análisis con el décaplex del IPATIMUP

El décaplex empleado por el IPATIMUP analiza 10 STRs distribuidos a lo largo del cromosoma X. Tras el análisis de estos 10 marcadores en los individuos de la familia 68 se comprobó que solamente cuatro de ellos resultaron ser informativos: DXS7132, DXS8377, DXS7423 y DXS10011. Ninguno de estos marcadores informativos evidenció cosegregación con la RP. El individuo III.7 presenta un alelo distinto que el resto de sus hermanos en los marcadores DXS8377 y DXS7423.

Tabla 16.- STRs analizados con el décaplex del IPATIMUP.

MARCADOR	III.5	III.9	IV.13	IV.14	III.7	III.3	III.1	IV.1	IV.2	III.2
DXS8378	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1
DXS7132	2	3	2	2	2	3	3	3	3	3
DXS9898	2	1	2	2	2	2	1	2	1	2
DXS6809	1	2	1	1	1	1	3	1	3	1
DXS101	1	4	1	1	1	1	2	1	2	1
GATA172D05	3	2	3	3	3	3	2	3	2	3
HPRTB	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1
DXS8377	3	2	3	2	2	4	3	4	3	1
DXS7423	2	2	2	2	2	1	2	3	2	2
DXS10011	3	1	4	1	1	3	4	2	4	2

IV.1.2. Análisis de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs)

El número total de SNPs seleccionados para el análisis de regiones específicas del cromosoma X alcanzó la cifra de 56. No obstante, después de eliminar aquellos cuyo genotipado no fue efectivo, además de aquellos de cuyo análisis se decidió prescindir puesto que no aportaría información relevante, el número final de SNPs válidos para el análisis se situó en 33 (27 en el brazo corto y 6 en el brazo largo).

IV.1.2.1. Región I, acotada por DXS996 y DXS1223

De los nueve SNPs analizados en esta región cromosómica, solamente no pudo ser genotipado el rs4830772. El genotipo del resto de SNPs reveló que rs1882409 era informativo, pero no mostraba cosegregación con RP. La observación del haplotipo reconstruido a partir de estos 8 SNPs evidenció una recombinación posterior al SNP rs1882409 en el individuo III.5.

MARCADOR	III.5	III.9	IV.13	IV.14	III.7	III.3	III.1	IV.1	III.2		
rs5916301	T	C	T	C	T	T	T	T	C	C	C
rs1882409	G	G	G	G	G	A	A	A	A	G	G
rs5916393	G	G	A	G	A	G	G	G	G	G	G
rs5989526	G	G	C	G	C	G	G	G	G	G	C
rs6529997	T	C	C	C	C	T	T	T	T	C	C
rs4830772	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
rs1179098	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
rs1454623	C	C	T	C	T	C	C	C	C	T	T
rs1012417	T	T	C	T	C	T	T	T	T	C	C

NF, No Funcional

IV.1.2.2. Región II, acotada por DXS1224 y DXS 7163

Ninguno de los seis SNPs analizados dentro de esta región cromosómica resultó ser informativo.

MARCADOR	III.5	III.9	IV.13	IV.14	III.7	III.3	III.1	IV.1	III.2
rs4830881	C	T	T	T	C	C	C	C	T
rs4565623	G	A	A	G	G	G	G	G	G
rs2071182	G	A	A	A	G	G	G	G	G
rs1727974	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rs9306755	T	G	T	G	T	T	T	T	G
rs6633170	A	A	A	A	A	A	A	A	A

IV.1.2.3. Región III, acotada por DXS1226 y DXS 9896

De los siete SNPs analizados en esta porción del cromosoma, ninguno se reveló como informativo.

MARCADOR	III.5	III.9	IV.13	IV.14	III.7	III.3	III.1	IV.1	III.2
rs6629539	C	C	C	C	C	C	C	C	C
rs2520324	G	G	G	G	G	G	G	G	A
rs1018879	A	T	T	T	T	A	A	A	A
rs4358969	G	G	A	G	G	G	G	G	G
rs4898288	A	A	G	A	A	A	A	A	G
rs4428795	A	A	A	A	A	A	A	A	A
rs196982	A	A	A	A	A	A	A	A	A

IV.1.2.4. Región IV, acotada por DXS9907 y DXS 6679

Se decidió prescindir del análisis de los SNPs: rs3788899, rs5971730, rs4636356, rs996563, rs6629087 y rs5964310; puesto que la información que se obtendría a partir de su genotipado no aportaría ningún dato relevante.

IV.1.2.5. Región V, acotada por DXS1068 y DXS988

Los SNPs rs766117 y rs4074014 no pudieron ser genotipados a causa de la ineficaz amplificación de los mismos. Por su parte, en los marcadores rs5917339 y rs2382900, ambos informativos, no se constató cosegregación con la RP.

Tabla 20.- SNPs analizados en la Región V.

MARCADOR	III.5	III.9	IV.13	IV.14	III.7	III.3	III.1	IV.1	III.2
rs5917339	T	G	T	T	T	G	G	G	G
rs1023064	C	C	C	C	C	C	C	C	T
rs766117	A	G	A	A	A	A	A	A	A
rs4074014	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
rs533190	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
rs4824748	C	T	C	C	C	C	C	C	C
rs2382900	A	A	A	A	A	A	G	G	A
rs4893622	C	G	C	C	C	C	C	C	C

IV.1.2.6. Región VI, acotada por DXS7132 y DXS 6800

Se decidió prescindir del análisis de los SNPs: rs6525038, rs2206203, rs4562482, rs1171984, rs6525567, rs174211, rs242461 y rs4263894; puesto que la información que se obtendría a partir de su genotipado no aportaría ningún dato relevante.

IV.1.2.7. Región VII, acotada por DXS986 y DXS 1002

A excepción del marcador rs242847, cuyo genotipo no pudo ser obtenido por su ineficaz amplificación, el resto de los SNPs analizados en esta región del cromosoma resultaron ser monomórficos, y por lo tanto no informativos, en todos los hermanos de la generación III.

Tabla 21.- SNPs analizados en la Región VII.

MARCADOR	III.5	III.9	IV.13	IV.14	III.7	III.3	III.1	IV.1	III.2
rs3923574	C	C	C	C	C	C	C	C	C
rs2806641	C	C	C	C	C	C	C	C	C
rs5921935	C	C	C	C	C	C	C	C	C

rs212922	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
rs724982	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
rs929129	G	G	G	G	G	G	G	G	G	C	C	G
rs242847	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF

IV.1.2.8. Región VIII, acotada por DXS8045 y DXS 7423

Se decidió prescindir del análisis de los SNPs: rs5965765, rs5951961, rs1419963, rs6649483 y rs658680; puesto que la información que se obtendría a partir de su genotipado no aportaría ningún dato relevante.

IV.1.3. Reconstrucción de los haplotipos a partir de los genotipos

La reconstrucción de los haplotipos de todos los individuos, en especial el de IV.1 y el de IV.2, permitió inferir el haplotipo del individuo III.1, fallecido a la edad de 40 años. En este individuo se aprecia una recombinación simple cuyo punto de corte se sitúa entre los marcadores DXS8029 y DXS6800, si bien su situación exacta no puede ser definida al estar rodeado de marcadores no informativos. El individuo III.5 presenta una doble recombinación entre los marcadores rs1882409 y DXS9907, además de una recombinación en el extremo final del brazo largo a partir del marcador DXS7423. También se observan eventos de doble recombinación en III.7, entre los marcadores DXS1003 y DXS1047; y III.3, entre DXS986 y DXS7423. En el individuo IV.13 se ha detectado una pequeña doble recombinación entre DXS8009 y HPRTB.

Tabla 22.- Haplotipos de la familia 68.

MARCADOR	POSICION	III.1	III.2	IV.1	IV.2	III.3	III.5	III.7	III.9	IV.13	IV.14	
DXS7100	4069915	2	1	3	2	1	ND	ND	2	1	2	1
DXS1060	5269503	2	1	1	2	1	ND	ND	2	2	2	2
DXS996	5718851	1	3	4	1	3	ND	ND	1	1	2	1
rs5916301	5873091	T	C	C	T	C	ND	ND	T	T	C	T
rs1882409	5993548	A	G	G	A	G	ND	ND	A	G	G	G
rs5916393	6202787	G	G	G	G	G	ND	ND	G	G	A	G
rs5989526	6445953	G	G	C	G	G	ND	ND	G	G	C	G
rs6529997	6683820	T	C	C	T	C	ND	ND	T	T	C	C
rs1179098	7652484	T	T	T	T	T	ND	ND	T	T	T	T
rs1454623	7982095	C	T	T	C	T	ND	ND	C	C	T	C
rs1012417	8283479	T	C	T	T	C	ND	ND	T	T	T	C
DXS1223	8303648	1	2	3	1	2	ND	ND	1	1	1	4
DXS8378	9179886	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
DXS7103	9386904	3	5	1	3	5	ND	ND	3	3	3	4
DXS1224	12995117	2	1	3	2	1	ND	ND	2	2	2	1
rs4830881	13425621	C	C	T	C	C	ND	ND	C	C	T	T
rs4565623	14283429	G	G	G	G	G	ND	ND	G	G	A	A
rs2071182	15172940	G	G	G	G	G	ND	ND	G	G	A	A
rs1727974	16317930	G	G	G	G	G	ND	ND	G	G	G	G

DXS1195	17294241	1	1	2	1	1	ND	ND	1	1	1	1	1	ND	ND	
rs9306755	17901526	T	G	G	T	G	ND	ND	T	T	T	G	T	G	G	
rs6633170	18696867	A	G	A	A	G	ND	ND	A	A	A	A	A	A	A	
DXS7163	18814202	4	2	4	4	2	ND	ND	4	4	4	3	1	ND	ND	
DXS1226	22707079	1	1	2	1	1	ND	ND	1	1	1	2	1	2	2	
rs6629539	22897690	C	C	C	C	C	ND	ND	C	C	C	C	C	C	C	
DXS989	22944062	1	1	1	1	1	ND	ND	1	1	1	1	1	1	1	
rs2520324	23951178	G	A	A	G	A	ND	ND	G	G	G	G	G	G	G	
rs1018879	24826451	A	A	A	A	A	ND	ND	A	A	A	T	T	T	T	
rs4358969	25326027	G	G	A	G	G	ND	ND	G	G	G	G	A	G	G	
rs4898288	26554533	A	G	A	A	G	ND	ND	A	A	A	A	G	A	A	
DXS7106	27553667	2	1	1	2	1	ND	ND	2	2	2	2	1	ND	ND	
rs4428795	27815231	A	A	A	A	A	ND	ND	A	A	A	A	A	A	A	
rs196982	28468715	A	A	G	A	A	ND	ND	A	A	A	A	A	A	A	
DXS9896	29096725	2	2	3	2	2	ND	ND	2	2	2	4	1	ND	ND	
DXS1214	31020405	1	2	3	1	2	ND	ND	1	1	1	1	1	ND	ND	
DXS9907	31860042	2	1	1	2	1	ND	ND	2	1	2	2	1	ND	ND	
DXS1110	37456103	2	2	2	2	2	ND	ND	2	2	2	1	2	ND	ND	
DXS6679	37959597	3	4	2	3	4	ND	ND	3	5	3	1	5	ND	ND	
DXS1069	38381334	2	2	4	2	2	ND	ND	2	3	2	1	3	ND	ND	
DXS1068	38664206	1	1	2	1	1	ND	ND	1	3	1	3	3	3	3	
rs5917339	39591928	G	G	G	G	G	ND	ND	G	T	G	G	T	T	T	
rs1023064	41302497	C	T	T	C	T	ND	ND	C	C	C	C	C	C	C	
rs766117	43572460	A	A	A	A	A	ND	ND	A	A	A	G	A	A	A	
DXS1055	46182618	3	2	1	3	2	ND	ND	3	3	3	2	3	ND	ND	
GATA1003	46290611	1	2	2	1	2	ND	ND	1	2	1	2	2	2	2	
GATA160B08	46736353	2	2	2	2	2	ND	ND	2	1	1	2	1	1	1	
DXS6849	47595375	1	1	1	1	1	ND	ND	1	1	1	1	1	ND	ND	
rs4824748	48905951	C	C	C	C	C	ND	ND	C	C	C	T	C	C	C	
DXS1039	49161528	1	1	2	ND	ND	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
DXS8023	50186302	1	1	1	ND	ND	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
rs2382900	50663274	G	A	A	G	A	ND	ND	G	A	A	A	A	A	A	
rs4893622	51827582	C	C	C	C	C	ND	ND	C	C	C	G	C	C	C	
DXS988	53236193	2	2	2	ND	ND	2	2	2	1	1	1	1	1	1	
DXS991	55402060	1	2	1	ND	ND	1	2	1	2	2	2	2	2	2	
C E N T R O M E R O																
DXS7132	64438289	3	3	1	3	3	3	3	3	2	2	3	2	2	2	
DXS8029	64725009	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
DXS1213	65045682	1	1	1	1	1	ND	ND	1	1	1	1	1	1	1	
DXS1275	68297402	1	1	1	1	1	ND	ND	1	1	1	1	1	1	1	
DXS8101	70546303	1	1	1	1	1	ND	ND	1	1	1	1	1	1	1	
DXS1221	74049841	1	1	1	1	1	ND	ND	1	1	1	1	1	1	1	
DXS6800	78486469	3	2	1	3	2	3	2	4	3	3	4	3	3	3	
DXS986	79187175	3	3	1	ND	ND	3	3	2	3	3	3	2	3	3	
rs3923574	79806447	C	C	C	C	C	ND	ND	C	C	C	C	C	C	C	
rs2806641	80483736	C	C	C	C	C	ND	ND	C	C	C	C	C	C	C	
DXS6793	80558376	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	
rs5921935	81958155	C	C	C	C	C	ND	ND	C	C	C	C	C	C	C	
rs212922	82502775	C	C	C	C	C	ND	ND	C	C	C	C	C	C	C	
rs724982	83369489	C	C	C	C	C	ND	ND	C	C	C	C	C	C	C	
rs929129	84181944	G	C	G	G	C	ND	ND	G	G	G	G	G	G	G	
DXS1002	85333203	2	3	2	ND	ND	2	3	2	2	2	1	2	2	2	
DXS6803	86237310	3	1	2	3	1	3	1	3	3	3	4	3	3	3	
DXS9898	87602564	2	1	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2	
DXS1217	88201975	2	1	3	ND	ND	2	1	2	2	2	1	2	2	2	
DXS6801	92317130	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	
DXS1203	92574142	1	2	1	ND	ND	1	2	1	1	1	1	1	1	1	
DXS990	92806742	1	1	1	ND	ND	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
DXS6809	94744234	1	3	2	1	3	1	3	1	1	1	2	1	1	1	
DXS8077	95081297	1	2	4	ND	ND	1	2	1	1	1	3	1	1	1	
DXS6789	95255385	2	1	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	
DXS8063	101004404	2	1	3	ND	ND	2	3	2	2	2	2	2	2	2	
DXS101	101219161	1	2	3	1	2	1	3	1	1	1	4	1	1	1	
DXS1106	102538462	1	2	1	ND	ND	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
DXS8096	102588188	2	2	2	ND	ND	2	2	2	2	2	1	2	2	2	
DXS7126	106060729	1	2	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	1	1	
DXS1059	111132114	1	3	2	ND	ND	1	2	1	1	1	3	1	1	1	
GATA172D05	112980738	3	2	1	3	2	3	1	3	3	3	2	3	3	3	
DXS8088	113167159	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	
DXS1220	114431041	1	1	3	ND	ND	1	3	1	1	1	2	1	1	1	
DXS8064	117054777	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	
DXS8067	119142275	2	3	2	ND	ND	2	2	2	2	2	1	2	2	2	
GATA165B12	120603503	2	1	3	2	1	2	3	2	2	2	1	2	2	2	
DXS8059	121988913	1	1	1	ND	ND	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
DXS9909	122255560	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	
DXS8057	123302282	3	3	1	ND	ND	3	1	3	3	3	2	3	3	3	
DXS8009	125899547	2	2	2	ND	ND	2	2	2	2	2	1	2	1	2	
HPRTB	127488378	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	
DXS1047	128800832	2	2	3	ND	ND	2	2	2	2	2	1	2	2	2	
DXS8094	135962275	2	2	1	2	2	ND	ND	2	2	3	2	2	2	2	

DXS1041	136261398	2	2	2	2	2	ND	ND	2	2	1	1	2	1	2
DXS1062	137028474	1	1	1	1	1	ND	ND	1	1	2	2	1	2	1
DXS1211	138030750	1	1	2	1	1	ND	ND	1	1	2	2	1	2	1
DXS984	139357248	1	2	4	1	2	ND	ND	1	1	3	1	1	1	1
DXS1205	139987786	2	2	2	2	2	ND	ND	2	2	3	1	2	1	2
DXS1227	140527901	3	2	2	3	2	ND	ND	3	3	1	4	3	4	3
DXS8106	141909555	3	2	1	3	2	ND	ND	3	3	4	2	3	2	3
DXS8073	143467341	1	1	3	1	1	ND	ND	1	1	2	3	1	3	1
DXS8043	143734059	5	1	2	5	1	ND	ND	5	5	3	4	5	4	5
DXS8045	145217586	1	4	2	1	4	1	4	1	1	3	5	1	5	5
DXS8377	149237039	3	4	1	3	4	3	1	3	3	4	2	3	2	2
DXS8069	149307626	1	2	3	1	2	1	3	1	1	1	1	1	1	1
DXS7423	149391471	2	3	2	2	3	2	2	2	2	1	2	2	2	2
DXS10011	150858588	4	2	3	4	2	4	2	3	3	3	1	4	1	1
DXS8061	151692076	2	1	2	2	1	ND	ND	3	3	3	1	2	1	1
DXS1073	153392552	1	3	2	1	3	ND	ND	4	4	4	1	1	1	1
DXS1108	154425553	2	1	2	2	1	ND	ND	1	1	1	2	2	2	2

Para facilitar la interpretación de los resultados, se aplicó un código de colores en los cromosomas de los individuos de la generación III dependiendo del cromosoma X que heredaron de su madre (II.2) o de su padre (II.1). Uno de los cromosomas maternos se representó en rojo y el otro en violeta, mientras que el paterno se coloreó en verde. Los cromosomas de III.2 se representaron en color azul y amarillo para diferenciarlos de los cromosomas de II.2. En gris oscuro, los SNPs analizados; en gris claro, los STRs analizados por el IPATIMUP; ND, Muestra No Disponible.

IV.1.4. Análisis de genes responsables de arRP: array de plataforma MassARRAY

Los haplotipos de los individuos de la familia 68 fueron reconstruidos a partir de los genotipos obtenidos del análisis de los 88 SNPs de este array. Siguiendo los criterios de exclusión citados en el punto III.4.3 –y al no ser esta una familia consanguínea– se descartaron aquellos genes que no cosegregaban y tenían haplotipos que ofrecían suficiente informatividad. Solamente 4 de los 22 genes analizados no cumplían estas premisas: *USH2A*, *CNGB1*, *CNGA1* y *TULP1*. Una de las copias del gen *CNGB1* del individuo III.3 es recombinante en el último de los 4 SNPs escogidos para el análisis. No se han podido obtener datos para los SNPs: hCV8211028, hCV11231355 y hCV2407262.

Tabla 23.- Genotipos obtenidos con el chip de arRP en plataforma Sequenom.

GEN	SNP	III.2	IV.1	III.3	III.5	III.7	III.9	IV.13	IV.14	III.2	III.3	III.5	III.7	III.9	IV.13	IV.14		
RPE65	hCV3207821	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	T	
	hCV3207836	C	C	A	C	A	A	C	C	C	A	C	A	C	A	C	A	
	hCV1914618	T	T	T	T	C	T	C	C	C	C	C	T	C	C	C	T	
ABCA4	hCV1914666	G	A	G	G	A	G	A	C	A	A	A	A	G	A	A	A	G
	hCV1210478	T	T	G	T	G	G	G	T	G	G	G	T	T	T	T	T	
	hCV3082046	C	T	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	C	
	hCV1775949	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
CRB1	hCV9846807	G	C	G	C	G	C	G	C	C	C	C	C	C	C	G	C	C
	hCV16191189	C	C	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	hCV1742484	T	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	hCV1685780	C	C	T	C	C	T	C	T	C	T	C	T	C	C	C	C	C
hCV2033046	G	G	A	G	A	A	A	A	A	G	A	A	A	A	G	A	G	

USH2A	hCV910720	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	C	T	T	C	T
	hCV11395244	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	G	A	A	G	A
	hCV11671918	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	hCV11672005	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
RGR	hCV1904740	C	A	C	C	A	A	A	C	A	C	A	A	A	C	A	A
	hCV1904813	T	T	C	T	T	T	T	C	T	C	T	T	T	C	T	C
	hCV1904891	A	A	A	A	G	G	A	A	G	A	A	G	A	G	A	G
	hCV11193587	T	T	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
RPGRIP1	hCV8211028	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	hCV2803138	T	C	C	T	C	C	C	T	C	C	C	T	C	T	C	C
	hCV11719767	A	G	G	A	G	G	G	A	G	G	G	A	G	A	G	A
RDH12	hCV7532826	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	hCV16190586	T	A	T	T	A	A	A	T	A	T	A	A	A	T	A	T
	hCV11662391	G	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	hCV2778374	T	T	T	T	C	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T
NR2E3	hCV2791234	T	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	T	T	T	T
	hCV9965414	C	C	G	C	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	G	C
	hCV9965373	T	T	T	T	T	C	T	T	T	C	T	T	T	C	T	T
	hCV301676	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C
RLBP1	hCV3140333	C	C	C	C	C	T	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C
	hCV9296636	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	hCV9303112	T	C	C	T	C	C	C	T	C	C	C	C	T	T	T	C
	hCV2582956	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
CNGB1	hCV8719939	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A	A	A	G	A	A	A
	hCV1318840	A	G	G	A	A	G	A	G	G	G	A	A	A	G	A	A
	hCV1318858	A	G	G	A	A	G	A	G	G	G	A	G	G	A	G	A
	hCV3283832	T	C	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	C
AIPL1	hCV11897613	C	C	T	C	C	C	T	C	T	C	C	C	C	T	C	C
	hCV2036741	G	C	C	G	C	G	C	G	C	G	C	C	C	C	C	G
	hCV149230	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	A	A
	hCV247666	A	A	A	A	A	G	A	G	A	G	A	G	A	A	G	A
GUCY2D	hCV12118354	T	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	C	C
	hCV8727884	G	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	G	A	A	A
	hCV504346	G	G	G	G	G	T	G	T	G	T	G	T	T	T	G	T
	hCV111930	A	A	A	A	A	A	G	A	G	A	G	G	G	G	A	G
CRX	hCV9276973	C	A	A	C	A	A	A	A	A	A	C	A	A	A	C	A
	hCV1996743	C	G	G	C	C	G	C	C	C	G	G	G	A	G	G	G
	hCV1996882	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	hCV3170678	C	T	T	C	C	T	C	T	C	T	T	T	T	T	T	C
MERTK	hCV2939084	C	T	C	C	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	C	C
	hCV11508766	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	hCV317359	C	C	T	C	T	C	T	T	T	T	T	C	C	C	T	C
	hCV211916	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	T	C	C	C	C	C
CERKL	hCV15970375	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	hCV1051244	C	C	G	C	G	G	G	G	G	C	G	G	G	C	G	C
	hCV1276243	T	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	hCV1276214	A	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
SAG	hCV1276197	A	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	hCV9095570	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	hCV11530549	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G
	hCV9095756	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RHO	hCV9096087	T	C	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	hCV11231355	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	hCV11909732	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	-	T	C
	hCV2990757	C	G	G	T	G	C	G	G	G	G	G	G	G	G	C	C
PDE6B	hCV3140804	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	hCV9657559	T	T	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	T
	hCV9657182	G	A	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	A
	hCV1842170	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	C	C	C
CNGA1	hCV1884918	G	T	T	G	T	G	T	T	T	G	T	G	T	T	T	G
	hCV15959300	C	T	C	C	T	C	T	C	T	T	T	T	T	T	T	C
	hCV8263193	G	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	hCV1557199	T	T	C	T	T	C	T	C	T	C	T	T	T	T	T	T
LRAT	hCV471901	G	A	G	G	A	G	A	G	G	G	A	G	G	G	A	A
	hCV2892931	A	T	A	A	A	A	A	T	A	T	A	A	A	A	A	T
	hCV2892855	C	T	C	C	C	C	C	T	C	T	C	C	C	C	C	T
	hCV2407262	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDE6A	hCV11254570	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A
	hCV1878759	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	hCV986560	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	hCV2083663	G	A	A	G	A	A	A	G	A	G	A	G	G	G	G	G
TULP1	hCV3220627	T	T	T	T	T	T	T	C	T	C	T	C	C	T	C	C
	hCV2489242	G	T	T	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	G
	hCV1256724	G	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	hCV1256775	G	G	A	G	A	A	A	A	A	A	G	A	A	A	G	A
hCV16067248	G	G	T	G	G	T	G	T	G	T	G	T	G	G	T	T	

IV.1.5. Whole Genome Scan: GeneChip® Human Mapping 250K NspI Array

De los 262264 SNPs analizados con el array NspI, 95831 (36,54%) no eran informativos; 16427 (6,26%) poseían un *call rate* inferior al 95%; 1024 (0,39%) presentaban errores no mendelianos; 373 (0,14%) mostraban errores mendelianos y 346 (0,13%) no habían sido genotipados. Por lo tanto, para el análisis de ligamiento se contó con los genotipos de 148263 (56,53%) SNPs informativos. Todos los marcadores estaban en equilibrio Hardy-Weinberg. El porcentaje medio de éxito en el genotipado de los SNPs para cada muestra se situó en el 98,61%.

IV.1.5.1. Análisis de ligamiento *Two-point*

Los datos obtenidos del análisis de ligamiento *Two-point* realizado con el software SuperLink v1.6 permitieron la identificación de las regiones cromosómicas con LOD más elevado (Figura 42). Estas regiones de interés se localizaron en los cromosomas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 15, 18, 20, 21 y X. En los cromosomas 15, 18 y 21, un único marcador establecía valores máximos de LOD (Tabla 24). En el 3, aparte de existir una región que contiene varios marcadores con valores máximos de LOD, también se observó el mismo fenómeno que en los cromosomas 15, 18 y 21.

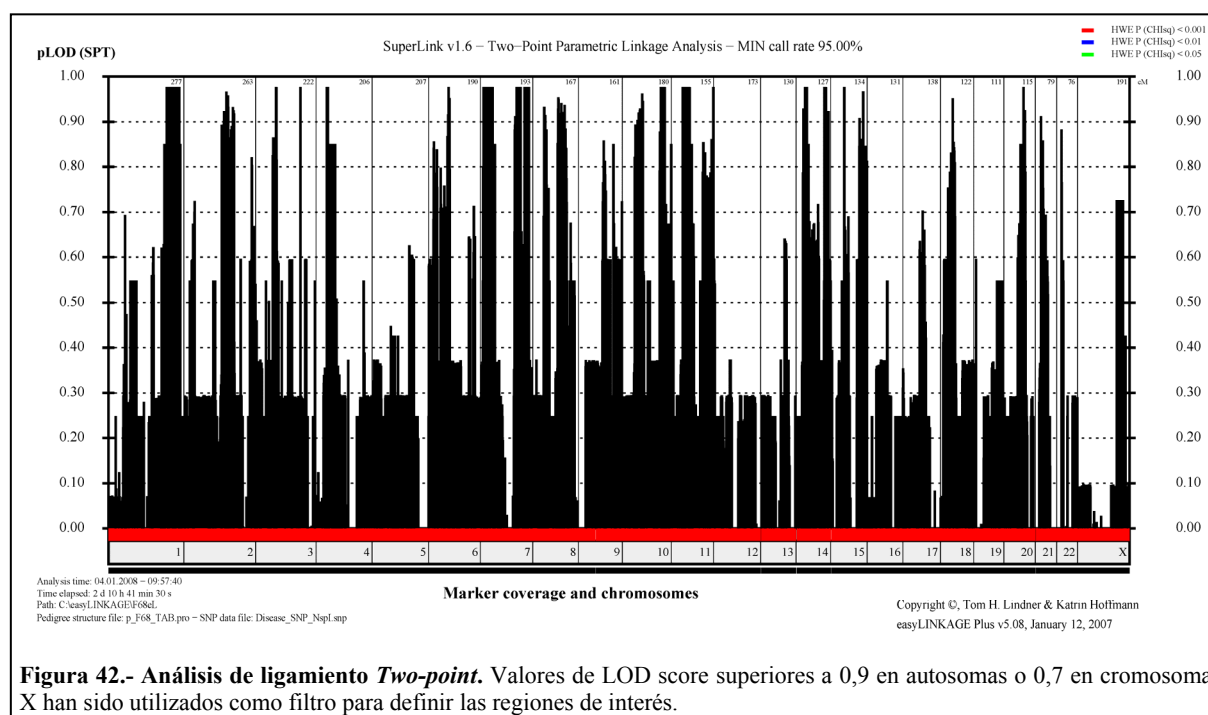


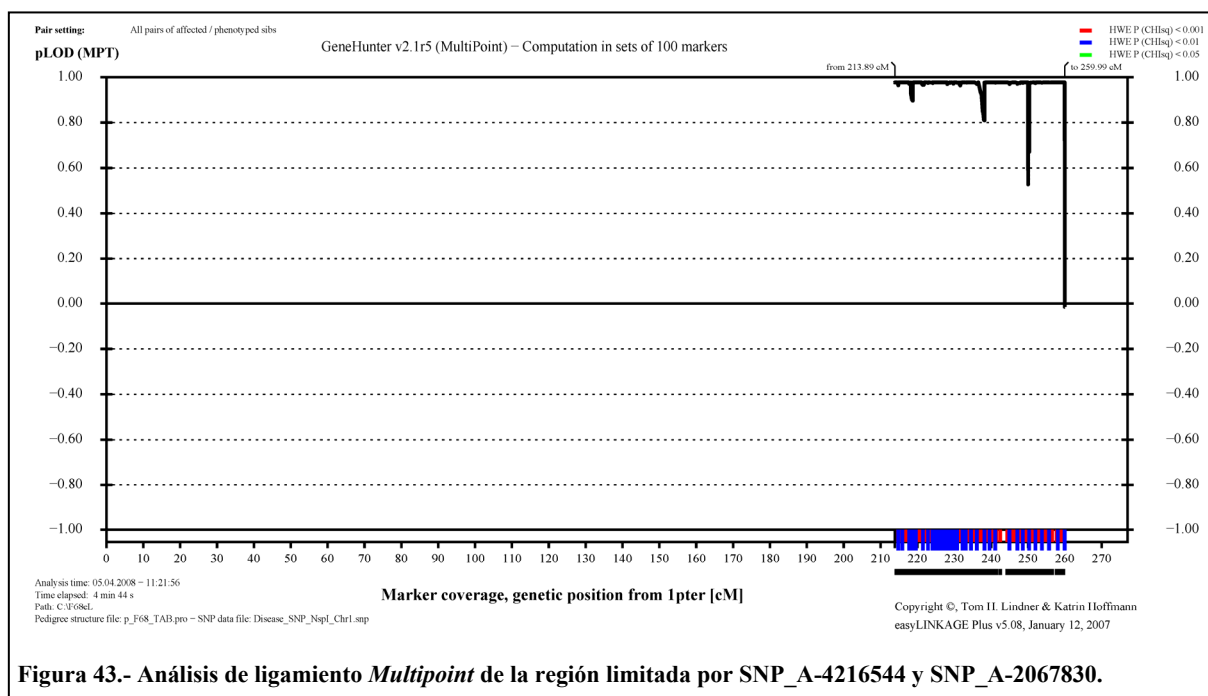
Tabla 24.- Regiones cromosómicas definidas por análisis de ligamiento <i>Two-point</i> .								
Cromosoma	DESDE				HASTA			
	SNP	POSICIÓN	LOD	θ	SNP	POSICIÓN	LOD	θ
1	SNP_A-4216544	206996559	0,9772	0,0	SNP_A-2067830	238320224	0,9772	0,0
2	SNP_A-4198662	134526202	0,9236	0,0	SNP_A-2071469	177611514	0,9050	0,0
3	SNP_A-4217919	55083902	0,9771	0,0	SNP_A-2160004	55873139	0,9767	0,0
	SNP_A-1865603	158730648	0,9772	0,0	—	—	—	—
4	SNP_A-1912810	23969868	0,9769	0,0	SNP_A-2224518	25446240	0,9772	0,0
6	SNP_A-2151638	46812426	0,9165	0,0	SNP_A-2233325	53299981	0,9431	0,0
7	SNP_A-1867650	5469366	0,9772	0,0	SNP_A-2079802	28622445	0,9772	0,0
	SNP_A-1957020	124589128	0,9050	0,0	SNP_A-2012940	138579834	0,9772	0,0
	SNP_A-2305325	150190256	0,9772	0,0	SNP_A-2259092	154811801	0,9772	0,0
8	SNP_A-1898968	23742319	0,9013	0,0	SNP_A-1870871	26626716	0,9152	0,0
	SNP_A-2159407	83136169	0,9315	0,0	SNP_A-2248197	114826752	0,9394	0,0
10	SNP_A-4213872	29690525	0,9042	0,0	SNP_A-2287521	59367558	0,9431	0,0
	SNP_A-1790530	121065598	0,9772	0,0	SNP_A-2126660	127920125	0,9768	0,0
11	SNP_A-2188459	25692593	0,9771	0,0	SNP_A-1785942	61767439	0,9769	0,0
	SNP_A-2121301	134201564	0,9772	0,0	SNP_A-2002461	134429752	0,9772	0,0
14	SNP_A-2110607	30430032	0,9318	0,0	SNP_A-4238957	36498222	0,9772	0,0
	SNP_A-4239849	95596527	0,9772	0,0	SNP_A-4194087	101566105	0,9241	0,0
15	SNP_A-4199763	50622554	0,9772	0,0	—	—	—	—
	SNP_A-2085919	91925969	0,9086	0,0	—	—	—	—
	SNP_A-2309186	95599646	0,9686	0,0	—	—	—	—
18	SNP_A-1801704	19842192	0,9538	0,0	—	—	—	—
20	SNP_A-2106523	45177762	0,9772	0,0	SNP_A-1855282	48307784	0,9279	0,0
21	SNP_A-2016342	22108903	0,9125	0,0	—	—	—	—
X	SNP_A-1800923	139020833	0,7270	0,0	SNP_A-4205073	147036245	0,7270	0,0

Los SNPs: SNP_A-1865603, SNP_A-4199763, SNP_A-2085919, SNP_A-2309186, SNP_A-1801704 y SNP_A-2016342, representan máximos de LOD por sí mismos.

IV.1.5.2. Análisis de ligamiento *Multipoint*

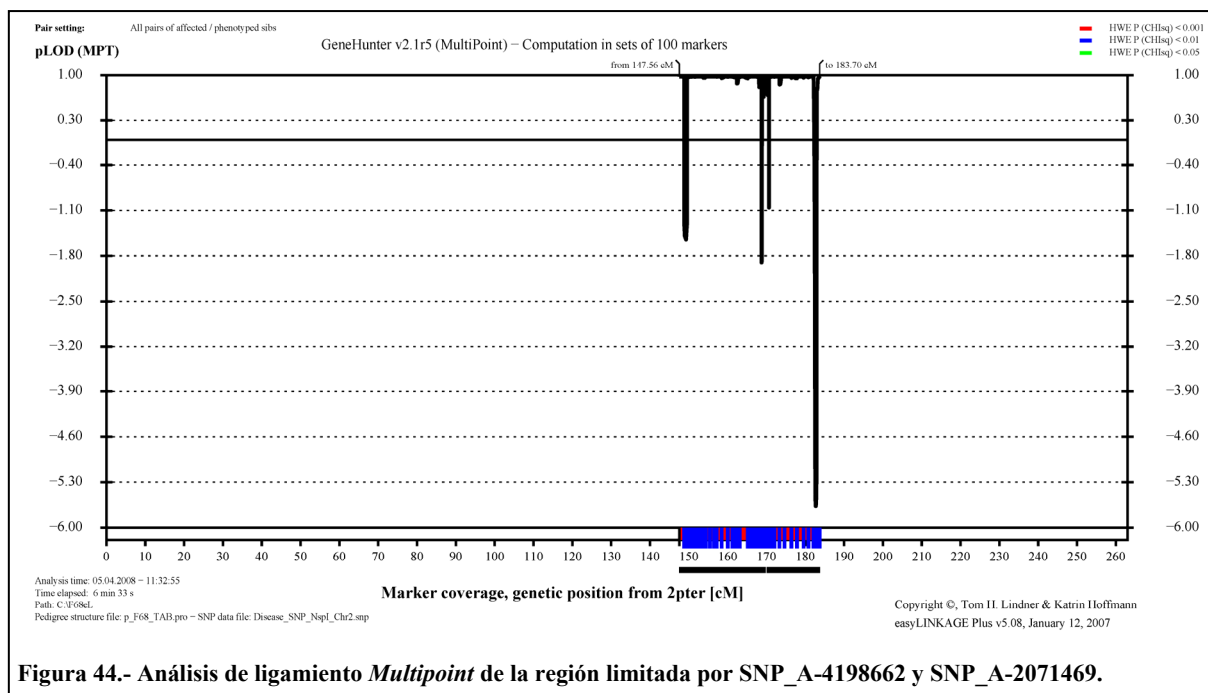
El análisis *Multipoint* realizado en cada una de las regiones de interés delimitadas por el anterior procedimiento ofreció mayor información sobre los marcadores (Figuras 43 a 66). Salvo en algunos marcadores, no se han hallado grandes diferencias en cuanto a los valores de LOD con respecto al análisis anterior. Sin embargo, algunas de estas regiones recortaron su extensión o se fragmentaron en regiones más pequeñas acotadas por marcadores con LOD inferior a 0,9. El caso extremo es el del cromosoma X, donde el nuevo cálculo deja a la inmensa mayoría de los marcadores muy por debajo del umbral de 0,9. En varias regiones los marcadores presentan valores negativos de LOD, pero estos no sobrepasan el valor de -2 establecido para la exclusión de ligamiento. En cambio, en otras regiones estos valores negativos sobrepasan por mucho este límite.

Cromosoma 1



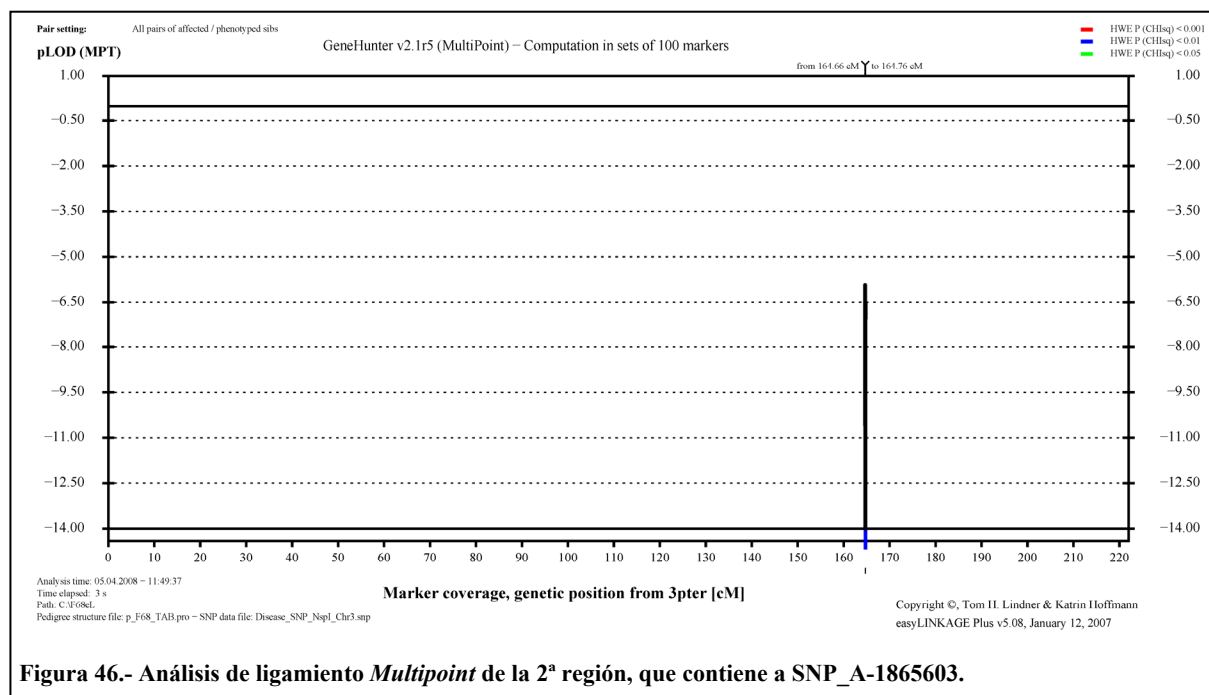
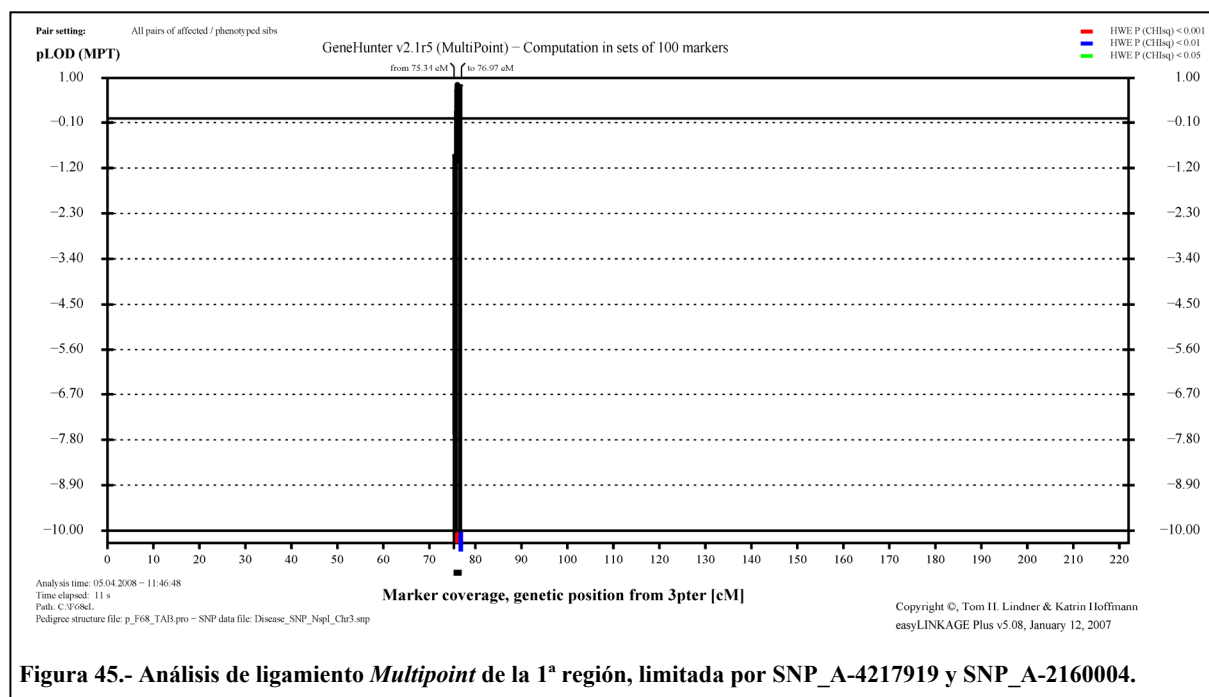
Tras el análisis *Multipoint*, la región de interés quedó dividida en cuatro subregiones que mantenían un LOD medio de 0,9772 y estaban delimitadas por SNP_A-4216544 (LOD = 0,9772); SNP_A-1825180 (0,8986); SNP_A-2178868 (0,8043); SNP_A-4193582 (0,5296) y SNP_A-2254080 (-0,0150). No se observan valores de LOD inferiores a -2 en los SNPs de esta región.

Cromosoma 2



La única región de interés del cromosoma 2 también resultó dividida en tres subregiones. Dos de tamaño considerable y una intermedia más estrecha. Las grandes mantenían un LOD medio de 0,9767 y la pequeña de 0,8516. Estaban acotadas por SNP_A-2194354 (-1,5413); SNP_A-1826087 (-1,9032); SNP_A-1915667 (-1,0577) y SNP_A-1965937 (-5,6628).

Cromosoma 3



La primera región de interés de este cromosoma presenta un LOD medio de 0,7471 y está limitada por SNP_A-1972671 ($-\infty$) y SNP_A-4214795 ($-\infty$).

En el análisis *Two-point*, la segunda región de interés presentaba un único SNP con LOD superior a 0,9 (SNP_A-1865603; 0,9772). Para poder realizar el análisis *Multipoint* se ensanchó la región 0,05 cM a cada lado del SNP. El LOD obtenido con este análisis para SNP_A-1865603 fue de -9,9318. El pico que surge en la gráfica representa el LOD de SNP_A-4151415 (-5,9034), un SNP incluido en el análisis tras ensanchar la región a estudio.

Las dos regiones analizadas presentan valores de LOD inferiores a -2.

Cromosoma 4

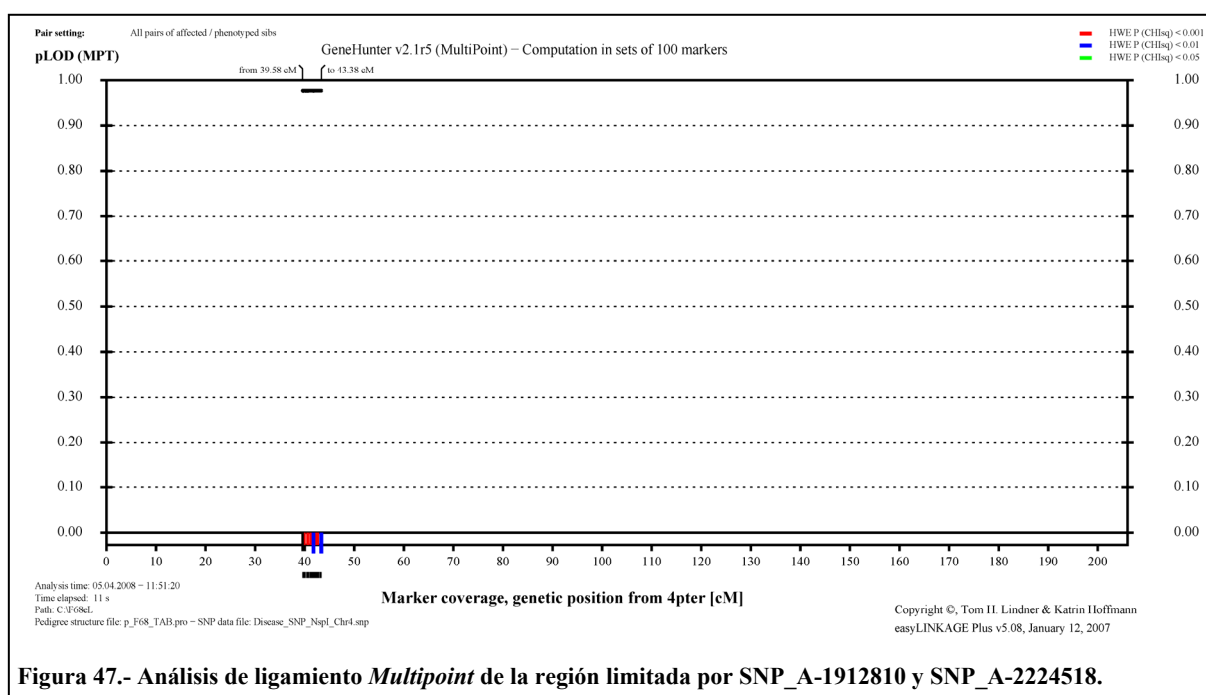


Figura 47.- Análisis de ligamiento *Multipoint* de la región limitada por SNP_A-1912810 y SNP_A-2224518.

Los valores de LOD obtenidos en los marcadores de esta región con el análisis *Multipoint* no muestran grandes cambios con respecto a los del análisis *Two-point*. SNP_A-1912810 y SNP_A-2224518 continúan manteniendo un LOD en torno a 0,9771. No se observan valores de LOD inferiores a -2 en los SNPs de esta región.

Cromosoma 6

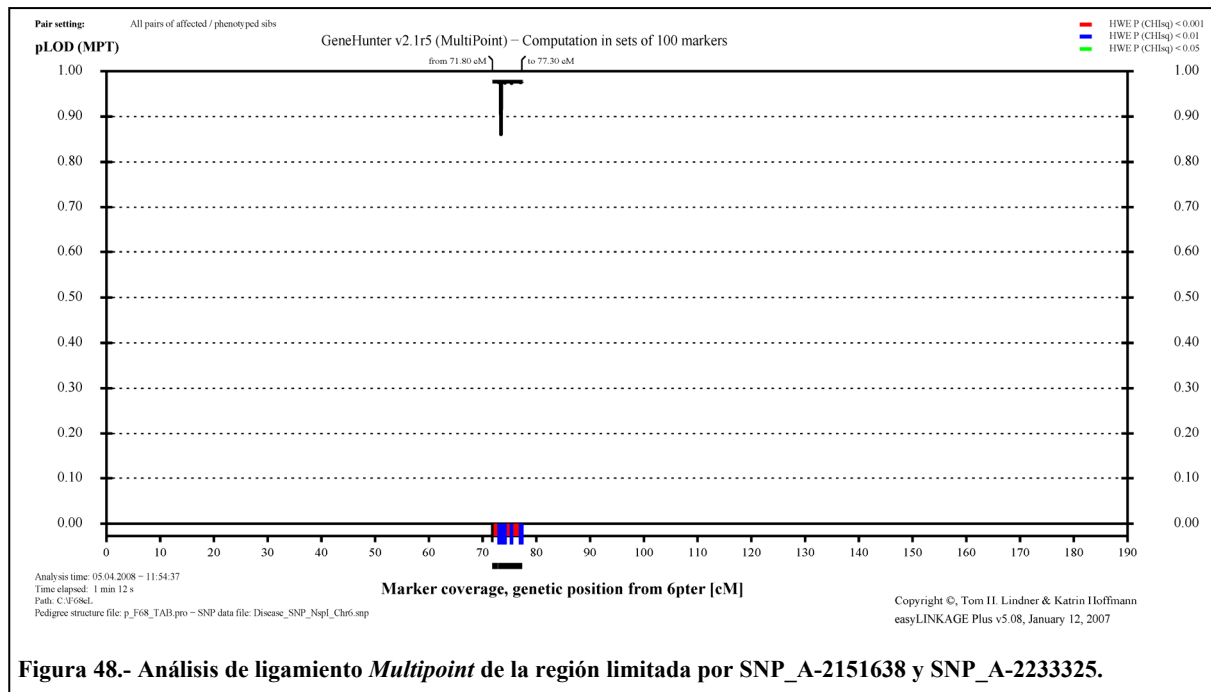


Figura 48.- Análisis de ligamiento *Multipoint* de la región limitada por SNP_A-2151638 y SNP_A-2233325.

La única región de interés de este cromosoma resultó dividida en dos subregiones. Ambas mantienen un LOD medio de 0,9758 y están acotadas por SNP_A-2151638 (0,9771); SNP_A-4211638 (0,8622) y SNP_A-2130764 (0,9770). Esta región no presenta valores de LOD inferiores a -2.

Cromosoma 7

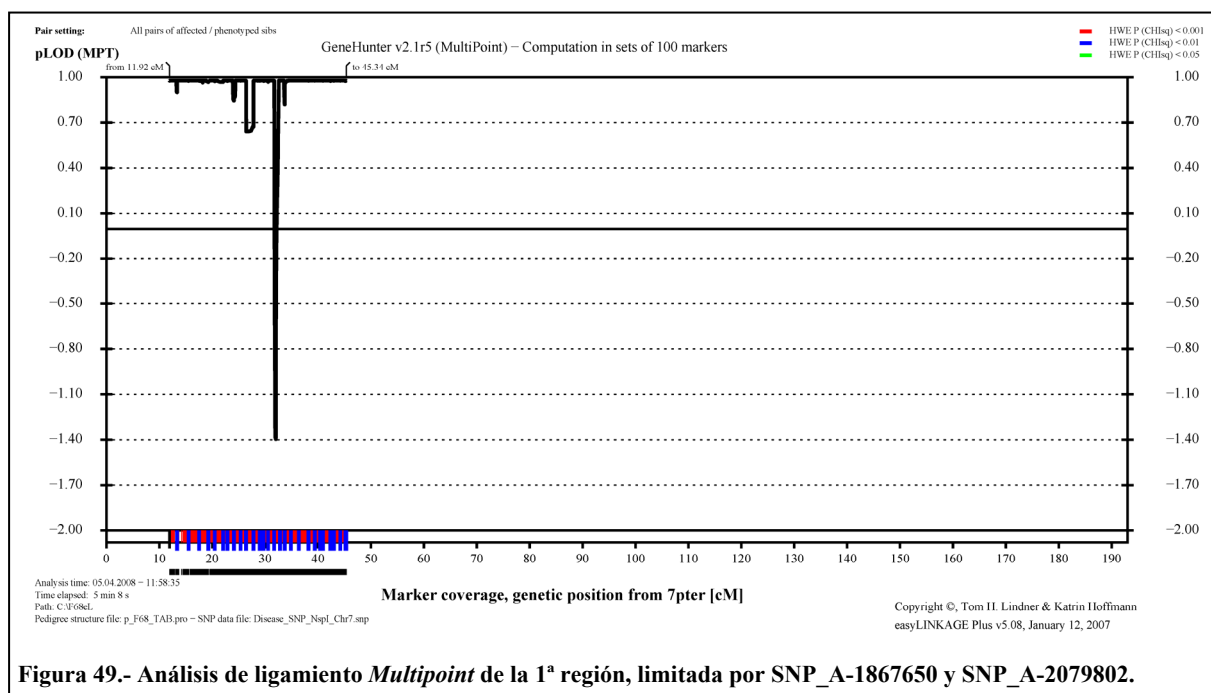
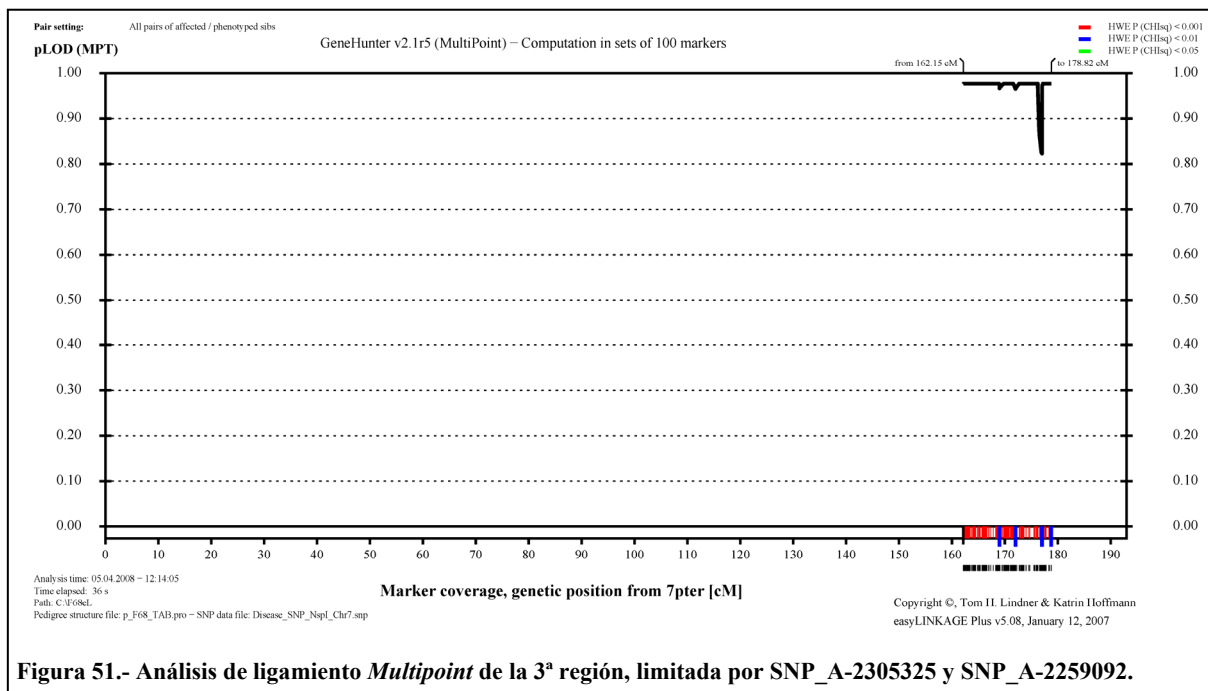
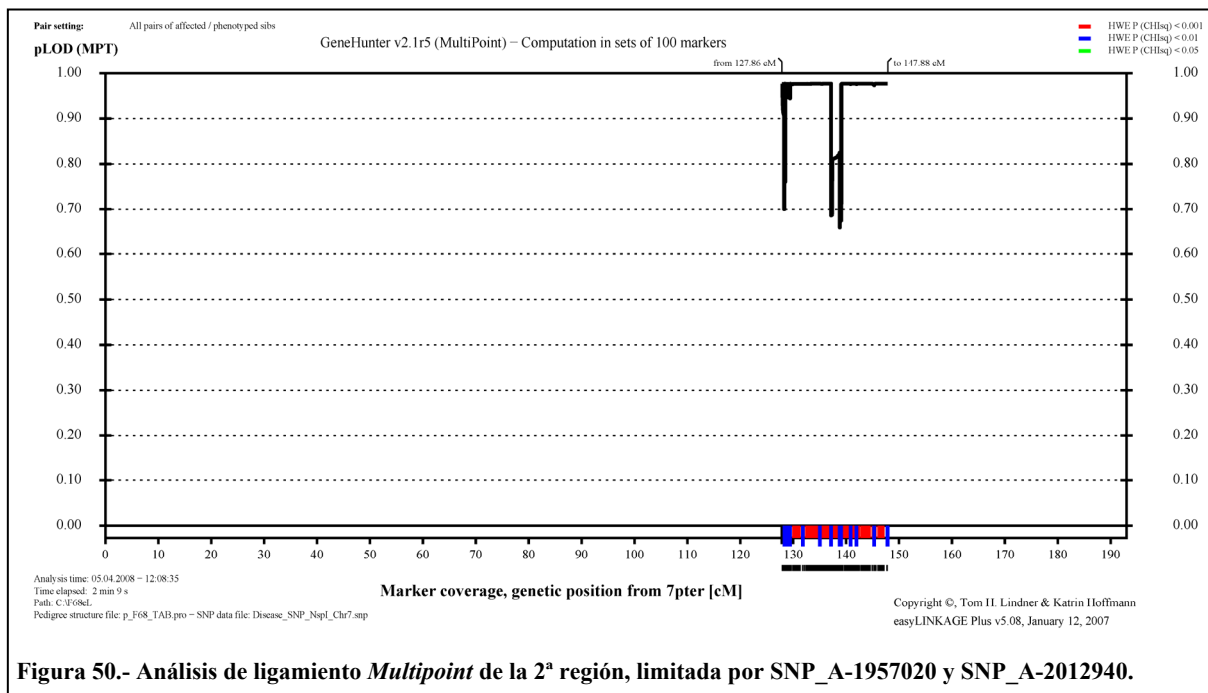


Figura 49.- Análisis de ligamiento *Multipoint* de la 1ª región, limitada por SNP_A-1867650 y SNP_A-2079802.

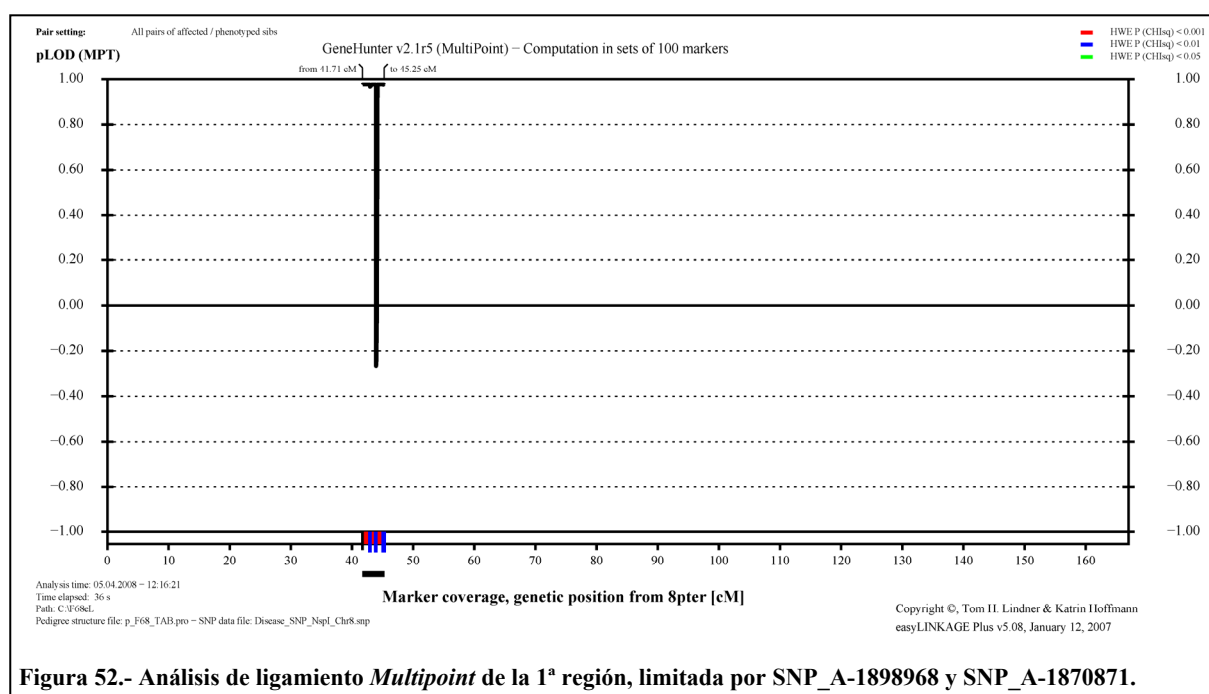
La primera región del cromosoma 7 se subdivide en 6 subregiones que mantienen un LOD medio de 0,9771. Ninguna de ellas posee marcadores con LOD por debajo de -2. Las subregiones están limitadas por SNP_A-1867650 (0,9771); SNP_A-2289296 (0,9028); SNP_A-2250377 (0,8477); SNP_A-1921041 (0,6412); SNP_A-2012411 (-1,3964); SNP_A-2061578 (0,8232) y SNP_A-2079802 (0,9771).



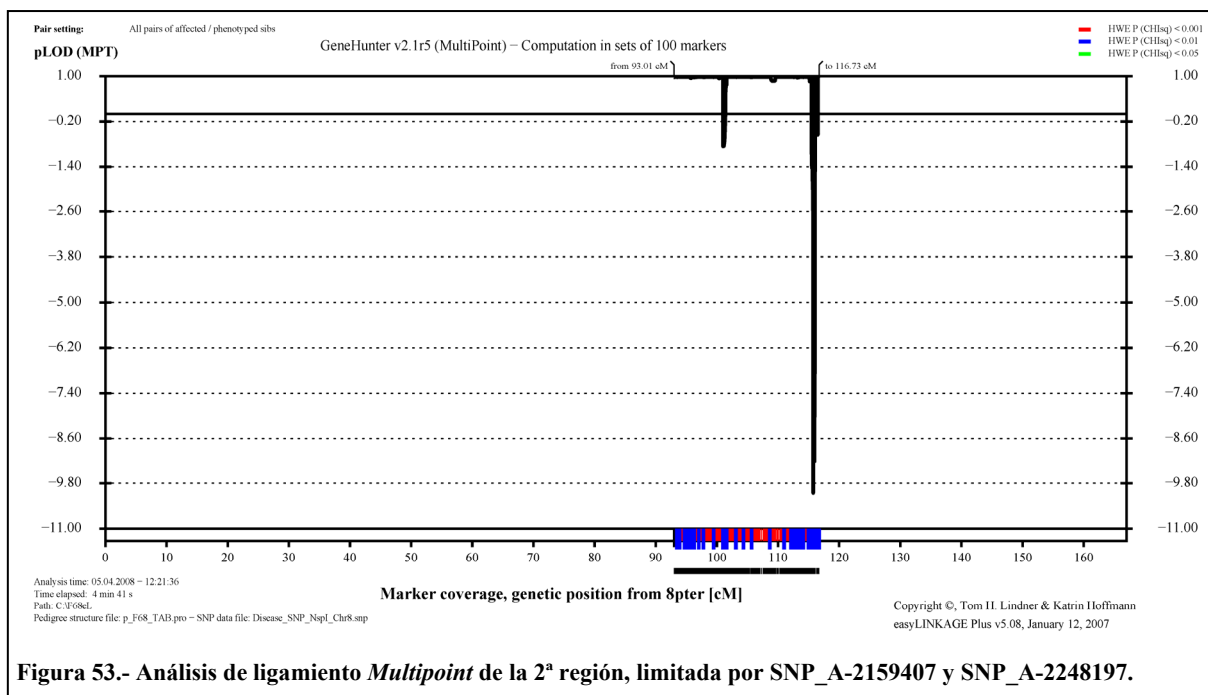
La segunda región analizada también se subdivide, pero esta vez en tres porciones. Las laterales mantienen valores de LOD por encima de 0,9, mientras que la intermedia contiene SNPs cuyos valores descienden de este umbral preestablecido. Las tres porciones están acotadas por SNP_A-2248915 (0,7002); SNP_A-4212660 (0,6860); SNP_A-2255440 (0,6597) y SNP_A-2012940 (0,9771). No se observan valores de LOD inferiores a -2 en los SNPs de esta región.

La tercera, y última región analizada de este cromosoma, presenta una pequeña división en su parte más distal. Los SNPs que delimitan estas dos regiones son SNP_A-2305325 (0,9771); SNP_A-4237544 (0,8228) y SNP_A-2259092 (0,9771). Los valores de LOD de los marcadores de esta región no descienden de -2.

Cromosoma 8

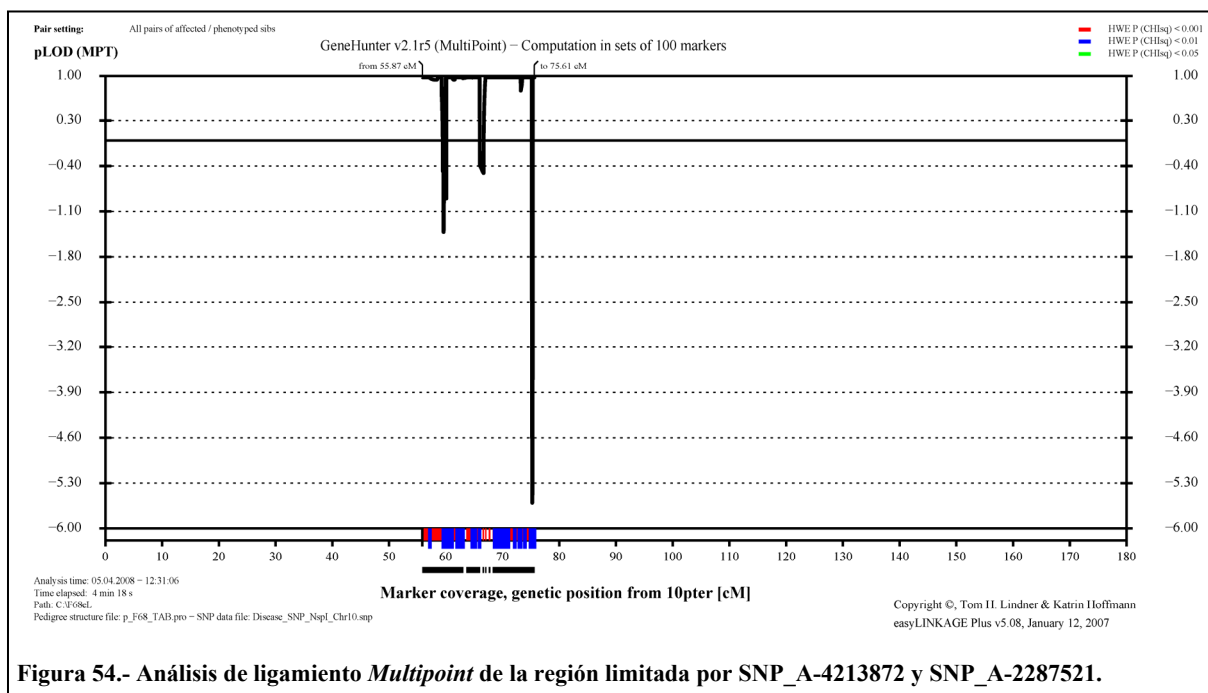


Esta pequeña región de interés está dividida en dos partes asimétricas. Ambas están flanqueadas por SNP_A-1898968 (0,9767); SNP_A-1822936 (-0,2651) y SNP_A-1870871 (0,9767). No se observan valores de LOD inferiores a -2 en ninguno de los marcadores analizados.

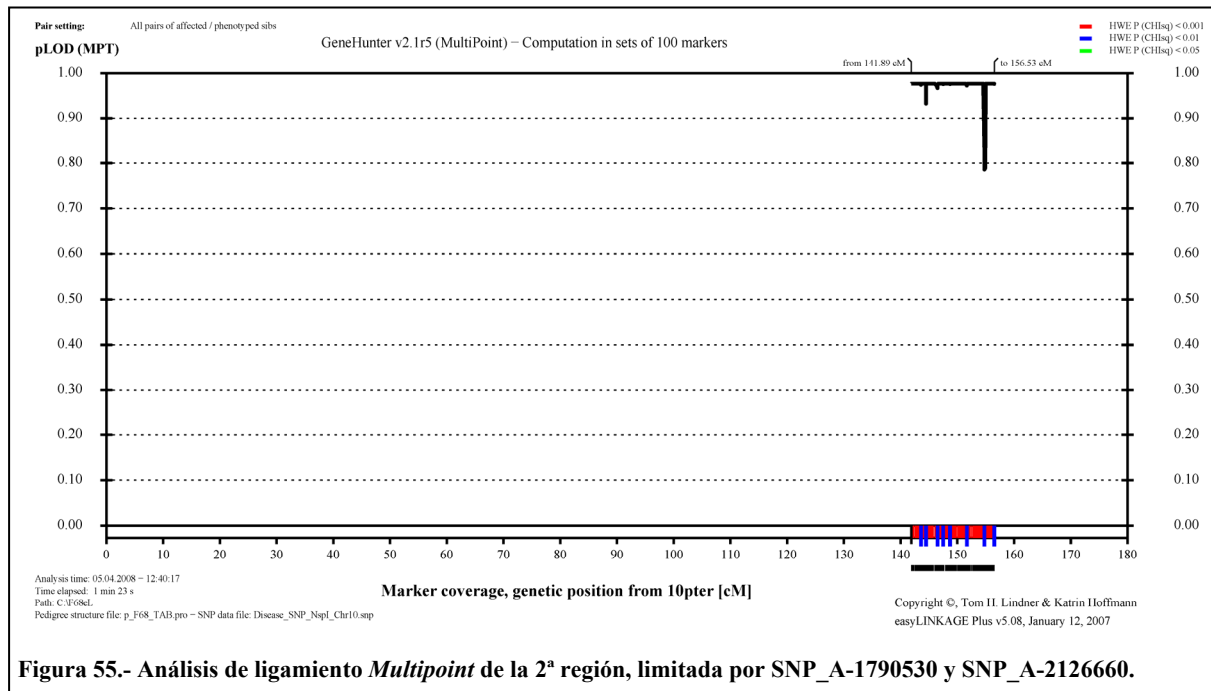


La segunda región de interés detectada en este cromosoma se divide en dos porciones. Ambas mantienen valores de LOD por encima de 0,9 y están delimitadas por SNP_A-2159407 (0,9767); SNP_A-1932250 (-0,8396) y SNP_A-1808765 (-10,0464).

Cromosoma 10

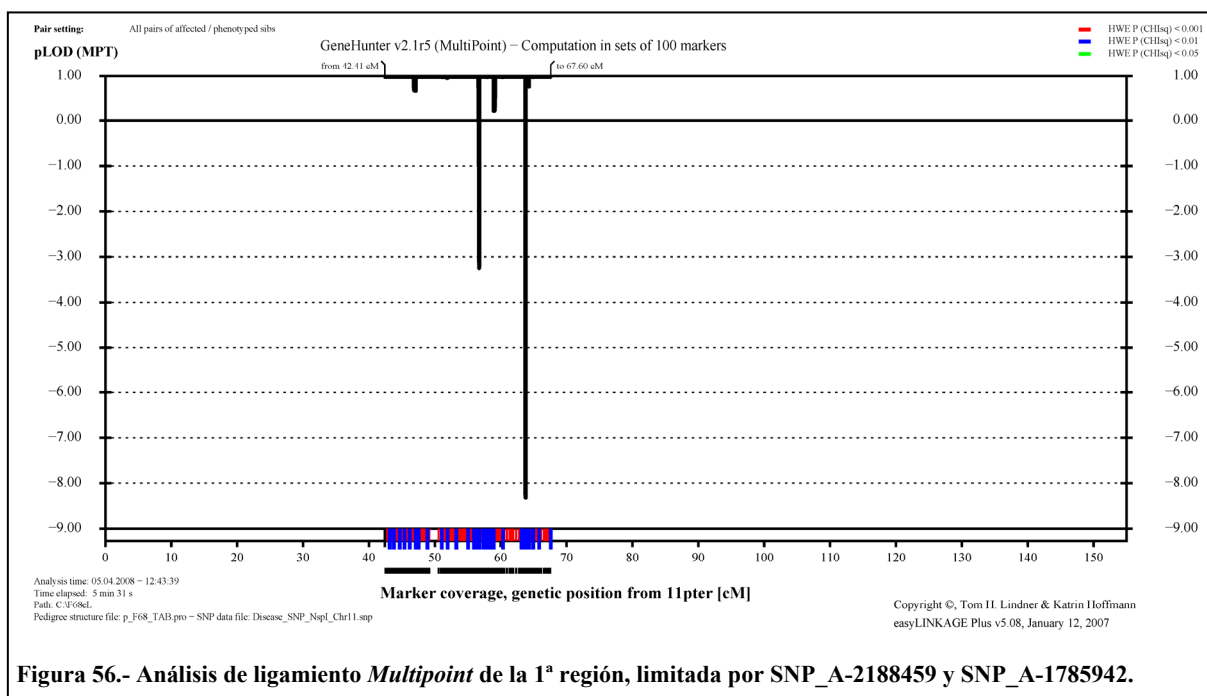


El análisis *Multipoint* de la primera región del cromosoma 10 dividió la región inicial en 4 fragmentos. Las cuatro subregiones estaban delimitadas por SNP_A-4213872 (0,9771); SNP_A-2135044 (-1,4111); SNP_A-2121247 (-0,5079); SNP_A-2028219 (0,7756) y SNP_A-2067765 (-5,5953).

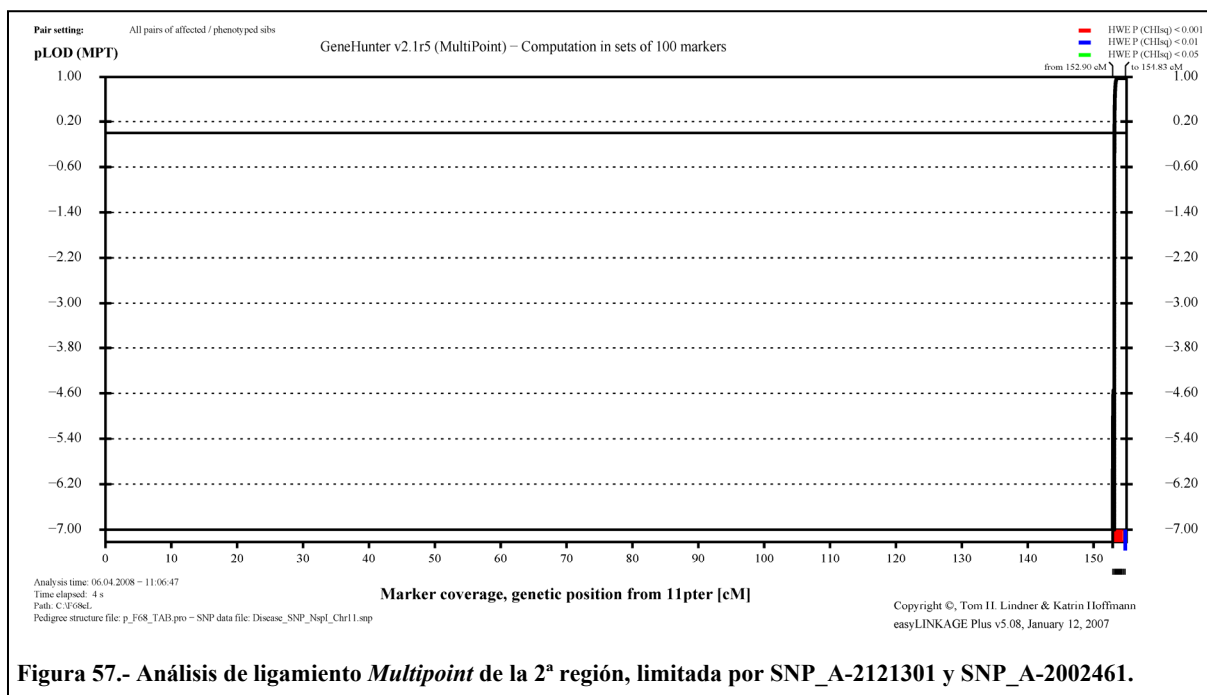


La segunda región se dividió en dos partes delimitadas por SNP_A-1790530 (0,9771); SNP_A-2115297 (0,7856) y SNP_A-2126660 (0,9771). No se observaron valores de LOD inferiores a -2 en ninguno de los marcadores de esta región.

Cromosoma 11



La primera región de interés del cromosoma 11 se subdividió en 5 porciones acotadas por SNP_A-2188459 (0,9771); SNP_A-1958585 (0,6725); SNP_A-4226656 (-3,2455); SNP_A-1946599 (0,2092); SNP_A-4215042 (-8,3100) y SNP_A-1785942 (0,9771).



El análisis *Multipoint* de la segunda región no hizo grandes cambios sobre los valores de LOD. Esta región estaba flanqueada por SNP_A-2180135 ($-\infty$) y SNP_A-2002461 (0,9771).

Cromosoma 14

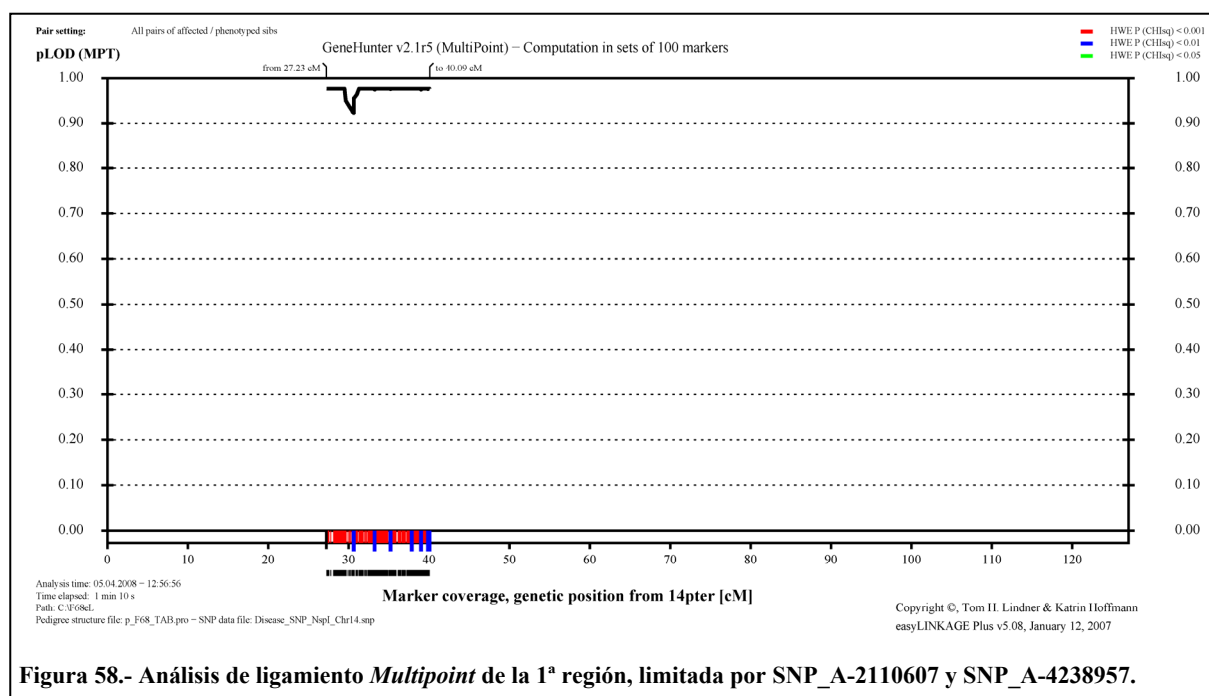


Figura 58.- Análisis de ligamiento *Multipoint* de la 1ª región, limitada por SNP_A-2110607 y SNP_A-4238957.

El análisis *Multipoint* dividió a la primera región de interés en dos partes. Los marcadores limítrofes eran SNP_A-2110607 (0,9771); SNP_A-2202667 (0,9229) y SNP_A-4238957 (0,9771).

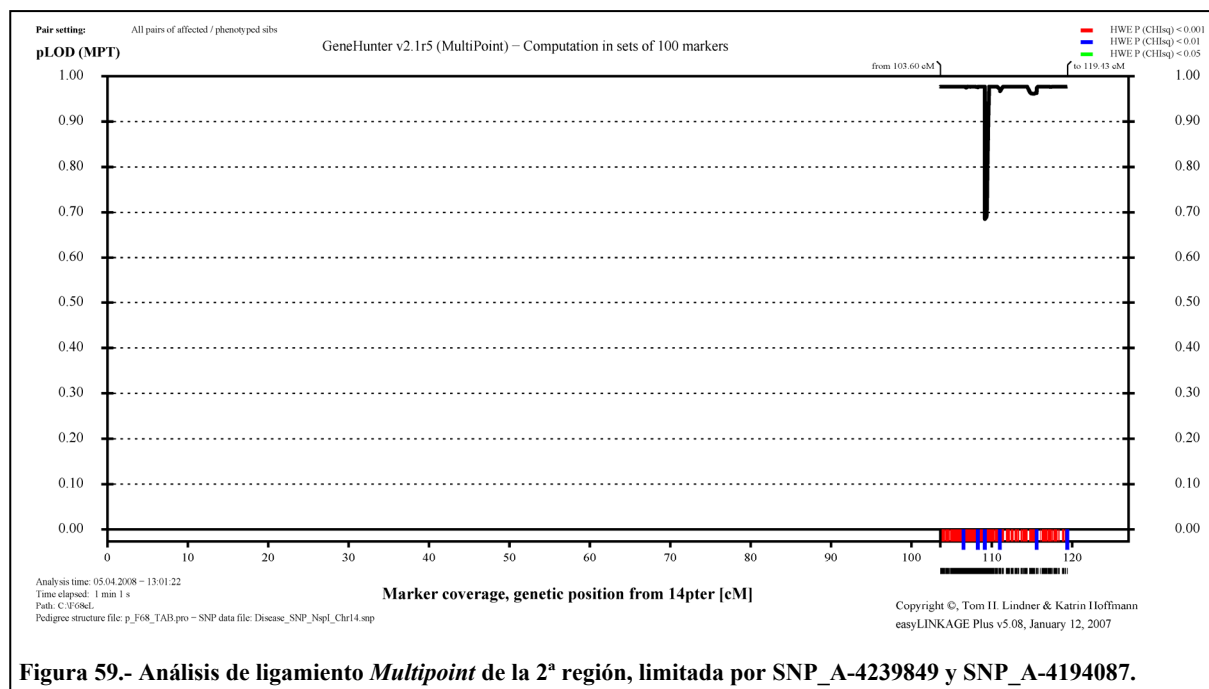
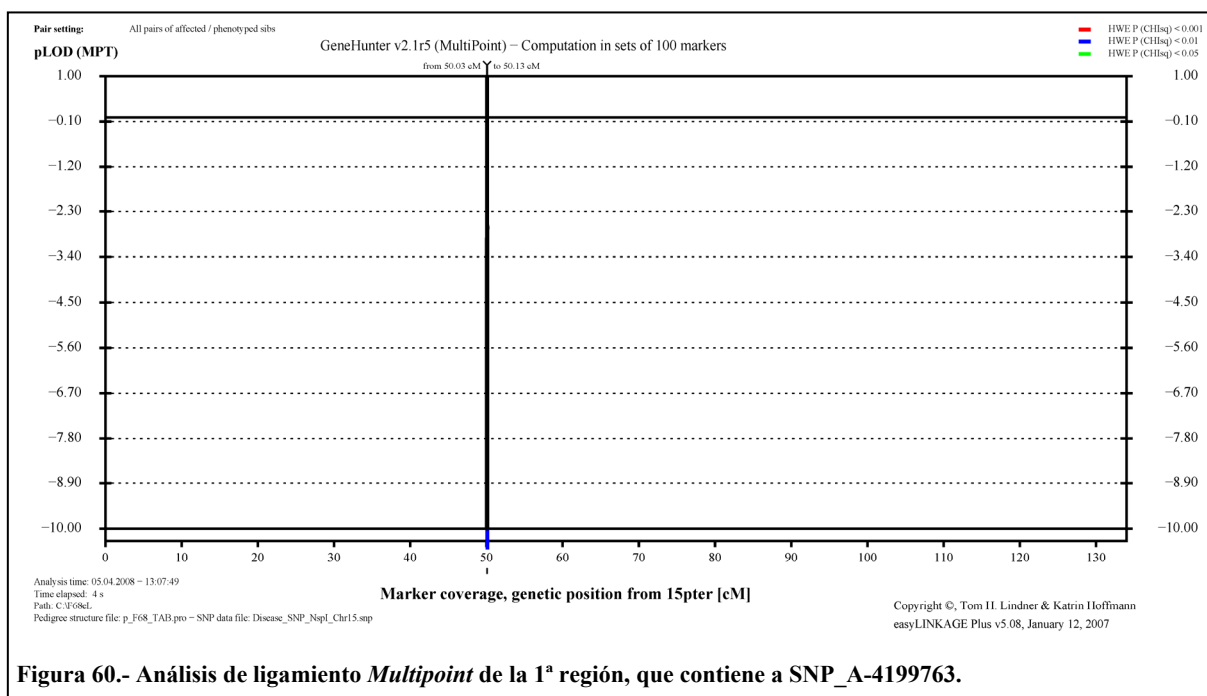


Figura 59.- Análisis de ligamiento *Multipoint* de la 2ª región, limitada por SNP_A-4239849 y SNP_A-4194087.

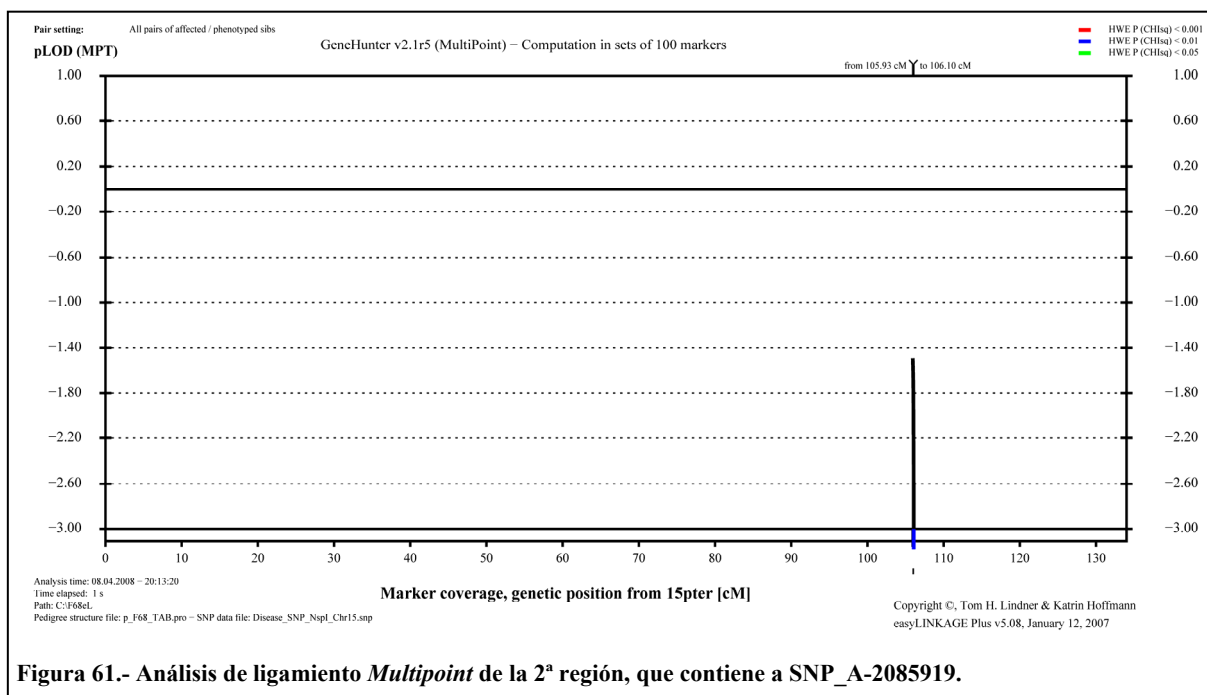
Esta región de interés también se dividió en dos porciones acotadas por SNP_A-4239849 (0,9771); SNP_A-2228368 (0,6855) y SNP_A-4194087 (0,9771).

Ninguna de las dos regiones de interés mostraron valores de LOD inferiores a -2.

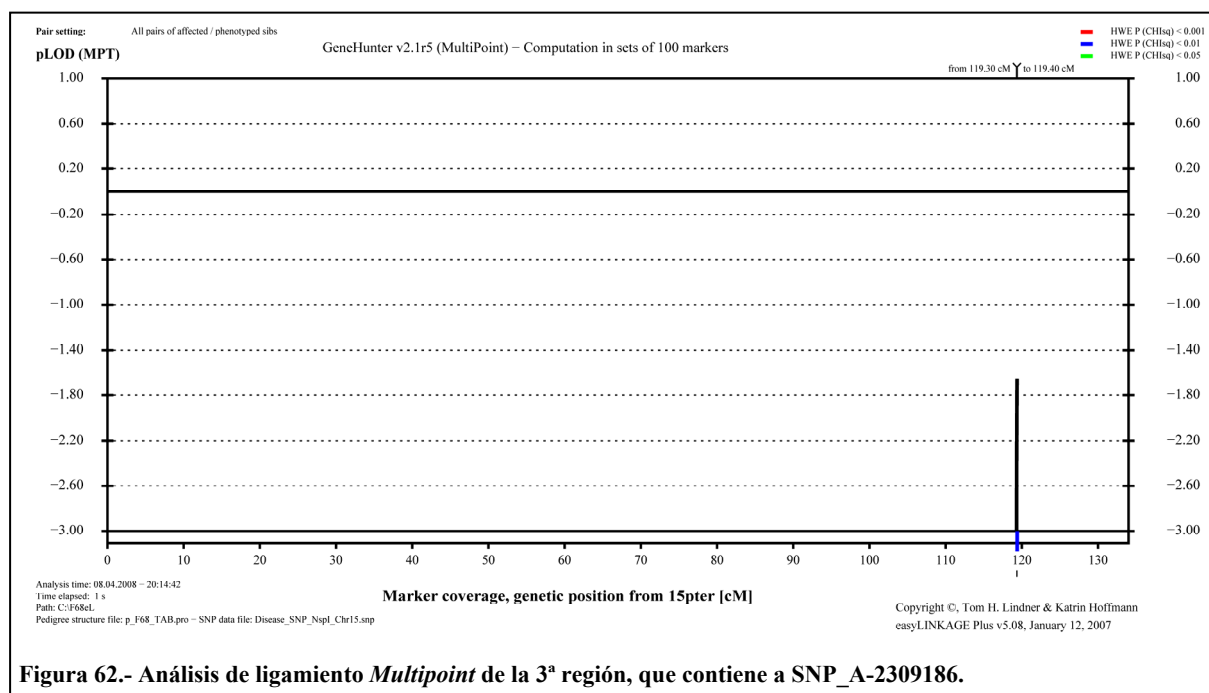
Cromosoma 15



En el análisis *Two-point*, esta región mostraba un único SNP con LOD superior a 0,9 (SNP_A-4199763; 0,9772). Tras el análisis *MultiPoint*, el LOD obtenido para este SNP fue de 0,9771.

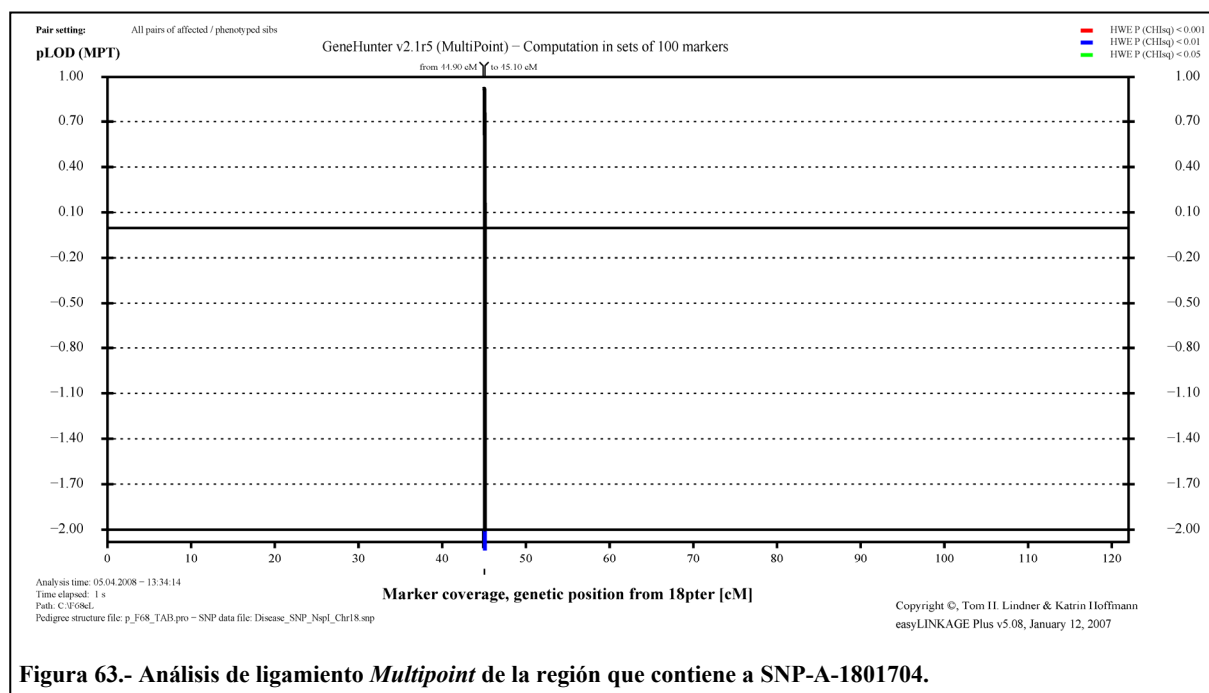


Esta región también mostraba un único SNP con un valor máximo de LOD. Con el análisis *MultiPoint*, el valor de LOD de SNP_A-2085919 pasó de 0,9086 a -1,6225.



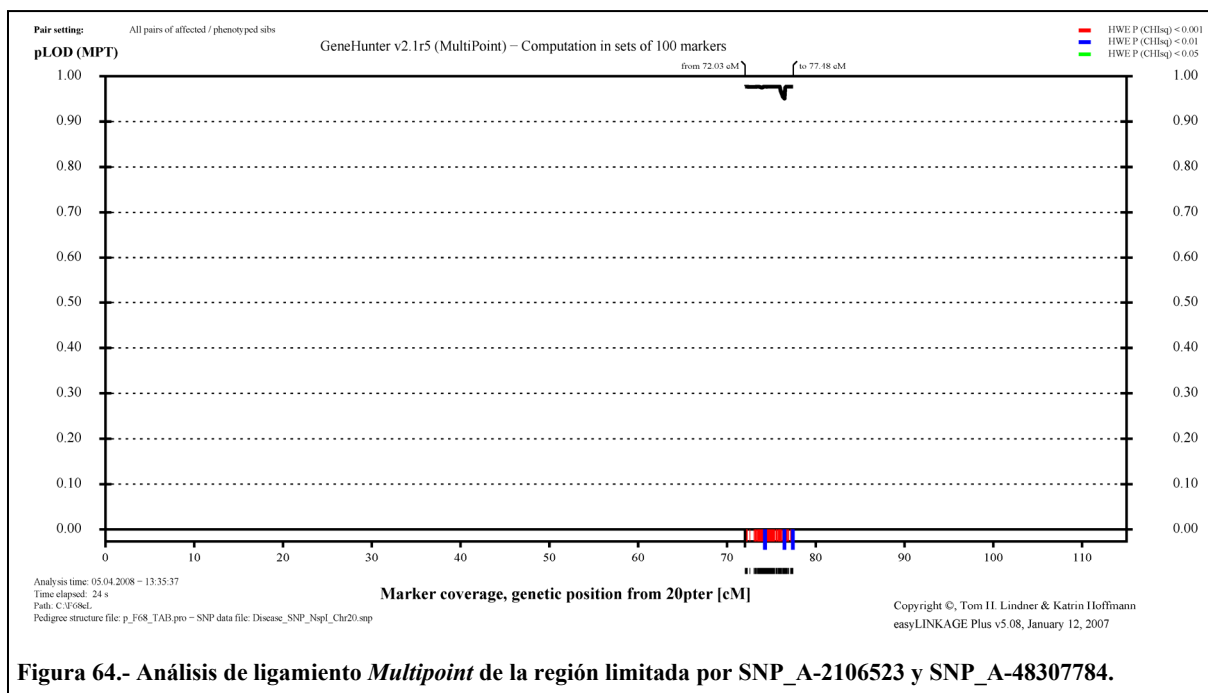
La tercera región de interés en el cromosoma 15 también estaba constituida por un único SNP. El LOD del SNP_A-2309186 (0,9686) se rebajó hasta -1,6767 tras el análisis *Multipoint*.

Cromosoma 18



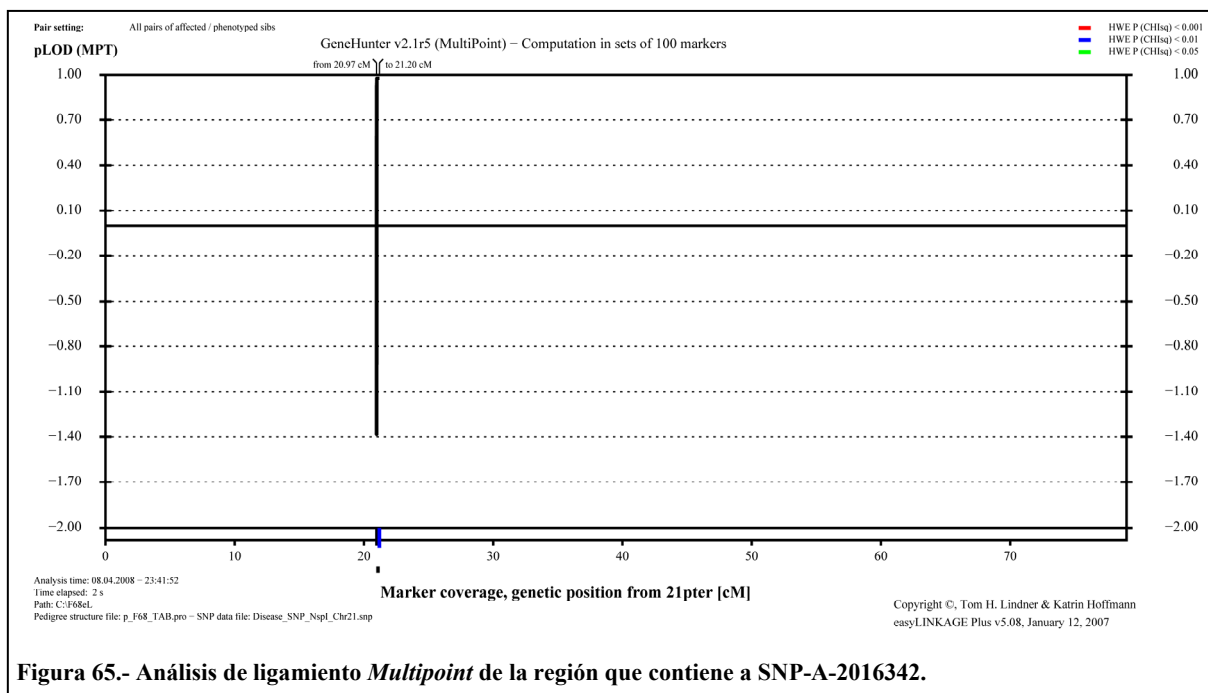
El único SNP de esta región con LOD superior a 0,9 en el análisis *Two-point* (SNP_A-1801704; 0,9538) redujo ligeramente su valor hasta 0,9223 tras el análisis *Multipoint*.

Cromosoma 20



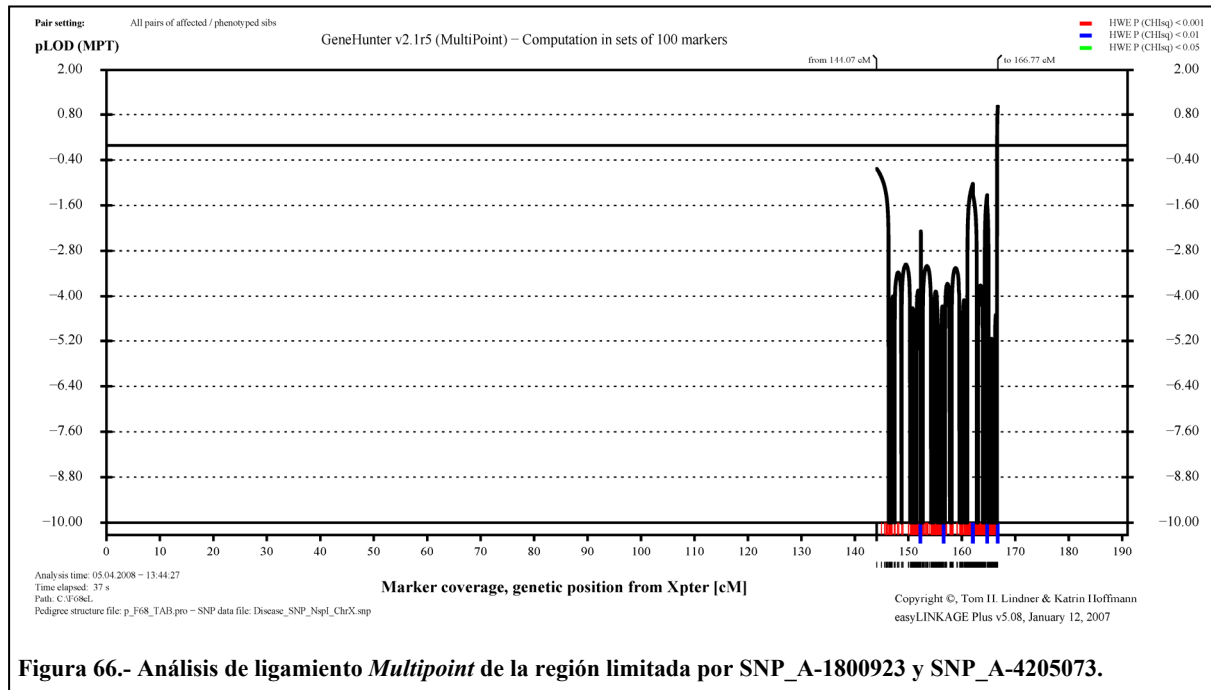
Esta región presenta una sutil división en dos partes delimitadas por SNP_A-2106523 (0,9771); SNP_A-2083197 (0,9517) y SNP_A-1855282 (0,9771). No contiene marcadores con LOD inferior a -2.

Cromosoma 21



El único SNP de esta región con LOD superior a 0,9 en el análisis *Two-point* (SNP_A-2016342; 0,9125) aumentó su valor hasta 0,9767 tras el análisis *Multipoint*.

Cromosoma X



El análisis *Multipoint* en la única región de interés del cromosoma X muestra un descenso importante en los valores LOD de los marcadores. La inmensa mayoría de estos SNPs toman valores inferiores a -2. Sin embargo, dos SNPs contiguos SNP_A-4205073 (1,0244) y SNP_A-1917755 (1,0168) alcanzan los máximos valores de LOD conseguidos en el análisis de ligamiento.

Tabla 25.- Regiones cromosómicas definidas por análisis de ligamiento <i>Multipoint</i> .						
Cromosoma	DESDE			HASTA		
	SNP	POSICIÓN	LOD	SNP	POSICIÓN	LOD
1	SNP_A-4216544	206996559	0,9772	SNP_A-1825180	211349666	0,8986
	SNP_A-1825180	211349666	0,8986	SNP_A-2178868	229317348	0,8043
	SNP_A-2178868	229317348	0,8043	SNP_A-4193582	234326924	0,5296
	SNP_A-4193582	234326924	0,5296	SNP_A-2254080	238329580	-0,0150
2	SNP_A-2194354	136253693	-1,5413	SNP_A-1826087	161609702	-1,9032
	SNP_A-1826087	161609702	-1,9032	SNP_A-1915667	165964115	-1,0577
	SNP_A-1915667	165964115	-1,0577	SNP_A-1965937	176517052	-5,6628
3	SNP_A-1972671	55290015	-∞	SNP_A-4214795	55717106	-∞
	SNP_A-1865603	158730648	-9,9318	—	—	—
4	SNP_A-1912810	23969868	0,9771	SNP_A-2224518	25446240	0,9771
6	SNP_A-2151638	46812426	0,9771	SNP_A-4211638	49280649	0,8622
	SNP_A-4211638	49280649	0,8622	SNP_A-2130764	53314948	0,9770
7	SNP_A-1867650	5469366	0,9771	SNP_A-2289296	7155220	0,9028
	SNP_A-2289296	7155220	0,9028	SNP_A-2250377	12125138	0,8477
	SNP_A-2250377	12125138	0,8477	SNP_A-1921041	13732375	0,6412
	SNP_A-1921041	13732375	0,6412	SNP_A-2012411	17844440	-1,3964
	SNP_A-2012411	17844440	-1,3964	SNP_A-2061578	19367404	0,8232
	SNP_A-2061578	19367404	0,8232	SNP_A-2079802	28622445	0,9771
	SNP_A-2248915	125355585	0,7002	SNP_A-4212660	132141753	0,6860
	SNP_A-4212660	132141753	0,6860	SNP_A-2255440	133426694	0,6597
	SNP_A-2255440	133426694	0,6597	SNP_A-2012940	138579834	0,9771
	SNP_A-2305325	150190256	0,9771	SNP_A-4237544	154325051	0,8228
8	SNP_A-4237544	154325051	0,8228	SNP_A-2259092	154811801	0,9771
	SNP_A-1898968	23742319	0,9767	SNP_A-1822936	25654318	-0,2651
	SNP_A-1822936	25654318	-0,2651	SNP_A-1870871	26626716	0,9767
	SNP_A-2159407	83136169	0,9767	SNP_A-1932250	96521299	-0,8396
10	SNP_A-1932250	96521299	-0,8396	SNP_A-1808765	111988767	-10,0464
	SNP_A-4213872	29690525	0,9771	SNP_A-2135044	31381891	-1,4111
	SNP_A-2135044	31381891	-1,4111	SNP_A-2121247	46499590	-0,5079
	SNP_A-2121247	46499590	-0,5079	SNP_A-2028219	55634457	0,7756
	SNP_A-2028219	55634457	0,7756	SNP_A-2067765	58683042	-5,5953
	SNP_A-1790530	121065598	0,9771	SNP_A-2115297	127309389	0,7856
11	SNP_A-2115297	127309389	0,7856	SNP_A-2126660	127920125	0,9771
	SNP_A-2188459	25692593	0,9771	SNP_A-1958585	31411551	0,6725
	SNP_A-1958585	31411551	0,6725	SNP_A-4226656	39756314	-3,2455
	SNP_A-4226656	39756314	-3,2455	SNP_A-1946599	43203251	0,2092
	SNP_A-1946599	43203251	0,2092	SNP_A-4215042	48970317	-8,3100
	SNP_A-4215042	48970317	-8,3100	SNP_A-1785942	61767439	0,9771
14	SNP_A-2180135	133816011	-∞	SNP_A-2002461	134429752	0,9771
	SNP_A-2110607	30430032	0,9771	SNP_A-2202667	31884179	0,9229
	SNP_A-2202667	31884179	0,9229	SNP_A-4238957	36498222	0,9771
	SNP_A-4239849	95596527	0,9771	SNP_A-2228368	98163239	0,6855
15	SNP_A-2228368	98163239	0,6855	SNP_A-4194087	101566105	0,9771
	SNP_A-4199763	50622554	0,9771	—	—	—
	SNP_A-2085919	91925969	-1,6225	—	—	—
18	SNP_A-2309186	95599646	-1,6767	—	—	—
	SNP_A-1801704	19842192	0,9223	—	—	—
20	SNP_A-2106523	45177762	0,9771	SNP_A-2083197	47800031	0,9517
	SNP_A-2083197	47800031	0,9517	SNP_A-1855282	48307784	0,9771
21	SNP_A-2016342	22108903	0,9767	—	—	—
X	SNP_A-4205073	147036245	1,0244	SNP_A-1917755	147037454	1,0168

Los SNPs: SNP_A-1865603, SNP_A-4199763, SNP_A-2085919, SNP_A-2309186, SNP_A-1801704 y SNP_A-2016342, representan máximos de LOD por sí mismos.

IV.2. Capítulo II

Búsqueda del gen responsable de RP en la familia R

Manuscrito al que ha dado lugar este trabajo:

Novel splice donor site mutation in *MERTK* gene associated with Retinitis Pigmentosa

Submitted to British Journal of Ophthalmology (ID#: BJOPHTHALMOL/2008/139204).

El elevado número de estudios realizados con el ánimo de profundizar en las bases genéticas de la RP ha conducido a la identificación de –hasta el momento– 36 genes y 10 loci, responsables del ~50% de los casos de RP. Las mutaciones encontradas en uno de estos genes identificados, *MERTK*, han sido asociadas a la alteración de la actividad fagocitaria de las células del Epitelio Pigmentario de la Retina y la instauración de una forma de RP autosómica recesiva. En este capítulo de resultados se describe como a través de la utilización de las técnicas *high-throughput* de genotipado de SNPs y el análisis de cosegregación realizado con los datos genotípicos obtenidos, se ha identificado a *MERTK* como el gen responsable de la RP autosómica recesiva de una familia gallega. El consiguiente análisis mutacional de este gen ha revelado la presencia de una variante de secuencia patogénica no descrita anteriormente. Esta nueva mutación, IVS16+1G>T, causa el *skipping* del exón 16 durante el procesado del pre-mRNA. La ausencia de los 110 nucleótidos del exón 16 en la secuencia final del mRNA origina un cambio de pauta de lectura que introduce un codón de parada prematuro en el exón 17, dando lugar a un transcrito con un dominio tirosín kinasa severamente alterado. Probablemente, este incompleto mRNA será eliminado mediante el proceso de *Nonsense Mediated Decay* (NMD), un mecanismo celular que evita la traducción de mRNAs defectuosos en proteínas truncadas y los efectos perjudiciales que estas podrían provocar en la célula. El NMD también proporcionaría un efecto protector en los portadores heterocigotos que no mostrarían ninguna sintomatología de RP.

Novel splice donor site mutation in *MERTK* gene associated with Retinitis Pigmentosa

A. J. Brea-Fernández^{1,5}, E. Pomares^{2,5,6}, M. J. Brión^{1,5}, G. Marfany^{2,5,6}, M. J. Blanco³, M. Sánchez-Salorio⁴, R. González-Duarte^{2,5,6} and A. Carracedo^{1,5*}

¹Grupo de Medicina Xenómica, Universidade de Santiago de Compostela, Fundación Galega de Medicina Xenómica (Consellería de Sanidade), Santiago de Compostela, Spain.

²Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

³Servicio de Oftamología, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Spain.

⁴Fundación Instituto Galego de Oftalmología (Consellería de Sanidade), Santiago de Compostela, Spain.

⁵Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Instituto Carlos III, Spain.

⁶Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain.

KEYWORDS: Retinitis Pigmentosa; *MERTK*; RPE phagocytosis; Exon skipping.

Word count: 2479 words.

*Corresponding author: Ángel Carracedo. Grupo de Investigación de Medicina Xenómica, Fundación Galega de Medicina Xenómica, Choupana s/n, E-15706 Santiago de Compostela, Spain. Phone: +34981951490. Fax: +34981951434. E-mail: apimlang@usc.es

ABSTRACT

Background/aim: Mutations in *MERTK*, a member of the *MER/AXL/TYRO3* receptor kinase family, have been associated with disruption of the Retinal Pigment Epithelium (RPE) phagocytosis pathway and settling of autosomal recessive RP (arRP) in humans. This study reports a novel *MERTK* mutation (IVS16+1G>T) in a Spanish consanguineous family presenting arRP.

Methods: 21 genes were screened by high-throughput SNP multiplexing assay. Subsequent direct sequencing was performed in exons and intronic boundaries of the cosegregating gene. The effect of the mutation in mRNA splicing was confirmed by cDNA analysis.

Results: Haplotypic data revealed *MERTK* cosegregation with RP in affected individuals. *MERTK* sequencing showed a G-to-T substitution at the first nucleotide of intron 16. Finally, cDNA analysis confirmed the lack of exon 16 in the mRNA splicing process.

Conclusions: IVS16+1G>T disrupts the splice donor site causing exon 16 skipping. Absence of exon 16 causes a frameshift, and subsequently, the introduction of a Premature Termination Codon into exon 17 creating an altered mRNA transcript with a seriously affected tyrosine kinase domain.

INTRODUCTION

Retinitis Pigmentosa (RP; OMIM #268000), a pigmentary retinopathy showing a wide genetic heterogeneity, causes the progressive degeneration of the photoreceptor cells. To date, 35 genes and 11 loci have been reported to cause RP (RetNet; <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet>); however more than 50% of RP cases remain unassigned. The exclusion of reported genes by mutation screening –an essential step to recognize new causative genes– becomes a highly expensive and practically unrealistic process. In order to perform an extensive, rapid and cost-effective screening of known arRP candidate genes, we have developed a strategy combining cosegregation analysis and high-throughput SNP genotyping technologies.[1]

In the outer retina, the Outer Segment (OS) of the photoreceptor cell and the Retinal Pigment Epithelium (RPE) are closely associated. RPE cell phagocytose the shed OS disks, and recycle the retinoids and membrane lipids to the photoreceptor cell.[2-4] Histological examination of the RCS (Royal College of Surgeons) rats retina revealed an abnormal build-up of OS debris between the OS and the RPE cell, due to loss of phagocytic activity by the RPE.[5-8] In 2000, D’Cruz *et al.* identified *Mertk* as the responsible gene of this retinal dystrophy in RCS rats.[9, 10] *MERTK* gene is a member of the *MER/AXL/TYRO3* receptor kinase family with a structure consisting of 19 coding exons, encoding a 999 amino acid protein of 110 kDa[11, 12] (fig 1). Currently, only eight isoforms of mRNA encoded by *MERTK* are fully described (UCSC Genome Browser on Human; Mar. 2006 Assembly; <http://www.genome.ucsc.edu/>), all showing a wide variation in length and exon-intron arrangement in comparison with the original structure of *MERTK*. Mutation screening of the human *MERTK* orthologue,[12] located at 2q 14.1,[13] reported three mutations (2070delAGGAC, IVS10-2A>G and R651X) in three individuals with RP and eleven

sequence variants. These findings were the first conclusive evidence implicating the RPE phagocytosis pathway in human retinal disease and *MERTK* as the gene responsible for RP. A subsequent mutation study revealed three novel *MERTK* sequence variants: R722X, R844C and R865W.[14] Data on *MERTK* mutations have been reviewed and updated in 2006 by Tada *et al.*[15] This work also showed 17 sequence variants: three isocoding changes, eight intronic changes and six missense changes (Leu12Pro, Cys115Gly, Asn118Ser, Arg466Lys, Ile518Val and Arg909His). Recently, a novel frameshifting single base deletion (2214delT) inside exon 17 was identified.[16]

MATERIALS AND METHODS

Patients and DNA samples

The study was carried on a consanguineous family of Galicia (the northwest region of Spain) showing an autosomal recessive inheritance pattern of RP. The clinical phenotype of the three affected brothers is in accordance with the diagnostic criteria of RP. Carriers are healthy and do not present any visual impairment (fig 2).

After informing the individuals on the purpose and procedures to be performed, following the tenets of the Convention of Helsinki, peripheral blood samples were collected and DNA was extracted by Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol method and/or the QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

Candidate gene screening by high-throughput SNP multiplexing

Screening of arRP candidate genes was accomplished using the first development step of the SNP multiplex assay published by Pomares *et al.*[1] The assay comprised 21 genes under study, 17 of which cause arRP (*ABCA4*, *CERKL*, *CNGA1*, *CNGB1*, *CRB1*, *LRAT*, *MERTK*, *NR2E3*, *PDE6A*, *PDE6B*, *RGR*, *RHO*, *RLBP1*, *RPE65*, *SAG*, *TULP1*, *USH2A*). Of these seventeen, four genes (*CRB1*, *LRAT*, *RPE65* and *TULP1*) are shared with autosomal recessive Leber Congenital Amaurosis (arLCA). Four additional genes involved in arLCA were also included in the assay (*AIPL1*, *CRX*, *GUCY2D* and *RPGRIP1*).

In the present work, a set of 7-10 SNPs linked to each of the candidate genes was characterized using the SNPlex platform (Applied Biosystems, Foster City, CA, US). Genotypes generated by the assay allowed the reconstruction of individual haplotypes and subsequent cosegregation analysis. The criteria for gene inclusion (i.e. considering a screened gene as possible causative gene) were cosegregation and homozygosity in consanguineous pedigrees; and only cosegregation or lack of informativeness in nonconsanguineous pedigrees. All genes in disagreement with the above inclusion criteria were discarded.

Exon amplification and mutation screening

In order to amplify *MERTK* exons and intronic boundaries, new primers were designed using PRIMER3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) and Primer Express v2.0 (Applied Biosystems) software. The PCR reaction mix contained 1X PCR Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM of dNTPs, 0.2 μM of each primer, 1 U Taq polymerase (PROMEGA, Madison, WI, US) and 100-200 ng of DNA, in a total volume of 25 μl. Amplification conditions consisted of an initial denaturation at 95°C for 2 minutes, followed

by 40 cycles at 94°C for 30 seconds, 55-62°C for 30 seconds (depending on individual primer T_m) and 72°C for 45-90 seconds.

Subsequent mutation screening was accomplished by sequencing analysis of 19 *MERTK* exons. PCR products were first purified with MultiScreen filter plates (MILLIPORE, Billerica, MA, US). Sequencing reactions were then performed using the BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 kit (Applied Biosystems) and purified with Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup Kit (MILLIPORE). Products were analysed on the ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

RNA isolation, RT-PCRs and cDNAs

Total RNA was isolated from buffy coats with the RNeasy Mini Kit (QIAGEN). A preheated mixture (65°C, 15 minutes) containing 5 µl of total RNA (~3 µg) and 2.1 µl H₂O DEPC was reverse transcribed in a 20 µl final volume reaction including 1X First-Strand reverse transcription buffer, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 100 U SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, US), 25 mM pd(N)₆ random hexamer primers, 1 mM of each dNTP, and 20 U of RNAGuard RNase Inhibitor (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, US). The reaction mix was incubated at 25°C for 10 minutes, 42°C for 50 minutes and heat inactivated at 99°C for 3 minutes. The cDNA obtained was amplified through a nested PCR using a first pair of primers (F3: GCTTGGGAGTCAGTGAGGAAC and R4: CAGTGGAGCAAGGGTGGAG; located in exons 12 and 19), followed by a second pair of primers (F1: AATACGGGGACCTGCATACTTAC and R1: GGGCTGCTTCAACCTGTG; located in exons 15 and 18). The reaction mix was as described above for exon amplification, and amplification conditions were: 94°C for 2 minutes and 40 cycles of 94°C for 30 seconds and 68°C for 150 seconds to amplify F3-R4

fragment; and 40 cycles of 94°C for 30 seconds and 68°C for 90 seconds to amplify F1-R1 fragment.

Control reactions to detect DNA contamination through the process of RNA isolation were performed with primers for human *ABL1* (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1), forward A2: TTCAGCGGCCAGTAGCATCTGACTT (exon 2), and reverse CA3: TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTGC (exon 3). PCR products were gel purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) and following sequencing reaction was performed as previously described.

RESULTS

Gene screening

The SNPlex assay (Applied Biosystems) allowed the genotyping of the 175 SNPs selected for the 21 screened genes. Haplotype reconstruction from genotypic data allowed the exclusion of 20 genes. None of them showed homozygosity and cosegregation, the prerequisites for gene inclusion in consanguineous pedigrees outlined above. However, haplotypic data revealed a homozygous state for the seven *MERTK* selected SNPs and cosegregation with RP in affected individuals.

Identification of a novel *MERTK* mutation

MERTK exon sequencing allowed the exclusion of previously reported arRP causal mutations (IVS10-2A>G, R651X, 2070delAGGAC, R722X, 2214delT and R844C). At the

same time 28 sequence variants were found in this family: three missense changes (Ser118Asn, Arg466Lys and Ile518Val), two isocoding changes (Asn498Asn and Ser627Ser), one upstream change, and 22 intronic changes (table 1).

Table 1 *MERTK* sequence variants

LOCATION	DNA CHANGES	PREDICTED EFFECT
5'upstream	-250T>C (rs35507976)	No effect
Exon 2	c.353G>A (rs13027171)	Ser118Asn
Intron 2	IVS2+58insTTTATTATTTA	No effect
Intron 2	IVS2+58insTTTATTATTTATTTATTTATTTATTTA	No effect
Intron 3	IVS3+10C>T (rs11683694)	No effect
Intron 4	IVS4+13T>C (rs3761701)	No effect
Intron 4	IVS4+41G>T (rs3761700)	No effect
Intron 7	IVS7-173C>T (rs1996322)	No effect
Intron 7	IVS7-46G>A (rs1996323)	No effect
Intron 8	IVS8+27A>G (rs17175626)	No effect
Intron 8	IVS8-91G>A	No effect
Exon 9	c.1397G>A (rs7604639)	Arg466Lys
Intron 9	IVS9-72G>T (rs3811632)	No effect
Intron 9	IVS9-20G>A (rs3811633)	No effect
Exon 10	c.1494C>T (rs3811634)	Asn498Asn
Exon 10	c.1552A>G (rs3811635)	Ile518Val
Intron 12	IVS12+180C>A (rs4353657)	No effect
Intron 12	IVS12-171G>A (rs4278932)	No effect
Intron 13	IVS13+92C>G (rs4848933)	No effect
Intron 13	IVS13+104G>A	No effect
Exon 14	c.1881A>G (rs10208134)	Ser627Ser
Intron 14	IVS14-42A>G (rs11884693)	No effect
Intron 15	IVS15-264A>G (rs3811638)	No effect
Intron 15	IVS15-11C>A (rs3811640)	No effect
Intron 16	IVS16+1G>T	Disrupt splice donor site
Intron 17	IVS17-103G>T	No effect
Intron 18	IVS18-157A>G (rs6738237)	No effect
Intron 18	IVS18-153T>C (rs4848958)	No effect

DNA numbers start from the first coding nucleotide. Several DNA changes correspond to validate SNPs (shown in parentheses). The missense substitutions found in this family were reported in previous studies. Insertions in IVS2+58 are, probably, two allelic variants of one STR.

The G-to-T substitution at the first nucleotide of intron 16 (IVS16+1G>T) was found to be homozygous in all affected individuals. This new mutation converts the conserved GT sequence of the splice donor site to TT. Instead, carriers showed an heterozygous state (G/T) and only the healthy individual (II.6) presented the conserved, non mutated, splice donor site sequence (fig 3).

Alternative splicing in *MERTK* mRNA

To verify the effect of the IVS16+1G>T substitution, PCR products from cDNA amplification were analyzed in agarose gels. A clear band size difference was observed between healthy (showing the expected single size band) and affected individuals, which presented a homozygous shortened form of the F1-R1 amplified fragment. Consequently, carriers presented two bands indicating heterozygosity (fig 4).

Sequencing analysis of normal and short size gel purified bands confirmed a deletion of the 110 nucleotides of exon 16 in the shorter fragment. This new nucleotide rearrangement causes a frameshift leading to the introduction of a Premature Termination Codon (PTC) in exon 17.

DISCUSSION

Haplotypic data reconstructed from the 175 analyzed SNPs revealed an RP cosegregation with the *MERTK* gene and homozygosity of *MERTK* mutation alleles in all affected individuals. This information, in agreement with gene inclusion criteria for consanguineous pedigrees, suggests that *MERTK* is the likely causative gene of arRP in this family. *MERTK* exon sequencing allowed the exclusion of the known arRP causal mutations (IVS10-2A>G; R651X; 2070delAGGAC; R722X; 2214delT and R844C), [12, 14, 16] as well as recognition of new sequence variants. The exonic changes found in this family were described by Gal *et al.* and Tada *et al.*, and considered to be nonpathogenic sequence variants. Notably, several intronic changes outlined in table 1, were not cited in the previously mentioned studies. The novel mutation, IVS16+1G>T, affects the splice donor site (GT) and

raises the hypothesis of alternative splicing of exon 16. In order to explain the splicing possibilities, three mechanisms were considered: i) retention of intron 16; ii) exon 16 skipping or iii) activation of a cryptic splice site. To verify the correct hypothesis, cDNA analysis of this region was performed involving a nested PCR. This methodology avoids non specific amplification of short mRNA isoforms and frequent aberrant splicing products originated by mutations in the exon-intron boundary. Moreover, through this PCR we have increased the final yield of product, allowing its visualisation in an agarose gel and successfully perform the subsequent sequencing reaction. Agarose gel showed the presence of a shorter band in affected individuals, in accordance with the hypothesis of a shortened form of exon 16 or an exon 16 skipping –a common event when mutations occur in splice sites promoting failures in the splicing process.[17] Further sequencing analysis of the fragments confirmed the exon 16 skipping hypothesis. In fact, similar alterations were previously reported in a wide variety of diseases.[18-20]

In this particular case, as the number of nucleotides (110) in the exon 16 is not divisible by three, the frameshift caused by exon 16 skipping introduces a PTC in exon 17. Probably, most of these altered mRNA transcripts will be degenerated through Nonsense Mediated Decay (NMD). It is most likely that the IVS16+1G>T mutation constitutes a NMD-competent mutation, thus triggering the degradation of the altered mRNAs after their translation as truncated proteins. Removal of defective mRNAs by NMD confers a protective effect to heterozygous carriers –who do not show any symptom of RP– since slight expression of the truncated proteins is insufficient to create a harmful environment to the cell.[21]

At the protein level, the IVS16+1G>T mutation disrupts the tyrosine kinase domain, which lacks more than half of its constitutive amino acids, probably resulting in an important loss of protein functionality. Besides the PTC, the loss of the KWIAIES motif[11] and the YSGDYY motif[22] –the major autophosphorylation site of MERTK– are the other

significant changes created by the frameshift. The three tyrosine residues of the YSGDY Y motif are important for the catalytic function of the protein and mutations can severely affect kinase activity. This truncated/non-functional tyrosine kinase domain could cause an incapacity to activate the MERTK protein by phosphorylation. Consequently, there is no trigger for the intracellular signaling pathway that manages the cytoskeletal changes required by RPE cell to phagocytose the shed OS [10, 23].

MERTK protein is decisive in the internalization of OS by the RPE cell [10, 24], and therefore, its absence or functionality loss would block the OS phagocytosis resulting in an accumulation of shed disks into the debris zone. Subsequent progressive degeneration of photoreceptor cell leads to the onset of RP clinical. On the other hand, the fact that most of the known *MERTK* mRNA isoforms comprise tyrosine kinase domain coding exons raises great interest in knowing whether their function or presence plays a role in the OS phagocytosis by the RPE cell. MERTK functional studies are needed to determine the role of the protein and its smaller isoforms in order to provide insight into the complex process of OS renewal and its relationship with the establishment of retinal degenerative pathologies.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: ***MERTK* structure.** The 19 coding exons and functional domains are depicted. Immunoglobulin-like C2-type (Ig-like) domains extend from residue 100 to 194 and 203 to 281; Fibronectin type III-like (FN3) from 284 to 368 and 384 to 470; Transmembrane (TM) from 502 to 524 and Tyrosine Kinase (TK) from 587 to 854 (Human Protein Reference Database; <http://www.hprd.org>). Changes in boxes represent arRP causal mutations tested in this study.

Figure 2: **Family R pedigree.** This consanguineous family, resulting from the pairing of cousins, showed an autosomal recessive inheritance pattern of RP. Black filled symbols indicate affected individuals.

Figure 3: ***MERTK* IVS16+1G>T genotypes.** Only II.6 (A) presented two non mutated *MERTK* homologous copies G/G. The others electropherograms show a heterozygosity G/T in carriers (B) and a homozygosity T/T in affected individuals (C).

Figure 4: (A) **Agarose 1.5% gel of F1-R1 amplified fragment.** Band size difference among affected (II.2, II.3 and II.14) and healthy individual (II.6) is showed. Carriers (II.5, II.9, II.12 and II.15) present two bands in agreement with heterozygosity. (B) **Agarose 1.5% gel of *ABLI*.** DNA contamination through RNA isolation process would show an 839 bp band, not appreciable in this case.

ACKNOWLEDGMENTS

We are also indebted to all members of the R family who generously contributed to this study. We wish to thank Chris Phillips (CeGen, Universidade de Santiago de Compostela) for revising the English.

FUNDING

This work was supported by Xunta de Galicia (PGIDIT06PXIB208204PR to M.J.B.) and Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2006-04562 to R.G.D.). Additional funding was provided by FUNDALUCE (2006) to R.G-D.

COMPETING INTERESTS

None declared

REFERENCES

1. Pomares E, Marfany G, Brion MJ, *et al.* Novel high-throughput SNP genotyping cosegregation analysis for genetic diagnosis of autosomal recessive retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. *Hum Mutat* 2007;**28**:511-16.
2. Young RW. The renewal of photoreceptor cell outer segments. *J Cell Biol* 1967;**33**:61-72.
3. Young RW. Shedding of discs from rod outer segments in the rhesus monkey. *J Ultrastruct Res* 1971;**34**:190-203.
4. Young RW and Bok D. Participation of the Retinal Pigment Epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol* 1969;**42**:392-403.
5. Dowling JE and Sidman RL. Inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol* 1962;**14**:73-109.

6. Herron WL, Riegel BW, Myers OE, *et al.* Retinal dystrophy in the rat-A pigment epithelial disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1969;**8**:595-604.
7. Bok D and Hall MO. The role of the Pigment Epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol* 1971;**49**:664-82.
8. LaVail MM, Sidman RL, and O'Neil D. Photoreceptor-pigment epithelial cell relationships in rats with inherited retinal degeneration: radioautographic and electron microscope evidence for a dual source of extra lamellar material. *J Cell Biol* 1972;**53**:185-209.
9. D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, *et al.* Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Genet* 2000;**9**:645-51.
10. Feng W, Yasumura D, Matthes MT, *et al.* *Mertk* triggers uptake of photoreceptor outer segments during phagocytosis by cultured Retinal Pigment Epithelial cells. *J Biol Chem* 2002;**277**:17016-22.
11. Graham DK, Dawson TL, Mullaney DL, *et al.* Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, *c-mer*. *Cell Growth Differ* 1994;**5**:647-57.
12. Gal A, Li Y, Thompson DA, *et al.* Mutations in *MERTK*, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 2000;**26**:270-71.
13. Weier HU, Fung J, and Lersch RA. Assignment of protooncogene *MERTK* (a.k.a. *c-mer*) to human chromosome 2q14.1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1999;**84**:91-92.

14. McHenry CL, Liu Y, Feng W, *et al.* MERTK arginine-844-cysteine in a patient with severe rod-cone dystrophy: loss of mutant protein function in transfected cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;**45**:1456-63.
15. Tada A, Wada Y, Sato H, *et al.* Screening of the MERTK gene for mutations in Japanese patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 2006;**12**:441-44.
16. Tschernutter M, Jenkins SA, Waseem NH, *et al.* Clinical characterisation of a family with retinal dystrophy caused by mutation in the MERTK gene. *Br J Ophthalmol* 2006;**90**:718-23.
17. Nakai K and Sakamoto H. Construction of a novel database containing aberrant splicing mutations of mammalian genes. *Gene* 1994;**141**:171-77.
18. He GS and Grabowski GA. Gaucher disease: A G⁺¹→A⁺¹ IVS2 splice donor site mutation causing exon 2 skipping in the acid beta-glucosidase mRNA. *Am J Hum Genet* 1992;**51**:810-20.
19. Sakai N, Santamarina-Fojo S, Yamashita S, *et al.* Exon 10 skipping caused by intron 10 splice donor site mutation in cholesteryl ester transfer protein gene results in abnormal downstream splice site selection. *J Lipid Res* 1996;**37**:2065-73.
20. Rottbauer W, Gautel M, Zehelein J, *et al.* Novel splice donor site mutation in the cardiac myosin-binding protein-C gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. Characterization of cardiac transcript and protein. *J Clin Invest* 1997;**100**:475-82.

21. Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, *et al.* Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet* 2004;**36**:801-08.
22. Ling L, Templeton D, and Kung HJ. Identification of the major autophosphorylation sites of Nyk/Mer, an NCAM-related receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1996;**271**:18355-62.
23. Guttridge KL, Luft JC, Dawson TL, *et al.* Mer receptor tyrosine kinase signaling: prevention of apoptosis and alteration of cytoskeletal architecture without stimulation or proliferation. *J Biol Chem* 2002;**277**:24057-66.
24. Nandrot E, Dufour EM, Provost AC, *et al.* Homozygous deletion in the coding sequence of the c-mer gene in RCS rats unravels general mechanisms of physiological cell adhesion and apoptosis. *Neurobiol Dis* 2000;**7**:586-99.

FIGURE 1

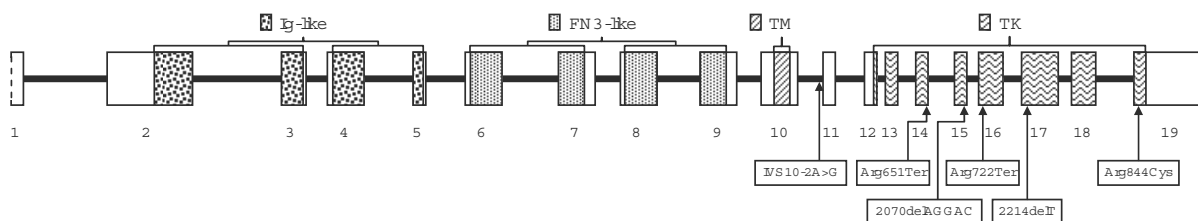


FIGURE 2

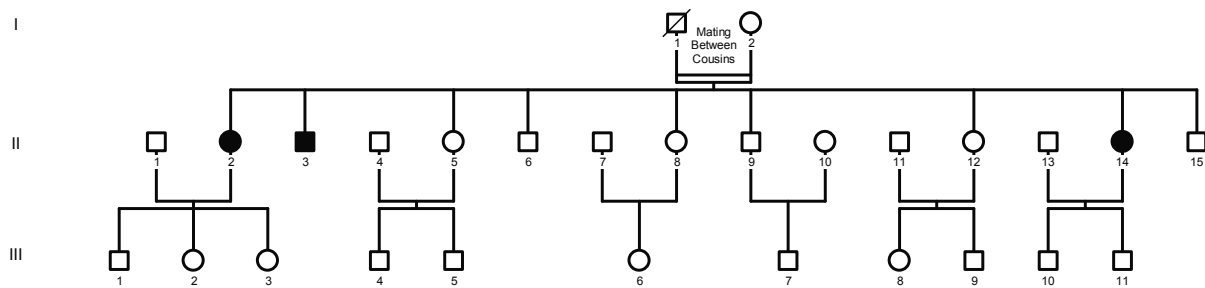


FIGURE 3

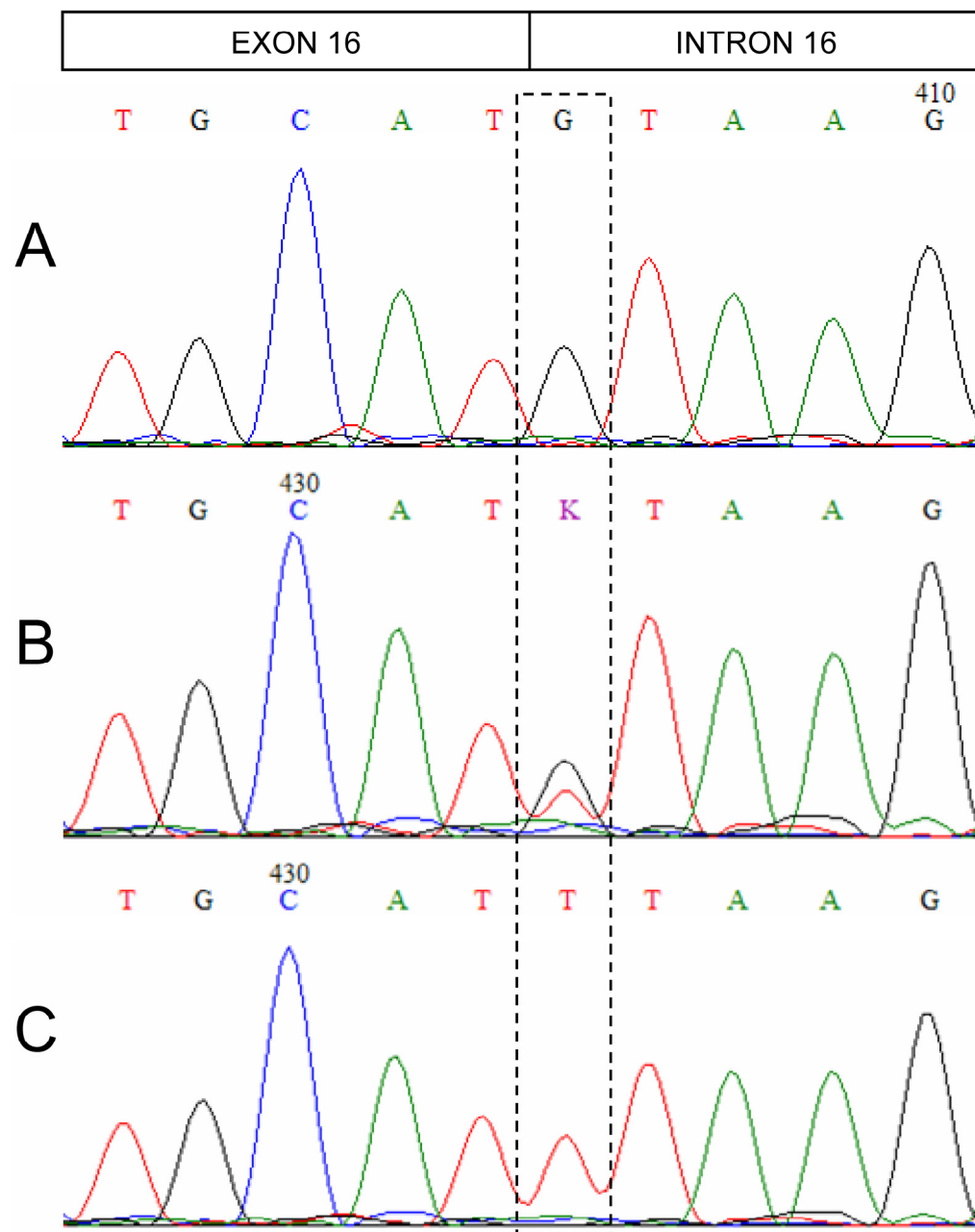
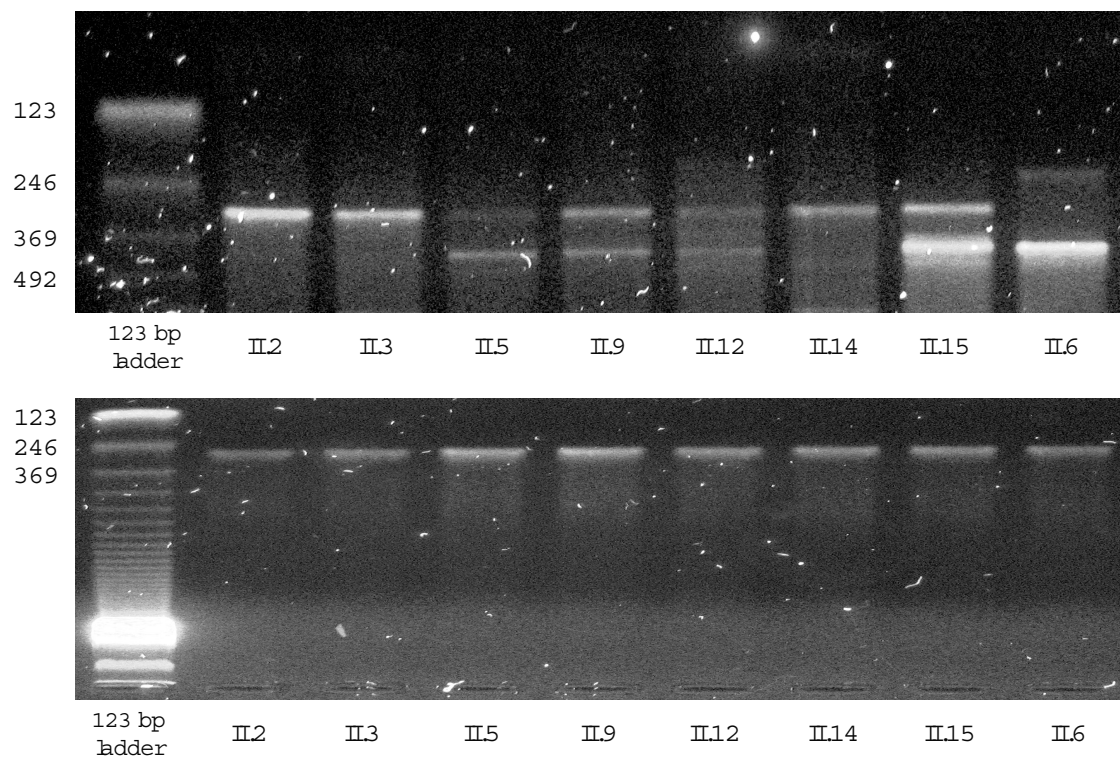


FIGURE 4



V. DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta tesis ha sido la búsqueda del gen responsable de Retinitis Pigmentaria en dos familias gallegas con distintos modos de herencia de la patología. La utilización de técnicas clásicas de descarte de genes conocidos y la búsqueda de otros nuevos –análisis de ligamiento y cosegregación– ha permitido excluir todos los loci conocidos de RP ligada al cromosoma X en la familia 68. Sin embargo, a pesar de haber localizado una extensa región con probabilidades de contener al gen responsable de RP en esta familia, no se ha conseguido acotar finamente una verdadera región de cosegregación. Por este motivo, se decidió emplear una nueva estrategia que combina el análisis de cosegregación y las técnicas *high-throughput* de genotipado de SNPs (Pomares *et al.*, 2007) para descartar varios genes de RP en esta familia. La información obtenida a partir de este sondeo evidenció la cosegregación con algunos de los genes analizados. Con la intención de poder determinar el verdadero gen causal se llevó a cabo un análisis de ligamiento de todo el genoma con 262264 marcadores. Tal procedimiento confirmó la cosegregación de algunos de los genes señalados por el anterior método, pero también identificó nuevas regiones candidatas distribuidas por varios cromosomas.

La aplicación de la misma estrategia combinada en la búsqueda del gen responsable de RP en la familia R identificó a *MERTK* como gen causal. El consiguiente análisis mutacional de este gen permitió el hallazgo de una mutación no descrita anteriormente. La nueva variante patogénica se localiza en el primer nucleótido del intrón 16 y causa el splicing alternativo del exón 16. La pérdida de este exón origina un cambio de pauta de lectura que introduce un codón de parada prematuro, dando lugar a una proteína truncada.

Búsqueda del gen responsable de RP en la familia 68

La información disponible sobre la secuencia del genoma humano en las diferentes bases de datos permite la selección de marcadores microsatélites íntimamente relacionados con la mayoría de los genes (Kondo *et al.*, 2003). De acuerdo con los principios mendelianos, cuando un marcador y un gen candidato están situados a gran distancia en el mismo cromosoma o están en cromosomas diferentes, estos segregarán de forma independiente y el marcador aparecerá con igual frecuencia en individuos afectados y no afectados de la misma familia. Si el marcador se encuentra muy próximo al gen candidato, existirá menor probabilidad de recombinación entre ellos y ambos segregarán conjuntamente (cosegregarán) en la familia. Por lo tanto, el marcador se encontrará con mayor frecuencia en los miembros de la familia afectados que en los no afectados. Si este patrón de cosegregación está presente en muchas familias o en parientes relacionados afectados, constituye evidencia de ligamiento. A través de la realización de análisis de cosegregación y ligamiento con estos marcadores, pueden excluirse muchos de los genes candidatos responsables de patologías hereditarias con alta heterogeneidad genética, como la RP.

En esta tesis doctoral, el análisis de 82 STRs y 33 SNPs distribuidos a lo largo del cromosoma X permitió descartar los 2 genes y 4 loci conocidos de XIRP y realizar la búsqueda de regiones cromosómicas susceptibles de albergar un nuevo gen responsable de RP en la familia 68. El proceso de selección de estos marcadores implicó el examen de cientos de STRs y miles de SNPs, hasta lograr encontrar aquellos que mejor se ajustasen a las condiciones requeridas para el estudio. Para ser seleccionados, estos marcadores debían poseer una alta heterocigosidad y estar localizados en las regiones establecidas para el análisis de cosegregación. Inicialmente, el parámetro de localización de los marcadores fue la distancia física. Sin embargo, había ocasiones en las que dos marcadores separados por una cierta cantidad de pares de bases flanqueaban una región con alta tasa de recombinación. En base a esta observación, se determinó cuales eran los marcadores STRs que mejor se ajustaban a la localización combinando su posición física en el cromosoma con los datos reflejados en los mapas genéticos. En la selección de los marcadores SNPs se tuvo en cuenta, además, que no perteneciesen al mismo bloque haplotípico y que la frecuencia del alelo menor no fuese inferior al 10%.

Una vez seleccionados, estos marcadores fueron amplificados y posteriormente analizados para reconocer su genotipo en cada individuo. La mayor parte de los productos de amplificación de los marcadores STRs seleccionados fueron analizados a través de electroforesis vertical en geles de poliacrilamida no desnaturizantes, permitiendo distinguir bandas con diferencias de tamaño de 4 nucleótidos. Los restantes se examinaron mediante electroforesis capilar en secuenciadores automáticos, cuya resolución permitía distinguir fragmentos en los que su tamaño variaba un único nucleótido. Los genotipos de los STRs obtenidos a partir de ambos métodos permitieron comenzar el estudio de cosegregación en esta familia.

Exclusión de loci y genes conocidos de la XIRP

El proceso de exclusión de genes/loci fue priorizado en base a la proporción de casos de RP causados por cada uno de ellos. Siguiendo esta directriz, *RPGR* y *RP2* –responsables de la mayor parte de los casos de RP ligada al cromosoma X (Daiger *et al.*, 2007)– fueron los primeros en los que se analizó la posible cosegregación. Ninguno de los marcadores escogidos para el análisis de estos genes mostró cosegregación con la RP en esta familia. Tras haber descartado a *RPGR* y *RP2*, se genotiparon los marcadores STRs de los restantes loci. *RP6* y *RP23* fueron excluidos con total seguridad, puesto que ninguno de sus marcadores cosegregaba con la patología. El locus *RP24* requiere una mención especial, ya que un primer análisis evidenció su posible cosegregación en los individuos afectados de la familia (III.3 y III.5), un hermano fallecido (III.1) y una hermana (III.9), descartando al único hermano sin hallazgos clínicos de RP (III.7). El locus *RP34* fue el último en analizarse, no por su baja frecuencia sino por que fue identificado a mediados del 2006 (Melamud *et al.*, 2006), fecha en la cual

ya habían sido analizados los otros cinco loci. Este locus, situado en la región subtelomérica del brazo largo, tampoco mostró cosegregación con RP en esta familia.

Con la información obtenida hasta este momento, la búsqueda del gen causal se centró en el acotamiento fino del locus RP24 con nuevos marcadores STRs, ya que un posible evento de doble recombinación en el interior de la región podría descartar al individuo III.1. Los datos de genotipado de los STRs analizados en RP24 mostraron que III.1, III.3, III.5 y III.9 compartían el mismo haplotipo, –totalmente diferente al de III.7– no existiendo ninguna doble recombinación interna (Tabla 22). Si bien es cierto que III.9 podría ser una portadora asintomática –confirmando el patrón de herencia ligado al X de esta patología–, se ha descartado que este locus fuese el responsable de RP debido a que la información obtenida sobre III.1 sugiere que no estaba afectado. Sin embargo, su temprano fallecimiento (a los 40 años) y la falta de informes clínicos que aseguren que no padecía RP, no permiten descartar con absoluta certeza esta aparente cosegregación. El comienzo tardío de la sintomatología de RP en esta familia y la diferente apreciación de los síntomas en cada individuo, podrían haber ocultado la RP en III.1. Por esta razón, existen dudas razonables sobre la responsabilidad de RP24 en la familia 68. De todas formas, para la realización de este estudio se ha considerado que III.1 no estaba afectado de RP.

Búsqueda de un nuevo locus en el cromosoma X

Tal aseveración derivó en que las siguientes fases del análisis de cosegregación estuviesen dirigidas a encontrar la posible región candidata. La metódica búsqueda de esta región se hizo en dos fases: la primera consistió en el escrutinio de la práctica totalidad del brazo largo del cromosoma X, mientras que la segunda examinó el brazo corto. El extenso tamaño del brazo largo propició que la primera fase fuese dividida en cuatro etapas. En la primera etapa se analizó la región subtelomérica. Los datos genotípicos de los STRs analizados en esta región mostraron que III.3, III.5 y III.7 compartían el mismo haplotipo en el STR más distal (DXS1073) pero no en los más proximales. Por lo tanto, esta región fue excluida a partir de DXS1073. Los haplotipos de los otros dos STRs eran iguales en III.1, III.3 y III.5 por lo que también se descartó esa región (considerando que III.1 no era un individuo afectado). En la segunda etapa, se analizó una región considerablemente grande del brazo largo que se extendía desde las cercanías del centrómero hasta el locus RP24 (~55,42 Mb). La mayoría de los STRs seleccionados en esta región cromosómica resultaron ser no informativos. La posibilidad de que la madre de estos individuos fuese homocigota para los marcadores de esta región impidió la exclusión de la cosegregación. Sin embargo, DXS6800 reveló un punto de recombinación en el individuo III.3 permitiendo descartar la región más próxima al centrómero. En la tercera etapa, se ampliaron los límites laterales de la región anterior y se introdujeron nuevos STRs intercalados con los ya analizados. El marcador DXS986 confirmó la recombinación en el individuo III.3. Al igual que

había sucedido en la etapa anterior, la mayor parte de los STRs no aportaron ninguna información, por lo que no se pudo descartar la cosegregación de la región. En la cuarta y última etapa, se volvió a analizar esta región ampliando el extremo 3' y empleando nuevos STRs distribuidos por toda su extensión. Ninguno de los 15 STRs genotipados resultó informativo, impidiendo la exclusión de esta gigantesca región cromosómica (~56,80 Mb).

La segunda fase se centró en la búsqueda de la región candidata en el brazo corto del cromosoma X. Las primeras tres megabases no fueron analizadas porque se evitó la selección de STRs dentro de la región pseudoautosómica homóloga al cromosoma Y. Los haplotipos de los STRs analizados en esta segunda fase mostraron una recombinación subtelomérica en el individuo III.5 que llegaba hasta DXS996. Por lo tanto, esta región fue descartada. No se seleccionó ningún STR que estuviese localizado dentro de la región pseudoautosómica, por eso no se analizaron las tres primeras megabases del cromosoma. Además, los marcadores DXS988 y DXS991 –localizados en la región pericentromérica– presentaban el mismo haplotipo en III.5 y III.7, lo que permitió la exclusión de esta región cromosómica.

En un intento por encontrar mayor información para la búsqueda de la región candidata, se recurrió al uso de un décaplex de STRs del cromosoma X diseñados por el IPATIMUP. Los datos obtenidos del análisis de estos diez marcadores no aportaron información relevante para la búsqueda de la región candidata. Sin embargo, en el brazo largo confirmaron la recombinación pericentromérica de III.3 y afinaron el punto de corte de la recombinación subtelomérica de III.3 y III.5, proporcionando mayor solidez a los haplotipos.

El genotipado de los 82 marcadores STRs realizado hasta este punto de la investigación permitió la exclusión de los 6 loci del cromosoma X, pero no logró definir una región de cosegregación con la RP en esta familia. La continuidad de la búsqueda del gen responsable implicaba el análisis de regiones cromosómicas de considerable extensión localizadas entre los marcadores STRs informativos. Sin embargo, la selección de nuevos marcadores microsatélites dentro de estas regiones resultaba realmente complicada. Muy pocos se ubicaban en las zonas interesantes para el análisis de cosegregación y los que sí lo hacían, poseían una heterocigosidad tan baja que se corría el riesgo de que no aportaran ninguna información. Se necesitaban, entonces, marcadores que ofreciesen gran informatividad y estuviesen presentes en elevado número, adaptándose a las posiciones establecidas para el análisis de cosegregación. Ambas condiciones eran cumplidas por los marcadores SNPs, motivo por el cual fueron empleados para el escrutinio de estas regiones con la intención de excluirlas. Además, aunque los SNPs aportan menor información que los STRs, su mayor frecuencia en el genoma (Kruglyak y Nickerson, 2001) los convierte en una herramienta muy útil a la hora de acotar el límite de una recombinación. Las 8 regiones seleccionadas para ser analizadas con SNPs se encontraban distribuidas a lo largo del cromosoma. El análisis de la primera región (región I) –localizada entre los marcadores DXS996 y DXS1223– acotó finamente el límite de la recombinación subtelomérica del individuo III.5, pero no reveló cosegregación con RP. Esta región fue, por lo tanto,

descartada. La región II –limitada por DXS1224 y DXS7163– mostró el mismo haplotipo en los individuos III.1, III.3, III.5 y III.7 permitiendo su exclusión. Exactamente lo mismo sucedía en la región III –flanqueada por DXS1226 y DXS9896– por lo que también fue excluida. La región IV se localizaba entre el último marcador utilizado para descartar al locus RP6 (DXS9907) y el primero de RPGR (DXS6679). El haplotipo construido con los datos obtenidos a partir del análisis de los 82 STRs (Tabla 22) mostraba una doble recombinación en el individuo III.5 que se iniciaba en DXS9907 y llegaba hasta DXS7423. Este hallazgo, junto con la baja probabilidad de encontrar un nuevo locus en esta región (Ott *et al.*, 1990), permitieron su exclusión sin necesidad de ser analizada con los SNPs. La región V –definida entre DXS1068 y DXS988– confirmó la recombinación en el individuo III.5, descartando a esta región. La región VI estaba delimitada por DXS7132 y DXS6800 e incluía 5 STRs no informativos. Los haplotipos de estos 7 marcadores eran distintos en III.3 y III.5, por lo que se pudo excluir esta región antes de proceder con su análisis. La región VII –definida por DXS986 y DXS1002– acotó la recombinación del individuo III.3. Sin embargo, todos los SNPs analizados fueron no informativos, al igual que lo habían sido anteriormente muchos de los STRs empleados en el análisis de esta región. Como consecuencia, esta región no pudo ser descartada. Por último, la región VIII –flanqueada por DXS8045 y DXS7423– no fue analizada puesto que los datos obtenidos redundarían en la evidente falta de cosegregación, siempre y cuando III.1 se considere un individuo no afectado.

En definitiva, tras el escrutinio de la práctica totalidad del cromosoma X con 82 STRs y 33 SNPs, no se ha conseguido identificar una región cromosómica exclusivamente compartida por los dos hermanos afectados. Por el contrario, si se ha determinado una gran región en el brazo largo que no puede ser excluida debido a la falta de informatividad de los marcadores empleados en su análisis. Aparentemente, en esta familia no parece existir ninguna región de cosegregación con RP en el brazo corto del cromosoma X. El centrómero fue descartado como región candidata por su prácticamente nula probabilidad de recombinación (Mahtani y Willard, 1998).

Análisis de genes responsables de arRP en la familia 68

La dificultad que supuso identificar una clara región de cosegregación en el cromosoma X de los individuos afectados cuestionó el modo de herencia de la RP en la familia 68. La simple observación del pedigree no permitía descartar con absoluta certeza la posibilidad de que, en vez de tratarse de una forma de RP ligada al cromosoma X, esta familia presentase un modo de herencia autosómico recesivo en el que casualmente solo han resultado afectados algunos de los miembros varones. La consanguinidad en primer grado había sido descartada tras la entrevista familiar. No obstante, era muy probable que los individuos de esta familia tuviesen un grado de parentesco relativamente lejano, ya que pertenecían a un núcleo de población reducido y los matrimonios solían

establecerse con gentes del lugar. Por esta razón, se decidió analizar a esta familia para descartar que no estuviese ligada a alguno de los genes responsables de las formas autosómicas recesivas de la RP.

El proceso de exclusión de los genes conocidos de arRP en una familia implica el análisis de más de 320 exones, lo que se traduce en la secuenciación de más de 100 Kb (Pomares *et al.*, 2007). Por lo tanto, el descarte de genes de arRP para realizar un correcto diagnóstico molecular se convierte en una tarea sumamente compleja que consume una gran parte de los recursos técnicos y humanos del laboratorio. El desarrollo de las tecnologías de genotipado de SNPs (*high-throughput SNP multiplexing*) ha supuesto un nuevo método de aproximación a semejante problema. En los últimos años, la utilización de arrays para analizar y descartar genes asociados a diferentes patologías ha sido una práctica habitual entre los diversos grupos de investigación (Jaakson *et al.*, 2003; Zernant *et al.*, 2005; Yzer *et al.*, 2006; Cremers *et al.*, 2007). La mayoría de estos arrays se centran en el análisis de las variaciones de secuencia patogénicas conocidas de los genes a estudio. Sin embargo, el desconocimiento de todas las mutaciones causales y la elevada heterogeneidad genética que presenta la RP implica un complicado, y a menudo no definitivo, diagnóstico molecular (Kondo *et al.*, 2003).

La utilización combinada de las técnicas *high-throughput* de genotipado de SNPs y el análisis de cosegregación ha proporcionado una nueva estrategia para la identificación o exclusión de genes responsables de arRP en las familias afectadas (Pomares *et al.*, 2007). Para tal efecto, este grupo diseñó un array con el que se analizaban 22 genes, 17 de los cuales eran responsables de arRP (*ABCA4*, *CERKL*, *CNGA1*, *CNGB1*, *CRB1*, *LRAT*, *MERTK*, *NR2E3*, *PDE6A*, *PDE6B*, *RGR*, *RHO*, *RLBP1*, *RPE65*, *SAG*, *TULP1*, *USH2A*), aunque cuatro de ellos también causaban arLCA (*CRB1*, *LRAT*, *RPE65* y *TULP1*). Los cinco restantes eran exclusivos de arLCA (*AIPL1*, *CRX*, *GUCY2D*, *RPGRIP1* y *RDH12*). Cada uno de estos genes era analizado con 4 SNPs situados en las regiones *upstream*, intragénica y *downstream* del gen. Estos SNPs habían sido previamente seleccionados por su alta informatividad (frecuencia del alelo menor superior a 0,35), por su cercana localización al gen y por pertenecer a diferentes bloques haplotípicos. La posición de los SNPs y la distancia genética existente entre ellos y el gen era esencial para su selección, puesto que con ello se evitaba que posibles eventos de recombinación pasasen desapercibidos. La gran proximidad al gen candidato que mostraban los SNPs seleccionados fortalecía las inferencias del análisis de cosegregación, mejorando la información genética ofrecida por los microsatélites que en muy pocas ocasiones podían localizarse tan cercanos al gen analizado.

Los genotipos obtenidos del análisis de estos SNPs en las plataformas *high-throughput* fueron utilizados para la reconstrucción del haplotipo de cada individuo, esenciales para la realización del análisis de cosegregación. A diferencia de los arrays anteriores, el array diseñado por Pomares *et al.* no analiza variantes de secuencia patogénicas en los genes estudiados, sino que se utiliza para mostrar la cosegregación de estos genes con la arRP. Esto garantiza que aunque el gen presente una nueva mutación, el array podrá detectar su cosegregación y lo identificará como el gen responsable de la

arRP. Para reconocer la nueva mutación causal el gen tendrá que ser secuenciado en toda su extensión, incluyendo los límites intrón-exón.

El genotipado de los 88 SNPs analizados por este array en los individuos de la familia 68 permitió la reconstrucción de los correspondientes haplotipos y el consiguiente análisis de cosegregación. Los criterios establecidos por Pomares *et al.* para la inclusión de un gen analizado con este array, requerían su cosegregación con la RP o la falta de informatividad de sus SNPs. Todos aquellos genes que no cumplían estas condiciones eran descartados como genes responsables de RP en la familia estudiada. Siguiendo estos criterios, de los 22 genes analizados con este array en la familia 68, solo 18 pudieron ser excluidos por no presentar cosegregación con la RP. A pesar de no haber podido obtener los genotipos de los SNPs hCV8211028, hCV11231355 y hCV2407262, el análisis de cosegregación resultó perfectamente válido ya que la informatividad de los otros tres SNPs analizados en cada gen permitió descartar los genes *RPGRIP1*, *RHO* y *LRAT* con total seguridad.

USH2A, *CNGBI*, *CNGAI* y *TULPI* no pudieron ser descartados por mostrar cosegregación con RP. En el caso de *CNGBI*, se detectó una recombinación afectando al SNP más distal de una de las copias de este gen en el individuo III.3. Este hallazgo no afectó al análisis de cosegregación, puesto que los otros tres SNPs con los que se analizaba este gen aportaban la información suficiente para confirmar su aparente cosegregación con la RP.

Aunque el análisis de cosegregación reveló cuatro posibles candidatos, hay que tener en cuenta la posibilidad de que esta cosegregación sea espúrea y esté enmascarando la identidad del verdadero gen responsable de RP en esta familia. De estos cuatro genes, *USH2A* es el que posee mayor número de exones (72), seguido de *CNGBI* (33), *TULPI* (15) y *CNGAI* (8). Además, también es el que representa el porcentaje más alto de casos de arRP (10%), por delante de *CNGBI* (4%), *CNGAI* (2,3%) y *TULPI* (1%) (Hartong *et al.*, 2006; Daiger *et al.*, 2007).

Análisis de ligamiento de todo el genoma

El relativamente alto número de genes de arRP no descartados con el array, junto con la imposibilidad de exclusión de la gran región del cromosoma X y la posible implicación de RP24 como locus candidato, justificaron el posterior análisis de ligamiento de todo el genoma con la intención de determinar la región exacta de cosegregación de la RP en la familia 68. Los análisis de ligamiento genético han resultado ser una excelente herramienta para la identificación de nuevos genes responsables de enfermedades genéticas. Pero, además, también son esenciales para el diagnóstico molecular de enfermedades causadas por genes conocidos cuando existen más de dos loci candidatos (Kondo *et al.*, 2003). El análisis de ligamiento es una técnica estadística utilizada para encontrar la localización aproximada de un gen candidato en relación a un mapa constituido por marcadores con localizaciones conocidas (Almgren *et al.*, 2003). Esta técnica se basa en buscar evidencia de

co-segregación entre el gen candidato y alguno de los marcadores, aportando información acerca de su posible localización en el cromosoma. Para calcular la significación del ligamiento se utiliza una medida estadística conocida como LOD (*Logarithm of the Odds*). Un valor de LOD superior a 3,0 indica que las probabilidades a favor del ligamiento entre el marcador y la región candidata son 1.000 veces superiores a las del no ligamiento. Valores de LOD inferiores a -2 excluirían el ligamiento. En el cromosoma X, valores de LOD superiores a 2 se consideran suficientes para determinar ligamiento entre dos loci.

Hasta hace poco tiempo, la ejecución de un análisis de ligamiento se prolongaba –dependiendo del número de marcadores y cantidad de individuos analizados– durante varias semanas o meses. Sin embargo, la aparición de las tecnologías de genotipado *high-throughput* de SNPs ha revolucionado este campo. De los diferentes tipos de marcadores que se pueden utilizar en los estudios de ligamiento, los SNPs son los de primera elección debido a su abundancia y distribución por todo el genoma, su estabilidad al no presentar una alta tasa de mutación y su relativa facilidad de genotipado (Wang *et al.*, 1998). Varios autores han confirmado la validez de los SNPs para este tipo de estudios tras comparar los datos obtenidos de un mismo análisis de ligamiento efectuado con STRs y SNPs y observar que ambos conducían a similares resultados (John *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005a; Wang *et al.*, 2005b). Hoy en día, la utilización de las tecnologías *high-throughput* posibilita la obtención del genotipo de cientos de miles de SNPs en solo unas horas, facilitando enormemente la consecución de los estudios de ligamiento. El número de SNPs a genotipar en estos estudios de ligamiento de todo el genoma dependerá del tipo de patología, del grupo poblacional o del número de muestras estudiadas.

En esta tesis doctoral, se ha utilizado el *GeneChip® Human Mapping 250K NspI Array* como soporte para el genotipado de SNPs. Este array supone un paso intermedio entre los inicialmente diseñados para el análisis de 10000 y 100000 SNPs, y los de última generación con capacidad para analizar cerca de 1000000 de SNPs.

La enorme dificultad que supuso examinar los datos genotípicos de los 262264 marcadores analizados con el array NspI se solventó mediante la utilización del software easyLinkage v5.08 (Hoffmann y Lindner, 2005). A través de esta *suite* informática se combinaron los genotipos generados por el array NspI, la información del pedigree, las posiciones genéticas de cada SNP y sus frecuencias en población caucásica, con el fin de generar los archivos requeridos para correr los programas de análisis de ligamiento. Antes de proceder con ningún cálculo, se realizó un cribado de los datos para eliminar los errores que podrían interferir negativamente en el proceso, proporcionando falsa información sobre la región de ligamiento o reduciendo significativamente los valores de LOD (Chang *et al.*, 2006; Middeldorp *et al.*, 2007). En primer lugar, se desecharon los SNPs que no habían sido genotipados (*blanks*) y aquellos cuyo *call rate* era inferior al 95%. Tras ello, se descartaron los que presentaban errores mendelianos y no mendelianos. En un paso posterior, se identificaron los SNPs no informativos y se eliminaron o se conservaron dependiendo del tipo de análisis de ligamiento que se iba a efectuar. Finalmente, tras el cribado de los datos, de los 262264 SNPs genotipados por el

array NspI solo 148263 (56,53%) fueron utilizados en el análisis de ligamiento *Two-point*. El hecho de que todos los marcadores estuviesen en equilibrio Hardy-Weinberg indicaba una gran calidad de los datos, puesto que se asumía que las altas tasas de errores de genotipado generaban desequilibrio (Hosking *et al.*, 2004).

Análisis de ligamiento paramétrico *Two-point*

Este procedimiento se caracteriza por analizar el ligamiento entre dos loci, generalmente un gen candidato y un marcador. Si estos dos loci muestran un perfecto ligamiento siempre serán transmitidos conjuntamente durante la meiosis y su frecuencia de recombinación (θ) será igual a 0. Sin embargo, si no presentan ligamiento se transmitirán independientemente y su θ será de 0,5. La probabilidad de ligamiento sobre un intervalo de fracciones de recombinación puede medirse y expresarse en una escala logarítmica para producir un valor de LOD (\log_{10} de las probabilidades). Este sería el resultado de dividir la probabilidad que habría surgido de los datos si los loci estuviesen ligados ($\theta < 0,5$) entre la probabilidad que habría surgido de los datos si los loci no lo estuviesen ($\theta = 0,5$). El valor de θ que proporciona el mayor valor de LOD (Z_{\max}) es el mejor estimador del grado de ligamiento entre dos loci (Kaufman y Aim, 2003).

Tras el análisis *Two-point* realizado en la familia 68, aquellas regiones cuyos marcadores poseían valores de LOD superior a 0,9 en cromosomas autosómicos o 0,7 en cromosoma X fueron consideradas como regiones de interés (Tabla 24). Ninguna de ellas pudo ser designada como el locus candidato por los bajos valores de LOD obtenidos en el análisis (no llegaban a superar el 1). Sin embargo, dos de estas regiones destacaban de entre las otras, pues una de ellas contenía al gen *USH2A* y la otra contenía al locus RP24. No se encontró ligamiento con ninguna región que contuviese a *CNGB1*, *CNGA1* o *TULP1*. Por el contrario, si existía cierta evidencia de ligamiento (LOD < 1) con regiones que contenían genes relacionados con patologías degenerativas de la retina como *IMPDH1* (responsable de adRP) o *CNGB3* (responsable de acromatopsia y de una forma dominante de distrofia progresiva de los conos, PCOD). Aunque esta observación fue considerada como el efecto de una cosegregación espúrea, algo normal debido al pequeño tamaño de la familia y el gran número de marcadores analizado. También se pudo constatar el relativamente alto valor de LOD para 6 SNPs puntuales: SNP_A-1865603, SNP_A-4199763, SNP_A-2085919, SNP_A-2309186, SNP_A-1801704 y SNP_A-2016342.

Cuando el análisis de ligamiento se realiza con una única familia, es muy probable que se definan varias regiones cromosómicas de especial interés o que, en caso de encontrar una única región, esta contenga una gran cantidad de genes (Dryja y Berson, 1995). Cada uno de estos genes deberá ser individualmente analizado en busca de variaciones de secuencia, con la consiguiente carga de trabajo y consumo de recursos del laboratorio. No obstante, las variaciones en el DNA no son raras y pueden

encontrarse en una considerable proporción de los genes analizados. Solo una de estas variaciones de secuencia será la responsable de la RP y, obligatoriamente, debe cosegregar con RP en la familia analizada. Sin embargo, todas las variaciones de secuencia encontradas cosegregan con RP puesto que se encuentran en la región de cosegregación definida por el análisis de ligamiento, dificultando todavía más la identificación del gen responsable de RP.

Los resultados obtenidos del análisis de ligamiento *Two-point* llevado a cabo sobre la familia 68 no aportaban la información requerida para descartar muchas de las regiones y SNPs que habían mostrado cierto ligamiento. Por lo tanto, se decidió continuar el estudio realizando un análisis de ligamiento *Multipoint* con la esperanza de poder descartar la mayoría de las regiones de interés.

Análisis de ligamiento paramétrico *Multipoint*

Generalmente, el análisis de ligamiento *Two-point* es utilizado como primera aproximación para el análisis de los datos genotípicos (Almgren *et al.*, 2003). Tras ello, se realiza un análisis *Multipoint* que emplea múltiples marcadores de forma simultánea con el fin de extraer la máxima información posible de los datos. El análisis *Multipoint* considera las posiciones de los marcadores como fijas y varía la ubicación del locus candidato a lo largo del mapa. Para cada tentativa de posición del locus, se calcula una probabilidad multilocus y se compara con la probabilidad multilocus de una posición no ligada. Por lo tanto, el análisis de ligamiento *Multipoint* requiere una gran cantidad de cálculos que son realizados por ordenadores. La complejidad computacional de este análisis se incrementa de forma lineal con respecto al número de individuos y de forma exponencial en relación al número de marcadores empleados.

Una ventaja del análisis *Multipoint* sobre el *Two-point*, radica en que en el primero el problema de la homocigosidad de los marcadores no es tan devastador como en el segundo (Almgren *et al.*, 2003). En el análisis *Multipoint*, los marcadores próximos proporcionan una información que no está disponible en el *Two-point*. Por esta razón, no es recomendable eliminar los SNPs no informativos para realizar el análisis *Multipoint*. Consecuentemente, los 95831 (36,54%) SNPs no informativos identificados durante el cribado de los datos fueron incluidos en el análisis de ligamiento *Multipoint* efectuado sobre las regiones de interés definidas por el análisis *Two-point*. Otra ventaja del análisis *Multipoint* es que proporciona información acerca de los entrecruzamientos que habrían podido producirse en ambos lados del locus candidato. Sin embargo, la principal desventaja del método multipunto es su gran sensibilidad a la incorrecta especificación del modelo genético de la enfermedad (Almgren *et al.*, 2003).

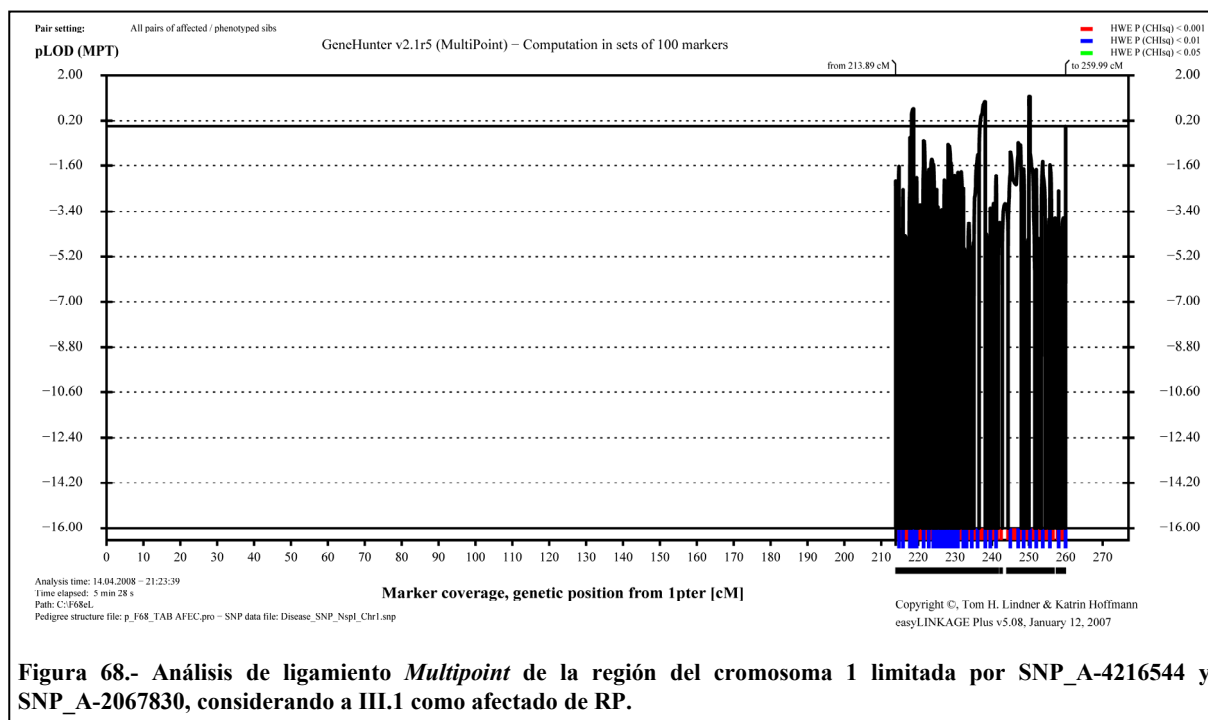
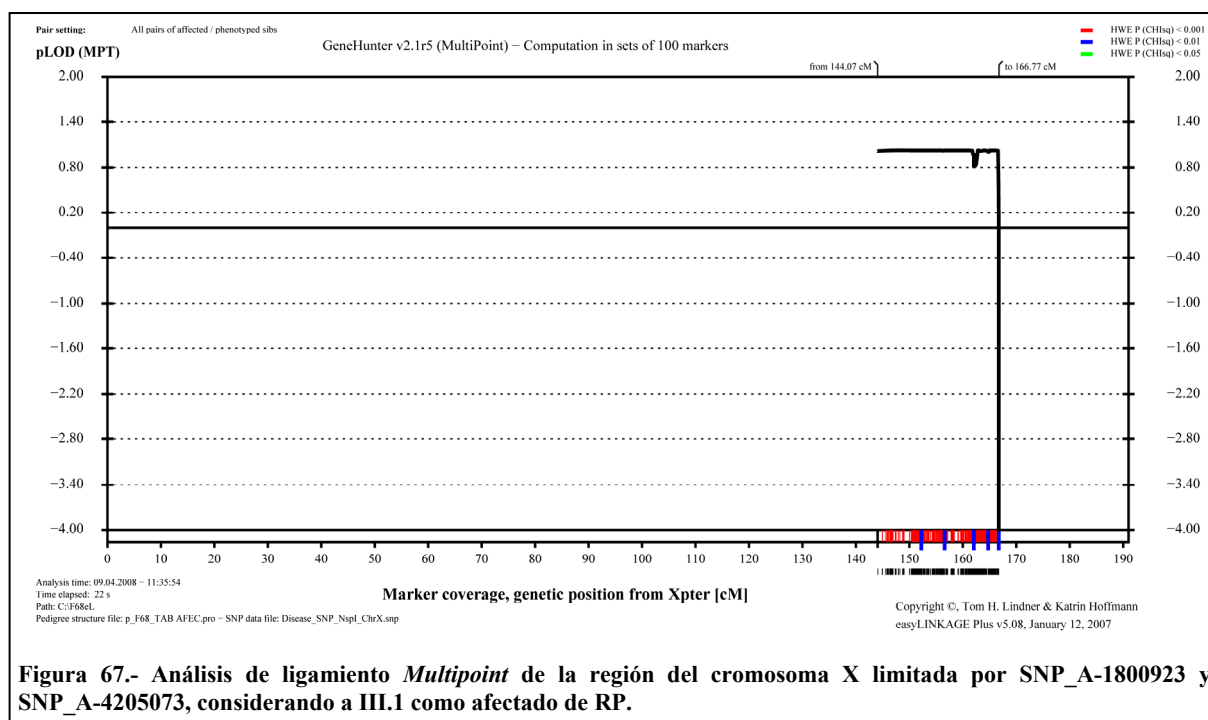
El elevado número de marcadores SNPs genotipados en el array NspI ocasionó un notable incremento de la complejidad computacional del análisis *Multipoint*. Por esta razón, este análisis se limitó a las regiones de interés previamente definidas por el *Two-point*. Aunque los valores de LOD

obtenidos con el *Multipoint* fueron ligeramente superiores a los conseguidos con el *Two-point*, ninguno de los marcadores analizados mostraba un valor superior a 3, impidiendo demostrar estadísticamente el ligamiento con algún locus de RP. El estudio *Multipoint* reveló como se acotaban subregiones dentro de las regiones de interés analizadas (Tabla 25) o como estas eran excluidas al disminuir drásticamente el valor de LOD por debajo del límite de -2. Al igual que se había establecido para el análisis *Two-point*, las regiones delimitadas por marcadores con valores de LOD superior a 0,9 en cromosomas autosómicos o 0,7 en cromosoma X fueron consideradas como regiones con probabilidad de contener al gen candidato.

El análisis *Multipoint* descartó ligamiento con el SNP del cromosoma 3 (Figura 46) y con la inmensa mayoría de los marcadores de la región de interés del cromosoma X, que se redujo a una región con dos únicos SNPs (LODs 1,0244 y 1,0168, respectivamente) separados por ~1200 pb, ambos localizados fuera del locus RP24 (Figura 66). Los valores de LOD alcanzados por el SNP_A-2085919 (Figura 61) y el SNP_A-2309186 (Figura 62) del cromosoma 15 no facilitaron su exclusión puesto que no superaban el límite de -2. Los bajos valores de LOD obtenidos para los marcadores de la región que contenía a *USH2A* no permitieron confirmar estadísticamente el ligamiento, aunque si fueron lo suficientemente altos para evitar su exclusión.

Sin olvidar que cualquiera de las otras regiones identificadas podía contener un gen de RP no descrito hasta el momento, se decidió –en base a la posibilidad de que esta familia estuviese verdaderamente afectada por una forma de XIRP– realizar un nuevo estudio en las regiones que contenían a *USH2A* y el locus RP24. Sin embargo, para este nuevo análisis *Multipoint* se consideró al individuo III.1 como afectado, respaldando la suposición de que la familia 68 estaba ligada al locus RP24. La información obtenida a partir del array de genes de arRP no pudo confirmar si este individuo estaba realmente sano, lo que habría descartado con absoluta seguridad que RP24 era el locus responsable de RP en esta familia. El análisis realizado bajo estas condiciones, mostró que los marcadores del locus RP24 aumentaban sus valores de LOD hasta 1,0280 (Figura 67), mientras que la gran mayoría de los de la región que contiene a *USH2A* descendían hasta valores muy negativos (Figura 68). Esta última región presentaba tres picos en la gráfica de LOD, pero ninguno de ellos se correspondía con la localización física de *USH2A*. Por lo tanto, este segundo análisis *Multipoint* descartaba a la región que contiene a *USH2A* y confirmaba a la que contenía a RP24 como la región con mayor probabilidad de contener al gen candidato.

El análisis inicial del cromosoma X con 82 marcadores STRs y otros 33 SNPs, seguido del cribado de 22 genes con el array de arRP y, por último, el análisis de ligamiento realizado con 262264 SNPs, no han logrado identificar con la suficiente consistencia la región susceptible de contener el gen responsable de RP en la familia 68.



Búsqueda del gen responsable de RP en la familia R

Durante el transcurso del complicado estudio de la familia 68 se comenzó el análisis paralelo de una familia consanguínea afectada por una forma recesiva de RP. El claro modo de herencia mostrado en el pedigree de la familia R sugería la utilización del array diseñado por Pomares *et al.* como estrategia de primera elección para comenzar la búsqueda del gen responsable (Pomares *et al.*, 2007). Dicha estrategia representaba una vía rápida y efectiva para reducir el número de genes candidatos sobre los que había que realizar el análisis mutacional. De esta forma, se evitaba el largo y lento proceso de exclusión de genes responsables de arRP a través de análisis de cosegregación o de ligamiento realizados con marcadores polimórficos.

Mientras que la familia 68 fue analizada con la versión final del array para la plataforma MassARRAY, el cribado de genes de arRP en la familia R se realizó con la versión diseñada para la plataforma SNPlex. Este modelo de array examinaba 21 genes –*RDH12* se analizaba exclusivamente con el de MassARRAY– mediante el genotipado de 175 SNPs, 84 de los cuales fueron escogidos para constituir la versión final del array. Ambos diseños de array demostraron ser totalmente válidos para la exclusión de los genes analizados.

Los haplotipos reconstruidos a partir del genotipado de los 175 SNPs (Tabla 1 Anexo) reflejaron la evidente cosegregación de la RP con el gen *MERTK* y la patente homocigotidad de las copias de este gen en todos los individuos afectados de la familia R (Tabla 26). De acuerdo con los criterios de inclusión de genes establecidos por Pomares *et al.* para las familias consanguíneas, estas dos observaciones señalaron a *MERTK* como el probable gen responsable de arRP en esta familia. En el año 2000, Gal *et al.* habían demostrado como mutaciones en *MERTK* implicaban la alteración de la actividad fagocítica de las células del RPE, causando la instauración de RP en humanos (Gal *et al.*, 2000). Por lo tanto, debía realizarse un análisis mutacional de *MERTK* con el ánimo de obtener el diagnóstico molecular de la RP en la familia R.

Tabla 26.- Genotipos de los SNPs analizados en el gen <i>MERTK</i> con el array de la plataforma SNPlex.											
SNP											POSICIÓN
	II.2	II.3	II.5	II.6	II.12	II.14	II.15				
rs13016143	G G	G G	G G	A G	G A	G G	G A	G A	G A	112365943	
rs11683409	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	112486605	
rs6722814	G G	G G	G A	A A	G A	G G	G A	G A	G A	112527553	
rs10182333	G G	G G	G A	A A	G A	G G	G A	G A	G A	112558327	
rs12618637	T T	T T	T G	G G	T G	T T	T G	T G	T G	112615909	
rs2254860	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	112712281	
rs1996328	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	112775887	

Análisis mutacional del gen *MERTK*

El análisis mutacional efectuado sobre el gen *MERTK* consistió en la secuenciación de sus 19 exones –incluyendo las regiones limítrofes exón-intrón– con la intención de descartar las mutaciones causales de RP descritas hasta el momento y buscar nuevas variantes de secuencia. El hecho de que todas las mutaciones causales conocidas (IVS10-2A>G; R651X; 2070delAGGAC; R722X; 2214delT y R844C) se situasen dentro o cerca de las regiones codificadoras del dominio tirosín kinasa (Gal *et al.*, 2000; McHenry *et al.*, 2004; Tschernutter *et al.*, 2006) motivó que la secuenciación empezase por los últimos exones del gen. Los resultados obtenidos permitieron la exclusión de las mutaciones causales anteriormente citadas, así como el reconocimiento de 28 variantes de secuencia: tres cambios no sinónimos (Ser118Asn, Arg466Lys y Ile518Val), dos cambios sinónimos (Asn498Asn and Ser627Ser), un cambio en la región *upstream* y 22 cambios intrónicos (Tabla 1 del manuscrito). Todos los cambios nucleotídicos encontrados en los exones del gen *MERTK* de esta familia habían sido previamente descritos y considerados como variantes no patogénicas (Gal *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2006). Por el contrario, algunos de los cambios intrónicos identificados no eran mencionados en los estudios de estos autores, aunque casi todos figuraban en las bases de datos como polimorfismos SNPs (con la excepción de IVS8-91G>A, IVS13+104G>A y IVS17-103G>T). La secuenciación de *MERTK* también evidenció una inserción TTTATTTATTTA en el intrón 2 –previamente identificada por Tada *et al.* (Tada *et al.*, 2006)–, aunque el hallazgo de la inserción TTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTA en la misma región sugería la posibilidad de que ambas fuesen variantes alélicas de un STR tetramérico (TTTA).

Sin duda, el cambio intrónico más importante de entre los identificados por el análisis mutacional de *MERTK* en la familia R –y el único potencialmente patogénico– es la transversión de una G por una T en el primer nucleótido del intrón 16.

Efecto de la mutación IVS16+1G>T

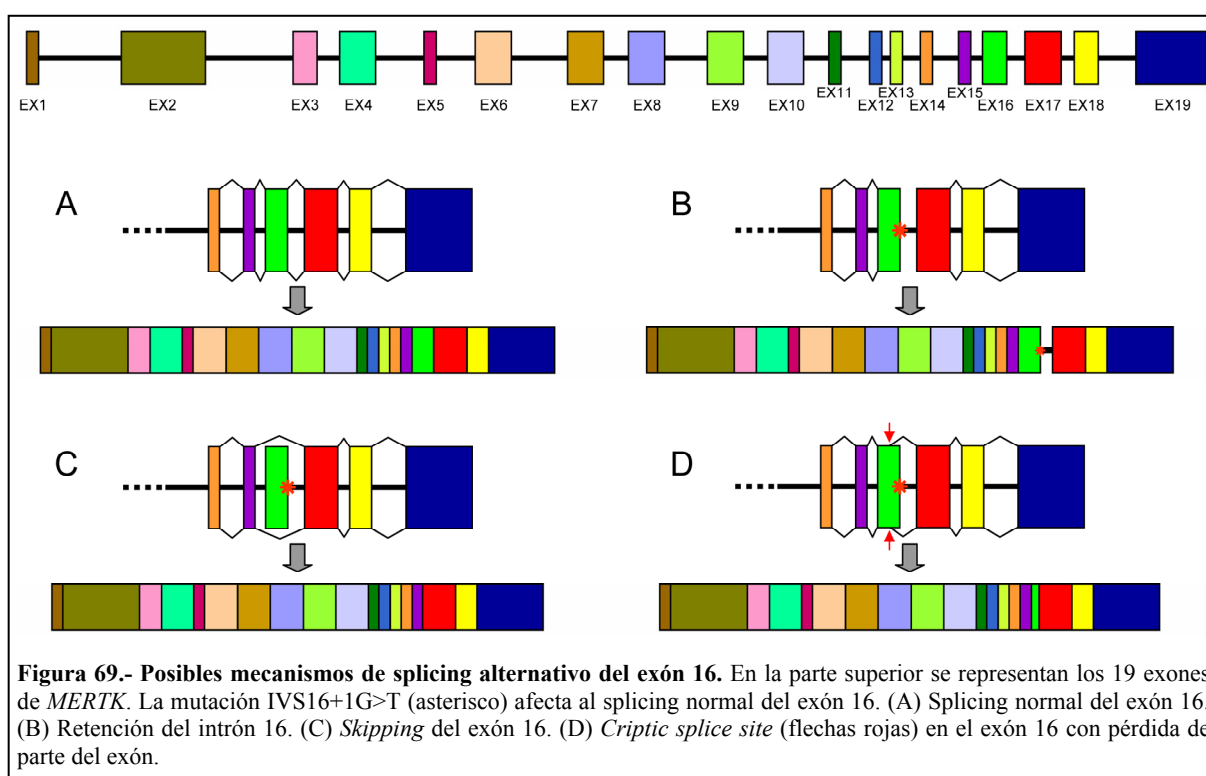
La nueva mutación (IVS16G+1>T) altera la secuencia consenso (GT) del sitio donante de splicing (Figura 1G Anexo), sugiriendo la posibilidad de un splicing anormal del exón 16. En base a esta suposición, se consideraron tres posibles mecanismos (Strachan y Read, 2004):

- 1.- Retención del intrón 16. La incapacidad del espliceosoma para escindir la secuencia completa del intrón 16 –al estar alterado el sitio donante de splicing– causaría la incorporación de este intrón en el mRNA. Por lo tanto, el mRNA contendría una nueva secuencia entre el exón 16 y el exón 17 que variaría la pauta normal de lectura, dando lugar a una proteína aberrante (Figura 69). Este

mecanismo suele ser bastante frecuente cuando el tamaño del intrón no es muy grande y los sitios donante o aceptor de splicing están mutados.

2.- Salto (*skipping*) del exón 16. En este caso, la mutación del sitio donante de splicing del intrón 16 provocaría que el espliceosoma no pudiese separar el intrón 16 del extremo 3' del exón 16, causando su conjunta eliminación durante el procesamiento del pre-mRNA. El efecto de este mecanismo en el mRNA originaría un salto en el normal reordenamiento de los exones, incorporando al exón 17 inmediatamente después del exón 15 (Figura 69). El mRNA finalmente obtenido mostraría la pérdida de todos los nucleótidos del exón 16 y su traducción daría lugar a una proteína defectuosa al no contener ninguno de los aminoácidos codificados por tal exón.

3.- Activación de un sitio críptico de splicing. Debido a que el espliceosoma no puede reconocer el sitio donante de splicing (GT) del intrón 16 al estar mutado, podría darse la circunstancia de que utilizase algún otro punto como sitio alternativo de splicing (*criptic splice site*). Por lo tanto, todas las parejas de nucleótidos GT situados en el exón 16 o en el intrón 16 podrían actuar como potenciales sitios crípticos de splicing. En tal caso, el mRNA contendría una forma extendida o recortada del exón 16 dependiendo de la localización del sitio críptico de splicing (Figura 69).



Con el propósito de verificar cual era el efecto real de la mutación IVS16+1G>T en el mRNA de *MERTK*, se sintetizó el cDNA correspondiente y se estudió el reordenamiento de los exones. Inicialmente, se diseñó un primer *Forward* (F₁) que se combinó con tres *Reverse* (R₁, R₂, y R₃) para amplificar tres fragmentos. El primero (F₁-R₁; tamaño: 443 pb) se situaba entre el exón 15 y el 18, el

segundo (F₁-R₂; tamaño: 204 pb) se disponía entre 15 y el 17, y el tercero (F₁-R₃; tamaño: 127 pb) comprendía desde el exón 15 al 16. La finalidad de amplificar estos tres fragmentos consistía en determinar la presencia o la ausencia del exón 16. En caso de que la mutación causase la retención del intrón 16, la amplificación de los tres fragmentos en los individuos afectados daría lugar a productos de PCR de tamaño superior a lo esperado. Si, por el contrario, se producía el *skipping* del exón 16, los fragmentos F₁-R₁ y F₁-R₂ tendrían un tamaño inferior al normal y el F₁-R₃ no podría ser amplificado, puesto que R₃ estaba localizado en el exón 16. Por último, la posibilidad de que un sitio críptico de splicing diese lugar a una forma extendida o recortada del exón 16 también estaba cubierta, ya que en cualquiera de los dos casos los fragmentos mostrarían un tamaño diferente al esperado. Aunque la amplificación de F₁-R₁ y F₁-R₂ ofrecía resultados redundantes, ambos fragmentos eran amplificados para dar mayor solidez a los resultados. Aparte de la mayor eficiencia de amplificación mostrada por F₁-R₁, en caso del *skipping* del exón 16 el fragmento F₁-R₂ podía resultar demasiado pequeño (99 pb) para obtener buenos resultados en la secuenciación.

Independientemente del efecto que podía causar la mutación IVS16+1G>T en el reordenamiento de los exones, se esperaba que la amplificación de cualquiera de los tres fragmentos en los cDNAs de los individuos sanos mostrase una única banda en los geles de agarosa, dos bandas en los portadores –una de tamaño normal y otra con un tamaño mayor o menor– y una única banda de tamaño diferente al normal en los afectados. Sin embargo, tras realizar las primeras PCRs y chequear los productos en geles de agarosa se obtuvieron unos resultados contradictorios y difícilmente explicables. En el gel de F₁-R₁ se podía observar la presencia de bandas dobles en los individuos sanos y afectados o triples en los portadores (Figura 2 Anexo). En 1994, Graham *et al.* ya se habían encontrado con un problema similar, observando bandas dobles cuando amplificaban el cDNA de *MERTK* (Graham *et al.*, 1994). Tras descartar que se trataba de un artefacto de la PCR o de un mRNA incompletamente procesado, llegaron a la conclusión que eran debidas a la presencia de dos distintas isoformas surgidas de un splicing alternativo. Por lo tanto, para el estudio de la mutación IVS16+1G>T había que tener en cuenta la posible interferencia de las 8 isoformas conocidas de mRNA del gen *MERTK*, todas ellas de diferente tamaño y con distinto reordenamiento de los exones (Figura 70).

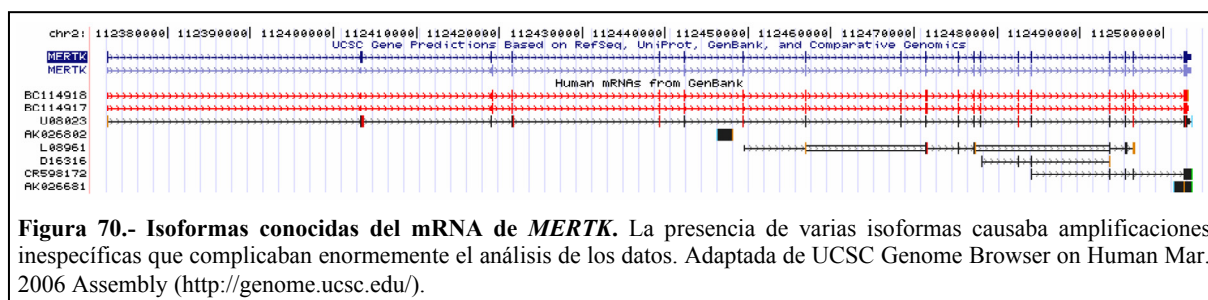
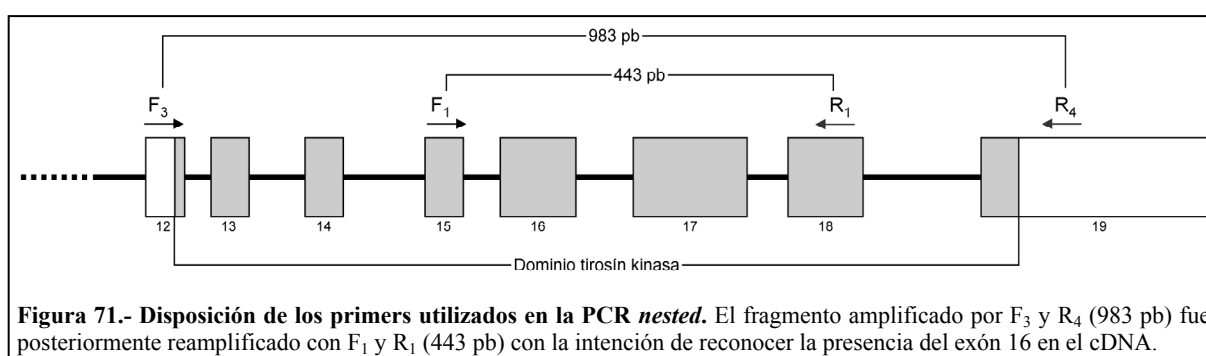


Figura 70.- Isoformas conocidas del mRNA de *MERTK*. La presencia de varias isoformas causaba amplificaciones inespecíficas que complicaban enormemente el análisis de los datos. Adaptada de UCSC Genome Browser on Human Mar. 2006 Assembly (<http://genome.ucsc.edu/>).

Con la intención de evitar la amplificación no deseada de las isoformas de menor tamaño del gen *MERTK*, se diseñó una PCR *nested* con dos rondas de amplificación (Figura 71). En primer lugar, mediante los primers F_3 y R_4 se amplificaba la región situada entre el exón 12 y el exón 19, presente en la isoforma más larga U08023. Con esta estrategia se evitaba la amplificación del resto de las isoformas conocidas, puesto que ninguna de ellas contenía estos dos exones. En la segunda ronda, sobre los fragmentos amplificados por F_3 y R_4 se reamplificó la región delimitada por F_1 (exón 15) y R_1 (exón 18), permitiendo aumentar la cantidad de producto de PCR todo lo necesario para ser detectado en geles de agarosa.



El chequeo del fragmento F_1 - R_1 en geles de agarosa mostró la presencia de una banda de tamaño inferior al normal en los individuos afectados (Figura 4 del manuscrito), con lo que se descartó la inclusión del intrón 16 en el mRNA y se confirmó la posible existencia de una forma recortada del exón 16 (debida a la presencia de un *cryptic splice site*) o la ausencia total del exón 16 (*skipping*), un evento muy común cuando las mutaciones que afectan a los sitios de splicing causan fallos en el procesamiento del pre-mRNA (Nakai y Sakamoto, 1994). La posterior secuenciación de los productos de PCR ratificó la ausencia del exón 16, corroborando que el *skipping* era el mecanismo que causaba la pérdida de este exón en el mRNA. Este fenómeno no resultaba desconocido, pues ya había sido previamente identificado en una amplia variedad de patologías (He y Grabowski, 1992; Sakai *et al.*, 1996; Rottbauer *et al.*, 1997).

Por lo tanto, la mutación IVS16+1G>T causa el splicing alternativo del exón 16 que se manifiesta a través del *skipping* de este exón en el mRNA. Como consecuencia de la pérdida de los 110 nucleótidos del exón 16, se genera un cambio de pauta de lectura que introduce un codón de parada prematuro (PTC, *Premature Termination Codon*) en el exón 17. Este PTC se inserta inmediatamente después de la inclusión de tres residuos aminoacídicos (Val-Ala-Arg) que no se corresponden con la secuencia normal de aminoácidos codificados por el exón 17 en la proteína *MERTK*. Los tres nuevos aminoácidos del exón 17 se sitúan contiguos a los codificados por el exón 15, dando lugar a un transcrito de mRNA alterado.

Mecanismos de degradación del mRNA alterado

Probablemente, la mayoría de estos transcritos alterados de mRNA que contienen un PTC en el exón 17 serán eliminados a través de un mecanismo celular conocido como *Nonsense Mediated Decay* (NMD). El NMD puede ser desencadenado por un PTC localizado antes de los 50 últimos nucleótidos del penúltimo exón (mutación NMD competente), causando la degradación de la mayoría de los mRNAs alterados. Sin embargo, algunos de los mRNAs defectuosos que contienen PTCs no sufren NMD y dan lugar a la expresión de pequeñas cantidades de proteínas truncadas, parcial o totalmente funcionales. La eliminación de la mayoría de los mRNAs defectuosos a través de NMD confiere un efecto protector sobre los portadores heterocigotos, puesto que la escasa expresión de las proteínas truncadas es insuficiente para crear un ambiente perjudicial para la célula. Por lo tanto, los portadores heterocigotos de mutaciones NMD competentes no mostrarían ningún síntoma de la patología debido a la eliminación de los mRNAs alterados y la expresión de una proteína completamente funcional por los transcritos de mRNA no alterados (Holbrook *et al.*, 2004).

Es muy probable que la mutación IVS16+1G>T actúe como una mutación NMD competente, desencadenando la degradación de los mRNAs alterados antes de su traducción a proteínas truncadas. Por esta razón, y de acuerdo con las premisas de NMD, los portadores heterocigotos de la mutación IVS16+1G>T en la familia R están sanos y no presentan ningún síntoma de RP.

Efecto de la mutación en la proteína

A nivel de la proteína, la mutación IVS16+1G>T provocaría la pérdida de más de la mitad de los aminoácidos constitutivos del dominio tirosín kinasa. La importante alteración mostrada por este dominio ocasionaría la seria disminución de la funcionalidad de la proteína. El cambio de pauta de lectura causado por el *skipping* del exón 16 genera la pérdida de los motivos KWIAIES y YSGDY, los principales sitios de autofosforilación de la proteína MERTK (Graham *et al.*, 1994; Ling *et al.*, 1996). Los tres residuos de tirosina del motivo YSGDY son esenciales para la función catalítica de la proteína y sus mutaciones pueden afectar severamente la actividad kinasa (Ling *et al.*, 1996). La presencia de un dominio tirosín kinasa truncado o no funcional ocasionaría la incapacidad para activar a la proteína MERTK mediante fosforilación. En tal caso, MERTK no podría actuar como desencadenante de la vía de señalización intracelular que gestiona los cambios citoesqueléticos requeridos por las células del RPE para fagocitar las porciones desechadas por los segmentos externos de los fotorreceptores (Guttridge *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2002). Por lo tanto, la proteína MERTK resulta decisiva en el proceso de renovación de los segmentos externos, al mediar la internalización de estas porciones por las células del RPE (Nandrot *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2002). La ausencia o la

pérdida de funcionalidad de esta proteína bloquearían la fagocitosis de los segmentos externos, resultando en la acumulación de los grupos de discos eliminados en el espacio interfotorreceptor. La consiguiente progresiva degeneración de los fotorreceptores conduciría a la instauración de la clínica de la RP.

Por otro lado, el hecho de que la mayoría de las isoformas conocidas del mRNA de *MERTK* engloben algunos de los exones que codifican el dominio tirosín kinasa resulta sorprendente. Sería interesante poder determinar si su función o su presencia juegan un papel importante en la fagocitosis de los segmentos externos por parte de las células del RPE. Para ello, se necesitarían estudios funcionales que esclareciesen el rol de la proteína *MERTK* y de sus pequeñas isoformas con la intención de obtener un mayor conocimiento acerca del complejo proceso de la renovación de los segmentos externos y su relación con el establecimiento de patologías degenerativas de la retina.

VI. CONCLUSIONES

La Retinitis Pigmentaria forma parte de un grupo de enfermedades hereditarias de la retina caracterizadas por la degeneración progresiva de los conos y los bastones. Esta memoria de tesis doctoral ha establecido sus bases en el análisis genético molecular de dicha patología en dos familias que muestran diferentes modos de herencia, presentándose a continuación de manera esquematizada las conclusiones más relevantes de dicho estudio:

- 1.- El análisis genético molecular realizado sobre la familia 68 no ha logrado determinar con absoluta certeza el gen responsable de la RP en dicha familia. El escrutinio de la práctica totalidad del cromosoma X con 82 STRs y 33 SNPs, el cribado de 22 genes asociados a RP autosómica recesiva y la realización de un análisis de ligamiento de todo el genoma con 262264 marcadores SNPs, no han permitido acotar de manera consistente una región cromosómica que pudiese ser designada como candidata.
- 2.- El fallecimiento a una edad temprana del individuo III.1 de la familia 68 ha impedido establecer su real grado de afectación, dificultando en sobremanera la resolución de las hipótesis suscitadas con este análisis. Posteriores estudios han de estar orientados hacia el reconocimiento de genes candidatos en la región que contiene al locus RP24 y la secuenciación de los 72 exones del gen *USH2A*, pudiendo identificar de esta forma el gen responsable de RP en esta familia.
- 3.- El cribado de los datos genotípicos previo al análisis de ligamiento de todo el genoma resulta de vital importancia, debido a que la inserción de errores en el análisis final podrían maximizar o minimizar el valor LOD obtenido para cada marcador, influenciando negativamente las conclusiones del estudio.
- 4.- Las técnicas de genotipado resultan una herramienta esencial para el diagnóstico molecular de una patología con una heterogeneidad genética tan elevada como la mostrada por la RP. La correcta utilización de esta tecnología ha permitido identificar a *MERTK* como el gen responsable de la forma autosómica recesiva de RP que afecta a la familia R.
- 5.- El análisis mutacional del gen *MERTK* en la familia R reveló la presencia de una mutación no descrita hasta el momento. Esta variante de secuencia patogénica afecta al sitio donante de *splicing* del intrón 16 (IVS16+1G>T) causando el *skipping* del exón 16 en el mRNA. Como consecuencia, se genera un cambio de pauta de lectura que introduce un codón de parada prematuro en el exón 17 dando lugar a un transcrito de mRNA alterado.

6.- La identificación del efecto de la proteína mutada MERTK, así como el de las isoformas conocidas de mRNA de *MERTK*, resulta esencial para el conocimiento del complejo proceso de la renovación de los segmentos externos y de la actividad fagocítica de las células del RPE. Para tal fin, se requieren experimentos adicionales, tales como la replicación de la mutación en un animal transgénico o estudios funcionales.

VII. ANEXO

Figura 1. Descarte de mutaciones conocidas causantes de RP la familia 68

A. Exclusión de la mutación: IVS10-2A>G

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
EX11 REFSEQ  GCCCTGTTTTATAGTGAAGTATCTTTGTTTCATTCACCCAGGAATGCATTCACAGAGGAGGATTCGAATTAGTGGTGAATTAATATAG
II. 2        GCCCTGTTTTATAGTGAAGTATCTTTGTTTCATTCACCCAGGAATGCATTCACAGAGGAGGATTCGAATTAGTGGTGAATTAATATAG
II. 3        GCCCTGTTTTATAGTGAAGTATCTTTGTTTCATTCACCCAGGAATGCATTCACAGAGGAGGATTCGAATTAGTGGTGAATTAATATAG
II. 5        GCCCTGTTTTATAGTGAAGTATCTTTGTTTCATTCACCCAGGAATGCATTCACAGAGGAGGATTCGAATTAGTGGTGAATTAATATAG
II. 6        GCCCTGTTTTATAGTGAAGTATCTTTGTTTCATTCACCCAGGAATGCATTCACAGAGGAGGATTCGAATTAGTGGTGAATTAATATAG
II. 12       GCCCTGTTTTATAGTGAAGTATCTTTGTTTCATTCACCCAGGAATGCATTCACAGAGGAGGATTCGAATTAGTGGTGAATTAATATAG
II. 14       GCCCTGTTTTATAGTGAAGTATCTTTGTTTCATTCACCCAGGAATGCATTCACAGAGGAGGATTCGAATTAGTGGTGAATTAATATAG
II. 15       GCCCTGTTTTATAGTGAAGTATCTTTGTTTCATTCACCCAGGAATGCATTCACAGAGGAGGATTCGAATTAGTGGTGAATTAATATAG
    
```

B. Exclusión de la mutación: R651X

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
EX14 REFSEQ  CGTGCATGAAAGACTTCAGCCACCCAAATGTCATTTCGACTTCTAGGTACTTCCGAGAAATGCAGGAGTGGGTGGCCAAGAGGGCTCTGCT
II. 2        CGTGCATGAAAGACTTCAGCCACCCAAATGTCATTTCGACTTCTAGGTACTTCCGAGAAATGCAGGAGTGGGTGGCCAAGAGGGCTCTGCT
II. 3        CGTGCATGAAAGACTTCAGCCACCCAAATGTCATTTCGACTTCTAGGTACTTCCGAGAAATGCAGGAGTGGGTGGCCAAGAGGGCTCTGCT
II. 5        CGTGCATGAAAGACTTCAGCCACCCAAATGTCATTTCGACTTCTAGGTACTTCCGAGAAATGCAGGAGTGGGTGGCCAAGAGGGCTCTGCT
II. 6        CGTGCATGAAAGACTTCAGCCACCCAAATGTCATTTCGACTTCTAGGTACTTCCGAGAAATGCAGGAGTGGGTGGCCAAGAGGGCTCTGCT
II. 12       CGTGCATGAAAGACTTCAGCCACCCAAATGTCATTTCGACTTCTAGGTACTTCCGAGAAATGCAGGAGTGGGTGGCCAAGAGGGCTCTGCT
II. 14       CGTGCATGAAAGACTTCAGCCACCCAAATGTCATTTCGACTTCTAGGTACTTCCGAGAAATGCAGGAGTGGGTGGCCAAGAGGGCTCTGCT
II. 15       CGTGCATGAAAGACTTCAGCCACCCAAATGTCATTTCGACTTCTAGGTACTTCCGAGAAATGCAGGAGTGGGTGGCCAAGAGGGCTCTGCT
    
```

C. Exclusión de la mutación: 2070delAGGAC

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
EX15 REFSEQ  ATACGGGGACCTGCATACCTTACTTTATTCCCGATTGGAGACAGGACCAAAGGTAATGATCTCCTTGTTTACCCCTGAACACTTCT
II. 2        ATACGGGGACCTGCATACCTTACTTTATTCCCGATTGGAGACAGGACCAAAGGTAATGATCTCCTTGTTTACCCCTGAACACTTCT
II. 3        ATACGGGGACCTGCATACCTTACTTTATTCCCGATTGGAGACAGGACCAAAGGTAATGATCTCCTTGTTTACCCCTGAACACTTCT
II. 5        ATACGGGGACCTGCATACCTTACTTTATTCCCGATTGGAGACAGGACCAAAGGTAATGATCTCCTTGTTTACCCCTGAACACTTCT
II. 6        ATACGGGGACCTGCATACCTTACTTTATTCCCGATTGGAGACAGGACCAAAGGTAATGATCTCCTTGTTTACCCCTGAACACTTCT
II. 12       ATACGGGGACCTGCATACCTTACTTTATTCCCGATTGGAGACAGGACCAAAGGTAATGATCTCCTTGTTTACCCCTGAACACTTCT
II. 14       ATACGGGGACCTGCATACCTTACTTTATTCCCGATTGGAGACAGGACCAAAGGTAATGATCTCCTTGTTTACCCCTGAACACTTCT
II. 15       ATACGGGGACCTGCATACCTTACTTTATTCCCGATTGGAGACAGGACCAAAGGTAATGATCTCCTTGTTTACCCCTGAACACTTCT
    
```

D. Exclusión de la mutación: R722X

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
EX16 REFSEQ  ATTGAAGTTCATGGTGGATATTGCCCTGGGAATGGAGTATCTGAGCAACAGGAAATTTTCTTCAICGAGATTTAGCTGCTCGAAACTGCAT
II. 2        ATTGAAGTTCATGGTGGATATTGCCCTGGGAATGGAGTATCTGAGCAACAGGAAATTTTCTTCAICGAGATTTAGCTGCTCGAAACTGCAT
II. 3        ATTGAAGTTCATGGTGGATATTGCCCTGGGAATGGAGTATCTGAGCAACAGGAAATTTTCTTCAICGAGATTTAGCTGCTCGAAACTGCAT
II. 5        ATTGAAGTTCATGGTGGATATTGCCCTGGGAATGGAGTATCTGAGCAACAGGAAATTTTCTTCAICGAGATTTAGCTGCTCGAAACTGCAT
II. 6        ATTGAAGTTCATGGTGGATATTGCCCTGGGAATGGAGTATCTGAGCAACAGGAAATTTTCTTCAICGAGATTTAGCTGCTCGAAACTGCAT
II. 12       ATTGAAGTTCATGGTGGATATTGCCCTGGGAATGGAGTATCTGAGCAACAGGAAATTTTCTTCAICGAGATTTAGCTGCTCGAAACTGCAT
II. 14       ATTGAAGTTCATGGTGGATATTGCCCTGGGAATGGAGTATCTGAGCAACAGGAAATTTTCTTCAICGAGATTTAGCTGCTCGAAACTGCAT
II. 15       ATTGAAGTTCATGGTGGATATTGCCCTGGGAATGGAGTATCTGAGCAACAGGAAATTTTCTTCAICGAGATTTAGCTGCTCGAAACTGCAT
    
```

E. Exclusión de la mutación: 2214delT

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
EX17 REFSEQ  TAACCTGCTCTCTGTAGGTTGCGAGATGACATGACTGTCCTGTTTGCGGACTTCGGCCTCTCTAAGAAGATTTACAGTGGCGATTATTAC
II. 2        TAACCTGCTCTCTGTAGGTTGCGAGATGACATGACTGTCCTGTTTGCGGACTTCGGCCTCTCTAAGAAGATTTACAGTGGCGATTATTAC
II. 3        TAACCTGCTCTCTGTAGGTTGCGAGATGACATGACTGTCCTGTTTGCGGACTTCGGCCTCTCTAAGAAGATTTACAGTGGCGATTATTAC
II. 5        TAACCTGCTCTCTGTAGGTTGCGAGATGACATGACTGTCCTGTTTGCGGACTTCGGCCTCTCTAAGAAGATTTACAGTGGCGATTATTAC
II. 6        TAACCTGCTCTCTGTAGGTTGCGAGATGACATGACTGTCCTGTTTGCGGACTTCGGCCTCTCTAAGAAGATTTACAGTGGCGATTATTAC
II. 12       TAACCTGCTCTCTGTAGGTTGCGAGATGACATGACTGTCCTGTTTGCGGACTTCGGCCTCTCTAAGAAGATTTACAGTGGCGATTATTAC
II. 14       TAACCTGCTCTCTGTAGGTTGCGAGATGACATGACTGTCCTGTTTGCGGACTTCGGCCTCTCTAAGAAGATTTACAGTGGCGATTATTAC
II. 15       TAACCTGCTCTCTGTAGGTTGCGAGATGACATGACTGTCCTGTTTGCGGACTTCGGCCTCTCTAAGAAGATTTACAGTGGCGATTATTAC
    
```


F. Exclusión de la mutación: R844C

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
EX19 REFSEQ GTATGAAATAATGTACTCTTGCTGGAGAACCAGATCCCTTAGACCGCCACCTTTTCAGTATTGAGGCTGCAGCTAGAAAACTCTTAGA
II. 2        GTATGAAATAATGTACTCTTGCTGGAGAACCAGATCCCTTAGACCGCCACCTTTTCAGTATTGAGGCTGCAGCTAGAAAACTCTTAGA
II. 3        GTATGAAATAATGTACTCTTGCTGGAGAACCAGATCCCTTAGACCGCCACCTTTTCAGTATTGAGGCTGCAGCTAGAAAACTCTTAGA
II. 5        GTATGAAATAATGTACTCTTGCTGGAGAACCAGATCCCTTAGACCGCCACCTTTTCAGTATTGAGGCTGCAGCTAGAAAACTCTTAGA
II. 6        GTATGAAATAATGTACTCTTGCTGGAGAACCAGATCCCTTAGACCGCCACCTTTTCAGTATTGAGGCTGCAGCTAGAAAACTCTTAGA
II. 12       GTATGAAATAATGTACTCTTGCTGGAGAACCAGATCCCTTAGACCGCCACCTTTTCAGTATTGAGGCTGCAGCTAGAAAACTCTTAGA
II. 14       GTATGAAATAATGTACTCTTGCTGGAGAACCAGATCCCTTAGACCGCCACCTTTTCAGTATTGAGGCTGCAGCTAGAAAACTCTTAGA
II. 15       GTATGAAATAATGTACTCTTGCTGGAGAACCAGATCCCTTAGACCGCCACCTTTTCAGTATTGAGGCTGCAGCTAGAAAACTCTTAGA
    
```

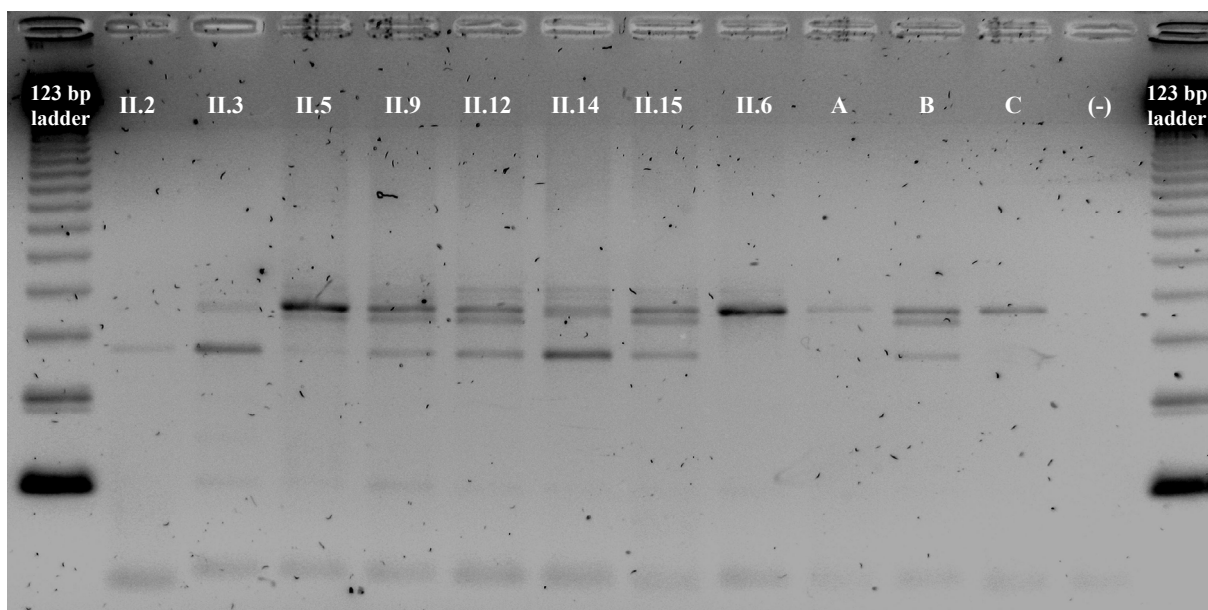
G. Identificación de una nueva mutación: IVS16+1G>T

```

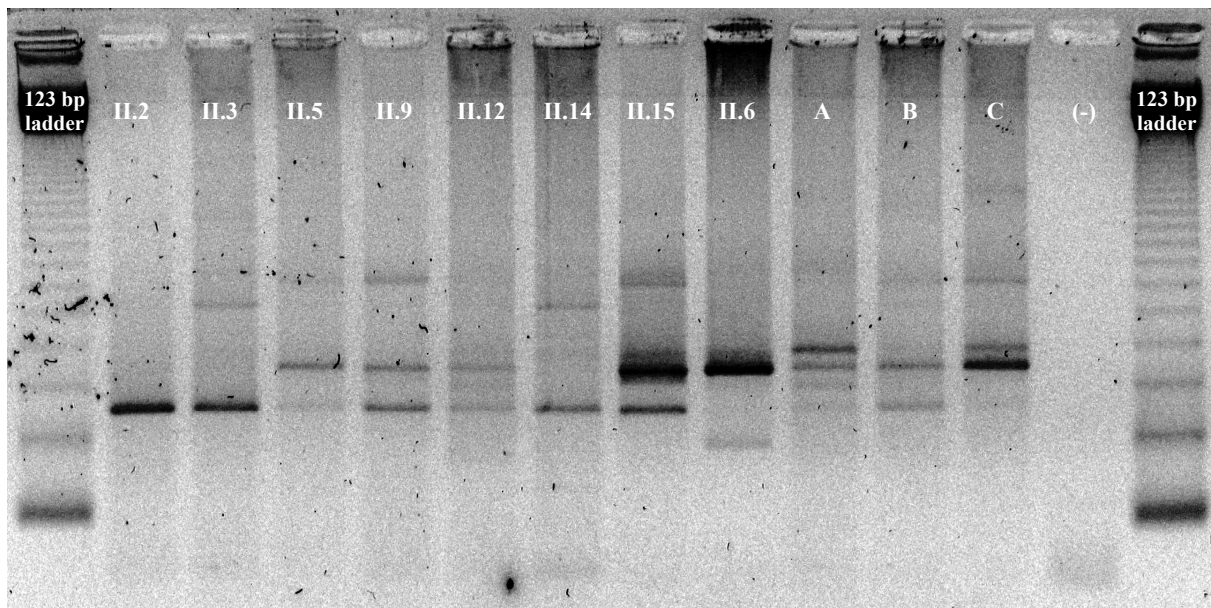
      10      20      30      40      50      60      70      80      90
EX16 REFSEQ AGGAATTTTCTTCATCGAGATTTAGCTGCTCGAAACGCATGTAAGAGTCCTCGGCTATCCTGGAAGGGTTTGGACCTCATGGTGTTTGGT
II. 2        AGGAATTTTCTTCATCGAGATTTAGCTGCTCGAAACGCATGTAAGAGTCCTCGGCTATCCTGGAAGGGTTTGGACCTCATGGTGTTTGGT
II. 3        AGGAATTTTCTTCATCGAGATTTAGCTGCTCGAAACGCATGTAAGAGTCCTCGGCTATCCTGGAAGGGTTTGGACCTCATGGTGTTTGGT
II. 5        AGGAATTTTCTTCATCGAGATTTAGCTGCTCGAAACGCATGTAAGAGTCCTCGGCTATCCTGGAAGGGTTTGGACCTCATGGTGTTTGGT
II. 6        AGGAATTTTCTTCATCGAGATTTAGCTGCTCGAAACGCATGTAAGAGTCCTCGGCTATCCTGGAAGGGTTTGGACCTCATGGTGTTTGGT
II. 12       AGGAATTTTCTTCATCGAGATTTAGCTGCTCGAAACGCATGTAAGAGTCCTCGGCTATCCTGGAAGGGTTTGGACCTCATGGTGTTTGGT
II. 14       AGGAATTTTCTTCATCGAGATTTAGCTGCTCGAAACGCATGTAAGAGTCCTCGGCTATCCTGGAAGGGTTTGGACCTCATGGTGTTTGGT
II. 15       AGGAATTTTCTTCATCGAGATTTAGCTGCTCGAAACGCATGTAAGAGTCCTCGGCTATCCTGGAAGGGTTTGGACCTCATGGTGTTTGGT
    
```

Figura 2. Efecto de la mutación IVS16+1G>T en el reordenamiento de los exones de MERTK: Análisis del cDNA.

A. Análisis del fragmento amplificado por F1 y R1



B. Análisis del fragmento reamplificado por F1 y R1 a partir de F3-R4



VIII. BIBLIOGRAFÍA

A

1. Abd El-Aziz, M. M., El-Ashry, M. F., Chan, W. M., Chong, K. L., Barragan, I., Antiñolo, G., Pang, C. P. y Bhattacharya, S. S. (2007): **A novel genetic study of Chinese families with autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *Ann Hum Genet* **71**:281-294.
2. Abid, A., Ismail, M., Mehdi, S. Q. y Khaliq, S. (2006): **Identification of novel mutations in the SEMA4A gene associated with retinal degenerative diseases.** *J Med Genet* **43**:378-381.
3. Acland, G. M., Ray, K., Mellersh, C. S., Gu, W., Langston, A. A., Rine, J., Ostrander, E. A. y Aguirre, G. D. (1998): **Linkage analysis and comparative mapping of canine progressive rod-cone degeneration (prcd) establishes potential locus homology with retinitis pigmentosa (RP17) in humans.** *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:3048-3053.
4. Adler, R. (1993): **Determination of cellular types in the retina.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**:1677-1682.
5. Aguirre, G. D., Yashar, B. M., John, S. K., Smith, J. E., Breuer, D. K., Hiriyanna, S., Swaroop, A. y Milam, A. H. (2002): **Retinal histopathology of an XLRP carrier with a mutation in the RPGR exon ORF15.** *Exp Eye Res* **75**:431-443.
6. Aherne, A., Kennan, A., Kenna, P. F., McNally, N., Lloyd, D. G., Alberts, I. L., Kiang, A. S., Humphries, M. M., Ayuso, C., Engel, P. C., Gu, J. J., Mitchell, B. S., Farrar, G. J. y Humphries, P. (2004): **On the molecular pathology of neurodegeneration in IMPDH1-based retinitis pigmentosa.** *Hum Mol Genet* **13**:641-650.
7. Al-Jandal, N., Farrar, G. J., Kiang, A. S., Humphries, M. M., Bannon, N., Findlay, J. B., Humphries, P. y Kenna, P. F. (1999): **A novel mutation within the rhodopsin gene (Thr-94-Ile) causing autosomal dominant congenital stationary night blindness.** *Hum Mutat* **13**:75-81.
8. Al-Magthteh, M., Vithana, E., Tarttelin, E., Jay, M., Evans, K., Moore, T., Bhattacharya, S. y Inglehearn, C. F. (1996): **Evidence for a major retinitis pigmentosa locus on 19q13.4 (RP11) and association with a unique bimodal expressivity phenotype.** *Am J Hum Genet* **59**:864-871.
9. Aleman, T. S., Cideciyan, A. V., Sumaroka, A., Schwartz, S. B., Roman, A. J., Windsor, E. A., Steinberg, J. D., Branham, K., Othman, M., Swaroop, A. y Jacobson, S. G. (2007): **Inner retinal abnormalities in X-linked retinitis pigmentosa with RPGR mutations.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**:4759-4765.
10. Aller, E., Najera, C., Millán, J. M., Oltra, J. S., Perez-Garrigues, H., Vilela, C., Navea, A. y Beneyto, M. (2004): **Genetic analysis of 2299delG and C759F mutations (USH2A) in patients with visual and/or auditory impairments.** *Eur J Hum Genet* **12**:407-410.
11. Allikmets, R. (2000): **Simple and complex ABCR: genetic predisposition to retinal disease.** *Am J Hum Genet* **67**:793-799.
12. Allikmets, R. (1997): **A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy.** *Nat Genet* **17**:122.
13. Allikmets, R., Shroyer, N. F., Singh, N., Seddon, J. M., Lewis, R. A., Bernstein, P. S., Peiffer, A., Zabriskie, N. A., Li, Y., Hutchinson, A., Dean, M., Lupski, J. R. y Leppert, M. (1997): **Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration.** *Science* **277**:1805-1807.
14. Almgren, P., Bendahl, P.-O., Bengtsson, H., Hössjer, O. y Perfekt, R. (2003): **Statistics in Genetics. Lecture notes.** Lund University. Lund, Sweden.
15. Altherr, M. R., Wasmuth, J. J., Seldin, M. F., Nadeau, J. H., Baehr, W. y Pittler, S. J. (1992): **Chromosome mapping of the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in mouse and human: tight linkage to the Huntington disease region (4p16.3).** *Genomics* **12**:750-754.
16. Ardell, M. D., Aragon, I., Oliveira, L., Porche, G. E., Burke, E. y Pittler, S. J. (1996): **The beta subunit of human rod photoreceptor cGMP-gated cation channel is generated from a complex transcription unit.** *FEBS Lett* **389**:213-218.
17. Ardell, M. D., Bedsole, D. L., Schoborg, R. V. y Pittler, S. J. (2000): **Genomic organization of the human rod photoreceptor cGMP-gated cation channel beta-subunit gene.** *Gene* **245**:311-318.
18. Ardell, M. D., Makhija, A. K., Oliveira, L., Miniou, P., Viegas-Pequignot, E. y Pittler, S. J. (1995): **cDNA, gene structure, and chromosomal localization of human GARI (CNCG3L), a homolog of the third subunit of bovine photoreceptor cGMP-gated channel.** *Genomics* **28**:32-38.

19. Arikawa, K., Molday, L. L., Molday, R. S. y Williams, D. S. (1992): **Localization of peripherin/rds in the disk membranes of cone and rod photoreceptors: relationship to disk membrane morphogenesis and retinal degeneration.** *J Cell Biol* **116**:659-667.
20. Armstrong, R. A. y Smith, S. A. (1999): **Retinitis pigmentosa and the new genetics.** *Optometry Today* [on line]. Disponible en: <http://www.optometry.co.uk>
21. Arshavsky, V. Y., Lamb, T. D. y Pugh, E. N. (2002): **G proteins and phototransduction.** *Annu Rev Physiol* **64**:153-187.
22. Astuto, L. M., Bork, J. M., Weston, M. D., Askew, J. W., Fields, R. R., Orten, D. J., Ohliger, S. J., Riazuddin, S., Morell, R. J., Khan, S., Riazuddin, S., Kremer, H., van, H. P., Moller, C. G., Cremers, C. W., Ayuso, C., Heckenlively, J. R., Rohrschneider, K., Spandau, U., Greenberg, J., Ramesar, R., Reardon, W., Bitoun, P., Millán, J., Legge, R., Friedman, T. B. y Kimberling, W. J. (2002): **CDH23 mutation and phenotype heterogeneity: a profile of 107 diverse families with Usher syndrome and nonsyndromic deafness.** *Am J Hum Genet* **71**:262-275.
23. Ayyagari, R., Demirci, F. Y., Liu, J., Bingham, E. L., Stringham, H., Kakuk, L. E., Boehnke, M., Gorin, M. B., Richards, J. E. y Sieving, P. A. (2002): **X-linked recessive atrophic macular degeneration from RPGR mutation.** *Genomics* **80**:166-171.
24. Azarian, S. M. y Travis, G. H. (1997): **The photoreceptor rim protein is an ABC transporter encoded by the gene for recessive Stargardt's disease (ABCR).** *FEBS Lett* **409**:247-252.

B

25. Bader, I., Brandau, O., Achatz, H., pfelstedt-Sylla, E., Hergersberg, M., Lorenz, B., Wissinger, B., Wittwer, B., Rudolph, G., Meindl, A. y Meitinger, T. (2003): **X-linked retinitis pigmentosa: RPGR mutations in most families with definite X linkage and clustering of mutations in a short sequence stretch of exon ORF15.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:1458-1463.
26. Banerjee, P., Kleyn, P. W., Knowles, J. A., Lewis, C. A., Ross, B. M., Parano, E., Kovats, S. G., Lee, J. J., Penchaszadeh, G. K., Ott, J., Jacobson, S. G. y Gilliam, T. C. (1998a): **TULP1 mutation in two extended Dominican kindreds with autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *Nat Genet* **18**:177-179.
27. Banerjee, P., Lewis, C. A., Kleyn, P. W., Shugart, Y. Y., Ross, B. M., Penchaszadeh, G. K., Ott, J., Jacobson, S. G., Gilliam, T. C. y Knowles, J. A. (1998b): **Homozygosity and physical mapping of the autosomal recessive retinitis pigmentosa locus (RP14) on chromosome 6p21.3.** *Genomics* **48**:171-177.
28. Banin, E., Cideciyan, A. V., Aleman, T. S., Petters, R. M., Wong, F., Milam, A. H. y Jacobson, S. G. (1999): **Retinal rod photoreceptor-specific gene mutation perturbs cone pathway development.** *Neuron* **23**:549-557.
29. Bardien, S., Ramesar, R., Bhattacharya, S. y Greenberg, J. (1997): **Retinitis pigmentosa locus on 17q (RP17): fine localization to 17q22 and exclusion of the PDEG and TIMP2 genes.** *Hum Genet* **101**:13-17.
30. Bardien-Kruger, S., Greenberg, J., Tubb, B., Bryan, J., Queimado, L., Lovett, M. y Ramesar, R. S. (1999): **Refinement of the RP17 locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa, construction of a YAC contig and investigation of the candidate gene retinal fascin.** *Eur J Hum Genet* **7**:332-338.
31. Bareil, C., Hamel, C. P., Delague, V., Arnaud, B., Demaille, J. y Claustres, M. (2001): **Segregation of a mutation in CNGB1 encoding the beta-subunit of the rod cGMP-gated channel in a family with autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *Hum Genet* **108**:328-334.
32. Bartolini, F., Bhamidipati, A., Thomas, S., Schwahn, U., Lewis, S. A. y Cowan, N. J. (2002): **Functional overlap between retinitis pigmentosa 2 protein and the tubulin-specific chaperone cofactor C.** *J Biol Chem* **277**:14629-14634.
33. Bascom, R. A., García-Heras, J., Hsieh, C. L., Gerhard, D. S., Jones, C., Francke, U., Willard, H. F., Ledbetter, D. H. y McInnes, R. R. (1992a): **Localization of the photoreceptor gene ROM1 to human chromosome 11 and mouse chromosome 19: sublocalization to human 11q13 between PGA and PYGM.** *Am J Hum Genet* **51**:1028-1035.
34. Bascom, R. A., Manara, S., Collins, L., Molday, R. S., Kalnins, V. I. y McInnes, R. R. (1992b): **Cloning of the cDNA for a novel photoreceptor membrane protein (rom-1) identifies a disk rim protein family implicated in human retinopathies.** *Neuron* **8**:1171-1184.
35. Bateman, J. B., Klisak, I., Kojis, T., Mohandas, T., Sparkes, R. S., Li, T. S., Applebury, M. L., Bowes, C. y Farber, D. B. (1992): **Assignment of the beta-subunit of rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase gene PDEB (homolog of the mouse rd gene) to human chromosome 4p16.** *Genomics* **12**:601-603.

36. Batra-Safferling, R., Abarca-Heidemann, K., Körschen, H. G., Tziatzios, C., Stoldt, M., Budyak, I., Willbold, D., Schwalbe, H., Klein-Seetharaman, J. y Kaupp, U. B. (2006): **Glutamic acid-rich proteins of rod photoreceptors are natively unfolded.** *J Biol Chem* **281**:1449-1460.
37. Batten, M. L., Imanishi, Y., Maeda, T., Tu, D. C., Moise, A. R., Bronson, D., Possin, D., Van Gelder, R. N., Baehr, W. y Palczewski, K. (2004): **Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver.** *J Biol Chem* **279**:10422-10432.
38. Bauer, S., Fujita, R., Buraczynska, M., Abrahamson, M., Ehinger, B., Wu, W., Falls, T. J., Andreasson, S. y Swaroop, A. (1998): **Phenotype of an X-linked retinitis pigmentosa family with a novel splice defect in the RPGR gene.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**:2470-2474.
39. Baumgartner, W. A. (2000): **Etiology, pathogenesis, and experimental treatment of retinitis pigmentosa.** *Med Hypotheses* **54**:814-824.
40. Beales, P. L., Elcioglu, N., Woolf, A. S., Parker, D. y Flinter, F. A. (1999): **New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey.** *J Med Genet* **36**:437-446.
41. Beech, P. L., Pagh-Roehl, K., Noda, Y., Hirokawa, N., Burnside, B. y Rosenbaum, J. L. (1996): **Localization of kinesin superfamily proteins to the connecting cilium of fish photoreceptors.** *J Cell Sci* **109**:889-897.
42. Bernal, S., Ayuso, C., Antiñolo, G., Gimenez, A., Borrego, S., Trujillo, M. J., Marcos, I., Calaf, M., Del, R. E. y Baiget, M. (2003a): **Mutations in USH2A in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa: high prevalence and phenotypic variation.** *J Med Genet* **40**:e8.
43. Bernal, S., Calaf, M., García-Hoyos, M., García-Sandoval, B., Rosell, J., Adan, A., Ayuso, C. y Baiget, M. (2003b): **Study of the involvement of the RGR, CRPBI, and CRB1 genes in the pathogenesis of autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *J Med Genet* **40**:e89.
44. Berson, E. L., Grimsby, J. L., Adams, S. M., McGee, T. L., Sweklo, E., Pierce, E. A., Sandberg, M. A. y Dryja, T. P. (2001): **Clinical features and mutations in patients with dominant retinitis pigmentosa-1 (RP1).** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**:2217-2224.
45. Besharse, J. C. y Hollyfield, J. G. (1979): **Turnover of mouse photoreceptor outer segments in constant light and darkness.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **18**:1019-1024.
46. Besharse, J. C. y Spratt, G. (1988): **Excitatory amino acids and rod photoreceptor disc shedding: analysis using specific agonists.** *Exp Eye Res* **47**:609-620.
47. Bessant, D. A., Ali, R. R. y Bhattacharya, S. S. (2001): **Molecular genetics and prospects for therapy of the inherited retinal dystrophies.** *Curr Opin Genet Dev* **11**:307-316.
48. Bessant, D. A., Khaliq, S., Hameed, A., Anwar, K., Payne, A. M., Mehdi, S. Q. y Bhattacharya, S. S. (1999a): **Severe autosomal dominant retinitis pigmentosa caused by a novel rhodopsin mutation (Ter349Glu).** *Mutations in brief no. 208. Online. Hum Mutat* **13**:83.
49. Bessant, D. A., Payne, A. M., Mitton, K. P., Wang, Q. L., Swain, P. K., Plant, C., Bird, A. C., Zack, D. J., Swaroop, A. y Bhattacharya, S. S. (1999b): **A mutation in NRL is associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Nat Genet* **21**:355-356.
50. Bhattacharya, G., Kalluri, R., Orten, D. J., Kimberling, W. J. y Cosgrove, D. (2004): **A domain-specific usherin/collagen IV interaction may be required for stable integration into the basement membrane superstructure.** *J Cell Sci* **117**:233-242.
51. Bhattacharya, G., Miller, C., Kimberling, W. J., Jablonski, M. M. y Cosgrove, D. (2002): **Localization and expression of usherin: a novel basement membrane protein defective in people with Usher's syndrome type IIa.** *Hear Res* **163**:1-11.
52. Bibb, C. y Young, R. W. (1974): **Renewal of fatty acids in the membranes of visual cell outer segments.** *J Cell Biol* **61**:327-343.
53. Bird, A. C. (1975): **X-linked retinitis pigmentosa.** *Br J Ophthalmol* **59**:177-199.
54. Blanco Teijeiro, M. J. (1998): **Estudio epidemiológico, clínico y genético (rodopsina y cromosoma X) de la Retinosis Pigmentaria en Galicia.** Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela.
55. Blanton, S. H., Heckenlively, J. R., Cottingham, A. W., Friedman, J., Sadler, L. A., Wagner, M., Friedman, L. H. y Daiger, S. P. (1991): **Linkage mapping of autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP1) to the pericentric region of human chromosome 8.** *Genomics* **11**:857-869.

56. Boesze-Battaglia, K. (1997): **Fusion of intracellular rod outer segment disk membranes with the surrounding plasma membrane.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**:487-497.
57. Boesze-Battaglia, K., Stefano, F. P., Fitzgerald, C. y Muller-Weeks, S. (2007): **ROM-1 potentiates photoreceptor specific membrane fusion processes.** *Exp Eye Res* **84**:22-31.
58. Boesze-Battaglia, K. y Stefano, F. P. (2002): **Peripherin/rds fusogenic function correlates with subunit assembly.** *Exp Eye Res* **75**:227-231.
59. Boggon, T. J., Shan, W. S., Santagata, S., Myers, S. C. y Shapiro, L. (1999): **Implication of tubby proteins as transcription factors by structure-based functional analysis.** *Science* **286**:2119-2125.
60. Bok, D. (2007): **Contributions of genetics to our understanding of inherited monogenic retinal diseases and age-related macular degeneration.** *Arch Ophthalmol* **125**:160-164.
61. Bok, D. y Hall, M. O. (1971): **The role of the pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat.** *J Cell Biol* **49**:664-682.
62. Bonapace, G., Waheed, A., Shah, G. N. y Sly, W. S. (2004): **Chemical chaperones protect from effects of apoptosis-inducing mutation in carbonic anhydrase IV identified in retinitis pigmentosa 17.** *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:12300-12305.
63. Bork, J. M., Peters, L. M., Riazuddin, S., Bernstein, S. L., Ahmed, Z. M., Ness, S. L., Polomeno, R., Ramesh, A., Schloss, M., Srisailpathy, C. R., Wayne, S., Bellman, S., Desmukh, D., Ahmed, Z., Khan, S. N., Kaloustian, V. M., Li, X. C., Lalwani, A., Riazuddin, S., Bitner-Glindzicz, M., Nance, W. E., Liu, X. Z., Wistow, G., Smith, R. J., Griffith, A. J., Wilcox, E. R., Friedman, T. B. y Morell, R. J. (2001): **Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23.** *Am J Hum Genet* **68**:26-37.
64. Bormann, J. y Feigenspan, A. (1995): **GABA_C receptors.** *Trends Neurosci* **18**:515-519.
65. Bornancin, F., Mechtcheriakova, D., Stora, S., Graf, C., Wlachos, A., Devay, P., Urtz, N., Baumruker, T. y Billich, A. (2005): **Characterization of a ceramide kinase-like protein.** *Biochim Biophys Acta* **1687**:31-43.
66. Bowne, S. J., Daiger, S. P., Hims, M. M., Sohocki, M. M., Malone, K. A., McKie, A. B., Heckenlively, J. R., Birch, D. G., Inglehearn, C. F., Bhattacharya, S. S., Bird, A. y Sullivan, L. S. (1999): **Mutations in the RP1 gene causing autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Hum Mol Genet* **8**:2121-2128.
67. Bowne, S. J., Liu, Q., Sullivan, L. S., Zhu, J., Spellicy, C. J., Rickman, C. B., Pierce, E. A. y Daiger, S. P. (2006a): **Why do mutations in the ubiquitously expressed housekeeping gene IMPDH1 cause retina-specific photoreceptor degeneration?** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**:3754-3765.
68. Bowne, S. J., Sullivan, L. S., Blanton, S. H., Cepko, C. L., Blackshaw, S., Birch, D. G., Hughbanks-Wheaton, D., Heckenlively, J. R. y Daiger, S. P. (2002): **Mutations in the inosine monophosphate dehydrogenase 1 gene (IMPDH1) cause the RP10 form of autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Hum Mol Genet* **11**:559-568.
69. Bowne, S. J., Sullivan, L. S., Mortimer, S. E., Hedstrom, L., Zhu, J., Spellicy, C. J., Gire, A. I., Hughbanks-Wheaton, D., Birch, D. G., Lewis, R. A., Heckenlively, J. R. y Daiger, S. P. (2006b): **Spectrum and frequency of mutations in IMPDH1 associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa and leber congenital amaurosis.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**:34-42.
70. Boylan, J. P. y Wright, A. F. (2000): **Identification of a novel protein interacting with RPGR.** *Hum Mol Genet* **9**:2085-2093.
71. Bozanic, D., Tafr, R. y Saraga-Babic, M. (2003): **Role of apoptosis and mitosis during human eye development.** *Eur J Cell Biol* **82**:421-429.
72. Breuer, D. K., Yashar, B. M., Filippova, E., Hiriyan, S., Lyons, R. H., Mears, A. J., Asaye, B., Acar, C., Vervoort, R., Wright, A. F., Musarella, M. A., Wheeler, P., MacDonald, I., Iannaccone, A., Birch, D., Hoffman, D. R., Fishman, G. A., Heckenlively, J. R., Jacobson, S. G., Sieving, P. A. y Swaroop, A. (2002): **A comprehensive mutation analysis of RP2 and RPGR in a North American cohort of families with X-linked retinitis pigmentosa.** *Am J Hum Genet* **70**:1545-1554.
73. Briggs, C. E., Rucinski, D., Rosenfeld, P. J., Hirose, T., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (2001): **Mutations in ABCR (ABCA4) in patients with Stargardt macular degeneration or cone-rod degeneration.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**:2229-2236.
74. Brown, D., Zhu, X. L. y Sly, W. S. (1990): **Localization of membrane-associated carbonic anhydrase type IV in kidney epithelial cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:7457-7461.

75. Buczylo, J., Saari, J. C., Crouch, R. K. y Palczewski, K. (1996): **Mechanisms of opsin activation.** *J Biol Chem* **271**:20621-20630.
76. Budu, Matsumoto, M., Hayasaka, S., Yamada, T. y Hayasaka, Y. (2000): **Rhodopsin gene codon 106 mutation (Gly-to-Arg) in a Japanese family with autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Jpn J Ophthalmol* **44**:610-614.
77. Bumsted O'Brien, K. M., Schulte, D. y Hendrickson, A. E. (2003): **Expression of photoreceptor-associated molecules during human fetal eye development.** *Mol Vis* **9**:401-409.
78. Bumsted, K. y Hendrickson, A. (1999): **Distribution and development of short-wavelength cones differ between Macaca monkey and human fovea.** *J Comp Neurol* **403**:502-516.
79. Bunge, S., Wedemann, H., David, D., Terwilliger, D. J., van den Born, L. I., Uehla-Scholz, C., Samanns, C., Horn, M., Ott, J., Schwinger, E., Schinzel, A., Denton, M. J. y Gal, A. (1993): **Molecular analysis and genetic mapping of the rhodopsin gene in families with autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Genomics* **17**:230-233.
80. Buraczynska, M., Wu, W., Fujita, R., Buraczynska, K., Phelps, E., Andreasson, S., Bennett, J., Birch, D. G., Fishman, G. A., Hoffman, D. R., Inana, G., Jacobson, S. G., Musarella, M. A., Sieving, P. A. y Swaroop, A. (1997): **Spectrum of mutations in the RPGR gene that are identified in 20% of families with X-linked retinitis pigmentosa.** *Am J Hum Genet* **61**:1287-1292.
81. Burstedt, M. S., Sandgren, O., Holmgren, G. y Forsman-Semb, K. (1999): **Bothnia dystrophy caused by mutations in the cellular retinaldehyde-binding protein gene (RLBP1) on chromosome 15q26.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**:995-1000.

C

82. Cahill, G. M. y Besharse, J. C. (1993): **Circadian clock functions localized in Xenopus retinal photoreceptors.** *Neuron* **10**:573-577.
83. Calabrese, G., Sallèse, M., Stornaiuolo, A., Stuppia, L., Palka, G. y De, B. A. (1994): **Chromosome mapping of the human arrestin (SAG), beta-arrestin 2 (ARRB2), and beta-adrenergic receptor kinase 2 (ADRBK2) genes.** *Genomics* **23**:286-288.
84. Calvert, P. D., Ho, T. W., LeFebvre, Y. M. y Arshavsky, V. Y. (1998): **Onset of feedback reactions underlying vertebrate rod photoreceptor light adaptation.** *J Gen Physiol* **111**:39-51.
85. Calvert, P. D., Strissel, K. J., Schiesser, W. E., Pugh, E. N. y Arshavsky, V. Y. (2006): **Light-driven translocation of signaling proteins in vertebrate photoreceptors.** *Trends Cell Biol* **16**:560-568.
86. Capeans, C., Blanco, M. J., Lareu, M. V., Barros, F., Pineiro, A., Sanchez-Salorio, M. y Carracedo, A. (1998): **Linkage analysis in a large Spanish family with X-linked retinitis pigmentosa: phenotype-genotype correlation.** *Clin Genet* **54**:26-32.
87. Caruso, G., Bisegna, P., Shen, L., Andreucci, D., Hamm, H. E. y DiBenedetto, E. (2006): **Modeling the role of incisures in vertebrate phototransduction.** *Biophys J* **91**:1192-1212.
88. Cepko, C. L., Austin, C. P., Yang, X., Alexiades, M. y Ezzeddine, D. (1996): **Cell fate determination in the vertebrate retina.** *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:589-595.
89. Chaitin, M. H. y Hall, M. O. (1983): **Defective ingestion of rod outer segments by cultured dystrophic rat pigment epithelial cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **24**:812-820.
90. Chakarova, C. F., Hims, M. M., Bolz, H., bu-Safieh, L., Patel, R. J., Papaioannou, M. G., Inglehearn, C. F., Keen, T. J., Willis, C., Moore, A. T., Rosenberg, T., Webster, A. R., Bird, A. C., Gal, A., Hunt, D., Vithana, E. N. y Bhattacharya, S. S. (2002): **Mutations in HPRP3, a third member of pre-mRNA splicing factor genes, implicated in autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Hum Mol Genet* **11**:87-92.
91. Chakarova, C. F., Papaioannou, M. G., Khanna, H., Lopez, I., Waseem, N., Shah, A., Theis, T., Friedman, J., Maubaret, C., Bujakowska, K., Veraitch, B., bd El-Aziz, M. M., Prescott, d. Q., Parapuram, S. K., Bickmore, W. A., Munro, P. M., Gal, A., Hamel, C. P., Marigo, V., Ponting, C. P., Wissinger, B., Zrenner, E., Matter, K., Swaroop, A., Koenekoop, R. K. y Bhattacharya, S. S. (2007): **Mutations in TOPORS cause autosomal dominant retinitis pigmentosa with perivascular retinal pigment epithelium atrophy.** *Am J Hum Genet* **81**:1098-1103.
92. Chang, G. Q., Hao, Y. y Wong, F. (1993): **Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice.** *Neuron* **11**:595-605.

93. Chang, Y. P., Kim, J. D., Schwander, K., Rao, D. C., Miller, M. B., Weder, A. B., Cooper, R. S., Schork, N. J., Province, M. A., Morrison, A. C., Kardia, S. L., Quertermous, T. y Chakravarti, A. (2006): **The impact of data quality on the identification of complex disease genes: experience from the Family Blood Pressure Program.** *Eur J Hum Genet* **14**:469-477.
94. Chapple, J. P., Hardcastle, A. J., Grayson, C., Spackman, L. A., Willison, K. R. y Cheetham, M. E. (2000): **Mutations in the N-terminus of the X-linked retinitis pigmentosa protein RP2 interfere with the normal targeting of the protein to the plasma membrane.** *Hum Mol Genet* **9**:1919-1926.
95. Chen, G., Adeyemo, A., Zhou, J., Yuan, A., Chen, Y. y Rotimi, C. (2005a): **Genome scan linkage analysis comparing microsatellites and single-nucleotide polymorphisms markers for two measures of alcoholism in chromosomes 1, 4, and 7.** *BMC Genet* **6** Suppl 1:S4.
96. Chen, J., Rattner, A. y Nathans, J. (2005b): **The rod photoreceptor-specific nuclear receptor Nr2e3 represses transcription of multiple cone-specific genes.** *J Neurosci* **25**:118-129.
97. Chen, P., Hao, W., Rife, L., Wang, X. P., Shen, D., Chen, J., Ogden, T., Van Boemel, G. B., Wu, L., Yang, M. y Fong, H. K. (2001): **A photic visual cycle of rhodopsin regeneration is dependent on Rgr.** *Nat Genet* **28**:256-260.
98. Chen, S., Wang, Q. L., Nie, Z., Sun, H., Lennon, G., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. y Zack, D. J. (1997): **Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes.** *Neuron* **19**:1017-1030.
99. Chen, T. Y., Illing, M., Molday, L. L., Hsu, Y. T., Yau, K. W. y Molday, R. S. (1994): **Subunit 2 (or beta) of retinal rod cGMP-gated cation channel is a component of the 240-kDa channel-associated protein and mediates Ca(2+)-calmodulin modulation.** *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:11757-11761.
100. Chen, Y., Ma, J. X. y Crouch, R. K. (2003): **Down-regulation of RPE65 protein expression and promoter activity by retinoic acid.** *Mol Vis* **9**:345-354.
101. Cheng, H., Khanna, H., Oh, E. C., Hicks, D., Mitton, K. P. y Swaroop, A. (2004): **Photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 functions as a transcriptional activator in rod photoreceptors.** *Hum Mol Genet* **13**:1563-1575.
102. Cheng, T., Peachey, N. S., Li, S., Goto, Y., Cao, Y. y Naash, M. I. (1997): **The effect of peripherin/rds haploinsufficiency on rod and cone photoreceptors.** *J Neurosci* **17**:8118-8128.
103. Chow, R. L. y Lang, R. A. (2001): **Early eye development in vertebrates.** *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**:255-296.
104. Cideciyan, A. V., Hood, D. C., Huang, Y., Banin, E., Li, Z. Y., Stone, E. M., Milam, A. H. y Jacobson, S. G. (1998): **Disease sequence from mutant rhodopsin allele to rod and cone photoreceptor degeneration in man.** *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:7103-7108.
105. Clarke, G., Goldberg, A. F., Vidgen, D., Collins, L., Ploder, L., Schwarz, L., Molday, L. L., Rossant, J., Szel, A., Molday, R. S., Birch, D. G. y McInnes, R. R. (2000a): **Rom-1 is required for rod photoreceptor viability and the regulation of disk morphogenesis.** *Nat Genet* **25**:67-73.
106. Clarke, G., Goldberg, A. F., Vidgen, D., Collins, L., Ploder, L., Schwarz, L., Molday, L. L., Rossant, J., Szel, A., Molday, R. S., Birch, D. G. y McInnes, R. R. (2000b): **Rom-1 is required for rod photoreceptor viability and the regulation of disk morphogenesis.** *Nat Genet* **25**:67-73.
107. Collins, C., Hutchinson, G., Kowbel, D., Riess, O., Weber, B. y Hayden, M. R. (1992): **The human beta-subunit of rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase: complete retinal cDNA sequence and evidence for expression in brain.** *Genomics* **13**:698-704.
108. Connell, G., Bascom, R., Molday, L., Reid, D., McInnes, R. R. y Molday, R. S. (1991): **Photoreceptor peripherin is the normal product of the gene responsible for retinal degeneration in the rds mouse.** *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:723-726.
109. Connell, G. J. y Molday, R. S. (1990): **Molecular cloning, primary structure, and orientation of the vertebrate photoreceptor cell protein peripherin in the rod outer segment disk membrane.** *Biochemistry* **29**:4691-4698.
110. Cook, N. J., Hanke, W. y Kaupp, U. B. (1987): **Identification, purification, and functional reconstitution of the cyclic GMP-dependent channel from rod photoreceptors.** *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:585-589.
111. Cook, T. A., Ghomashchi, F., Gelb, M. H., Florio, S. K. y Beavo, J. A. (2001): **The delta subunit of type 6 phosphodiesterase reduces light-induced cGMP hydrolysis in rod outer segments.** *J Biol Chem* **276**:5248-5255.
112. Coppieters, F., Leroy, B. P., Beysen, D., Hellemsans, J., De, B. K., Haegeman, G., Robberecht, K., Wuyts, W., Coucke, P. J. y De, B. E. (2007): **Recurrent mutation in the first zinc finger of the orphan nuclear receptor NR2E3 causes autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Am J Hum Genet* **81**:147-157.

113. Corbeil, D., Roper, K., Hannah, M. J., Hellwig, A. y Huttner, W. B. (1999): **Selective localization of the polytopic membrane protein prominin in microvilli of epithelial cells - a combination of apical sorting and retention in plasma membrane protrusions.** *J Cell Sci* **112** (Pt 7):1023-1033.
114. Cote, R. H., Bownds, M. D. y Arshavsky, V. Y. (1994): **cGMP binding sites on photoreceptor phosphodiesterase: role in feedback regulation of visual transduction.** *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:4845-4849.
115. Cotran, P. R., Ringens, P. J., Crabb, J. W., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (1990): **Analysis of the DNA of patients with retinitis pigmentosa with a cellular retinaldehyde binding protein cDNA.** *Exp Eye Res* **51**:15-19.
116. Crabb, J. W., Goldflam, S., Harris, S. E. y Saari, J. C. (1988): **Cloning of the cDNAs encoding the cellular retinaldehyde-binding protein from bovine and human retina and comparison of the protein structures.** *J Biol Chem* **263**:18688-18692.
117. Cremers, F. P., Kimberling, W. J., Kulm, M., de Brouwer, A. P., van, W. E., te, B. H., Cremers, C. W., Hoefsloot, L. H., Banfi, S., Simonelli, F., Fleischhauer, J. C., Berger, W., Kelley, P. M., Haralambous, E., Bitner-Glindzicz, M., Webster, A. R., Saihan, Z., De, B. E., Leroy, B. P., Silvestri, G., McKay, G. J., Koenekoop, R. K., Millán, J. M., Rosenberg, T., Joensuu, T., Sankila, E. M., Weil, D., Weston, M. D., Wissinger, B. y Kremer, H. (2007): **Development of a genotyping microarray for Usher syndrome.** *J Med Genet* **44**:153-160.
118. Cremers, F. P., van de Pol, D. J., van, D. M., den Hollander, A. I., van Haren, F. J., Knoers, N. V., Tijmes, N., Bergen, A. A., Rohrschneider, K., Blankenagel, A., Pinckers, A. J., Deutman, A. F. y Hoyng, C. B. (1998): **Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR.** *Hum Mol Genet* **7**:355-362.
119. Curcio, C. A., Millican, C. L., Allen, K. A. y Kalina, R. E. (1993): **Aging of the human photoreceptor mosaic: evidence for selective vulnerability of rods in central retina.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**:3278-3296.

D

120. D'Cruz, P. M., Yasumura, D., Weir, J., Matthes, M. T., Abderrahim, H., Lavail, M. M. y Vollrath, D. (2000): **Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat.** *Hum Mol Genet* **9**:645-651.
121. Daiger, S. P., Bowne, S. J. y Sullivan, L. S. (2007): **Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa.** *Arch Ophthalmol* **125**:151-158.
122. Danciger, M., Blaney, J., Gao, Y. Q., Zhao, D. Y., Heckenlively, J. R., Jacobson, S. G. y Farber, D. B. (1995): **Mutations in the *PDE6B* gene in autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *Genomics* **30**:1-7.
123. Danciger, M., Heilbron, V., Gao, Y. Q., Zhao, D. Y., Jacobson, S. G. y Farber, D. B. (1996): **A homozygous *PDE6B* mutation in a family with autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *Mol Vis* **2**:10.
124. Dandekar, S. S., Ebenezer, N. D., Grayson, C., Chapple, J. P., Egan, C. A., Holder, G. E., Jenkins, S. A., Fitzke, F. W., Cheetham, M. E., Webster, A. R. y Hardcastle, A. J. (2004): **An atypical phenotype of macular and peripapillary retinal atrophy caused by a mutation in the *RP2* gene.** *Br J Ophthalmol* **88**:528-532.
125. Daniele, L. L., Adams, R. H., Durante, D. E., Pugh, E. N. y Philp, N. J. (2007): **Novel distribution of junctional adhesion molecule-C in the neural retina and retinal pigment epithelium.** *J Comp Neurol* **505**:166-176.
126. De Luca, A., Torrente, I., Mangino, M., Danesi, R., Dallapiccola, B. y Novelli, G. (2001): **Three novel mutations causing a truncated protein within the *RP2* gene in Italian families with X-linked retinitis pigmentosa.** *Mutat Res* **432**:79-82.
127. DeAngelis, M. M., Grimsby, J. L., Sandberg, M. A., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (2002): **Novel mutations in the *NRL* gene and associated clinical findings in patients with dominant retinitis pigmentosa.** *Arch Ophthalmol* **120**:369-375.
128. Demirci, F. Y., Radak, A. L., Rigatti, B. W., Mah, T. S. y Gorin, M. B. (2004): **A presumed missense mutation of *RPGR* causes abnormal RNA splicing with exon skipping.** *Am J Ophthalmol* **138**:504-505.
129. Demirci, F. Y., Rigatti, B. W., Wen, G., Radak, A. L., Mah, T. S., Baic, C. L., Traboulsi, E. I., Alitalo, T., Ramser, J. y Gorin, M. B. (2002): **X-linked cone-rod dystrophy (locus *COD1*): identification of mutations in *RPGR* exon *ORF15*.** *Am J Hum Genet* **70**:1049-1053.
130. Demirci, F. Y. K., Rigatti, B. W., Mah, T. S. y Gorin, M. B. (2006): **A novel *RPGR* exon *ORF15* mutation in a family with X-linked Retinitis Pigmentosa and Coats'-like exudative vasculopathy.** *Am J Ophthalmol* **141**:208-210.

131. den Hollander, A. I., Davis, J., van der Velde-Visser SD, Zonneveld, M. N., Pierrottet, C. O., Koenekoop, R. K., Kellner, U., van den Born, L. I., Heckenlively, J. R., Hoyng, C. B., Handford, P. A., Roepman, R. y Cremers, F. P. (2004): **CRB1 mutation spectrum in inherited retinal dystrophies.** *Hum Mutat* **24**:355-369.
132. den Hollander, A. I., Heckenlively, J. R., van den Born, L. I., de Kok, Y. J., van der Velde-Visser SD, Kellner, U., Jurklics, B., van Schooneveld, M. J., Blankenagel, A., Rohrschneider, K., Wissinger, B., Cruysberg, J. R., Deutman, A. F., Brunner, H. G., pfelstedt-Sylla, E., Hoyng, C. B. y Cremers, F. P. (2001): **Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (CRB1) gene.** *Am J Hum Genet* **69**:198-203.
133. den Hollander, A. I., ten Brink, J. B., de Kok, Y. J., van, S. S., van den Born, L. I., van Driel, M. A., van de Pol, D. J., Payne, A. M., Bhattacharya, S. S., Kellner, U., Hoyng, C. B., Westerveld, A., Brunner, H. G., Bleeker-Wagemakers, E. M., Deutman, A. F., Heckenlively, J. R., Cremers, F. P. y Bergen, A. A. (1999a): **Mutations in a human homologue of Drosophila crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12).** *Nat Genet* **23**:217-221.
134. den Hollander, A. I., van der Velde-Visser SD, Pinckers, A. J., Hoyng, C. B., Brunner, H. G. y Cremers, F. P. (1999b): **Refined mapping of the gene for autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP17) on chromosome 17q22.** *Hum Genet* **104**:73-76.
135. den Hollander, A. I., van Driel, M. A., de Kok, Y. J., van de Pol, D. J., Hoyng, C. B., Brunner, H. G., Deutman, A. F. y Cremers, F. P. (1999c): **Isolation and mapping of novel candidate genes for retinal disorders using suppression subtractive hybridization.** *Genomics* **58**:240-249.
136. Dewar, A. J. y Reading, H. W. (1975): **The biochemical aspects of Retinitis Pigmentosa.** *Int.J.Biochem.* **6**:615-641.
137. Dhallan, R. S., Macke, J. P., Eddy, R. L., Shows, T. B., Reed, R. R., Yau, K. W. y Nathans, J. (1992): **Human rod photoreceptor cGMP-gated channel: amino acid sequence, gene structure, and functional expression.** *J Neurosci* **12**:3248-3256.
138. Dietrich, K., Jacobi, F. K., Tippmann, S., Schmid, R., Zrenner, E., Wissinger, B. y pfelstedt-Sylla, E. (2002): **A novel mutation of the RP1 gene (Lys778ter) associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Br J Ophthalmol* **86**:328-332.
139. Dowling, J. E. y Sidman, R. L. (1962): **Inherited retinal dystrophy in the rat.** *J Cell Biol* **14**:73-109.
140. Dry, K. L., Manson, F. D., Lennon, A., Bergen, A. A., Van Dorp, D. B. y Wright, A. F. (1999): **Identification of a 5' splice site mutation in the RPGR gene in a family with X-linked retinitis pigmentosa (RP3).** *Hum Mutat* **13**:141-145.
141. Dryja, T. P., Adams, S. M., Grimsby, J. L., McGee, T. L., Hong, D. H., Li, T., Andreasson, S. y Berson, E. L. (2001): **Null RPGRIP1 alleles in patients with Leber congenital amaurosis.** *Am J Hum Genet* **68**:1295-1298.
142. Dryja, T. P. y Berson, E. L. (1995): **Retinitis pigmentosa and allied diseases. Implications of genetic heterogeneity.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**:1197-1200.
143. Dryja, T. P., Berson, E. L., Rao, V. R. y Oprian, D. D. (1993): **Heterozygous missense mutation in the rhodopsin gene as a cause of congenital stationary night blindness.** *Nat Genet* **4**:280-283.
144. Dryja, T. P., Finn, J. T., Peng, Y. W., McGee, T. L., Berson, E. L. y Yau, K. W. (1995): **Mutations in the gene encoding the alpha subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:10177-10181.
145. Dryja, T. P., Hahn, L. B., Cowley, G. S., McGee, T. L. y Berson, E. L. (1991): **Mutation spectrum of the rhodopsin gene among patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:9370-9374.
146. Dryja, T. P., Hahn, L. B., Kajiwara, K. y Berson, E. L. (1997): **Dominant and digenic mutations in the peripherin/RDS and ROM1 genes in retinitis pigmentosa.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**:1972-1982.
147. Dryja, T. P., McEvoy, J. A., McGee, T. L. y Berson, E. L. (2000): **Novel rhodopsin mutations Gly114Val and Gln184Pro in dominant retinitis pigmentosa.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**:3124-3127.
148. Dryja, T. P., Rucinski, D. E., Chen, S. H. y Berson, E. L. (1999): **Frequency of mutations in the gene encoding the alpha subunit of rod cGMP-phosphodiesterase in autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**:1859-1865.
149. Dunaief, J. L., Dentchev, T., Ying, G. S. y Milam, A. H. (2002): **The role of apoptosis in age-related macular degeneration.** *Arch Ophthalmol* **120**:1435-1442.
150. Duncan, J. L., Lavail, M. M., Yasumura, D., Matthes, M. T., Yang, H., Trautmann, N., Chappelow, A. V., Feng, W., Earp, H. S., Matsushima, G. K. y Vollrath, D. (2003): **An RCS-like retinal dystrophy phenotype in mer knockout mice.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:826-838.

E

151. Ebenezer, N. D., Michaelides, M., Jenkins, S. A., Audo, I., Webster, A. R., Cheetham, M. E., Stockman, A., Maher, E. R., Ainsworth, J. R., Yates, J. R., Bradshaw, K., Holder, G. E., Moore, A. T. y Hardcastle, A. J. (2005): **Identification of novel RPGR ORF15 mutations in X-linked progressive cone-rod dystrophy (XLCORD) families.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**:1891-1898.
152. Ecklund, W. J. (2000): **Retinitis pigmentosa: distribution of inheritance patterns in a VA blind rehabilitation center population.** *Clin Eye Vis Care* **12**:107-112.
153. Eckmiller, M. S. (2004): **Defective cone photoreceptor cytoskeleton, alignment, feedback, and energetics can lead to energy depletion in macular degeneration.** *Prog Retin Eye Res* **23**:495-522.
154. Eichers, E. R., Green, J. S., Stockton, D. W., Jackman, C. S., Whelan, J., McNamara, J. A., Johnson, G. J., Lupski, J. R. y Katsanis, N. (2002): **Newfoundland rod-cone dystrophy, an early-onset retinal dystrophy, is caused by splice-junction mutations in RLBPI.** *Am J Hum Genet* **70**:955-964.
155. El Matri L., Ambresin, A., Schorderet, D. F., Kawasaki, A., Seeliger, M. W., Wenzel, A., Arsenijevic, Y., Borruat, F. X. y Munier, F. L. (2006): **Phenotype of three consanguineous Tunisian families with early-onset retinal degeneration caused by an R91W homozygous mutation in the RPE65 gene.** *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **244**:1104-1112.
156. Eudy, J. D., Weston, M. D., Yao, S., Hoover, D. M., Rehm, H. L., Ma-Edmonds, M., Yan, D., Ahmad, I., Cheng, J. J., Ayuso, C., Cremers, C., Davenport, S., Moller, C., Talmadge, C. B., Beisel, K. W., Tamayo, M., Morton, C. C., Swaroop, A., Kimberling, W. J. y Sumegi, J. (1998): **Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa.** *Science* **280**:1753-1757.

F

157. Falls, H. F. (1952): **The role of the sex chromosome in hereditary ocular pathology.** *Trans Am Ophthalmol Soc* **50**:421-467.
158. Fariss, R. N., Li, Z. Y. y Milam, A. H. (2000): **Abnormalities in rod photoreceptors, amacrine cells, and horizontal cells in human retinas with retinitis pigmentosa.** *Am J Ophthalmol* **129**:215-223.
159. Farjo, Q., Jackson, A., Pieke-Dahl, S., Scott, K., Kimberling, W. J., Sieving, P. A., Richards, J. E. y Swaroop, A. (1997): **Human bZIP transcription factor gene NRL: structure, genomic sequence, and fine linkage mapping at 14q11.2 and negative mutation analysis in patients with retinal degeneration.** *Genomics* **45**:395-401.
160. Farjo, R., Skaggs, J. S., Nagel, B. A., Quiambao, A. B., Nash, Z. A., Fliesler, S. J. y Naash, M. I. (2006): **Retention of function without normal disc morphogenesis occurs in cone but not rod photoreceptors.** *J Cell Biol* **173**:59-68.
161. Farrar, G. J., Kenna, P., Jordan, S. A., Kumar-Singh, R., Humphries, M. M., Sharp, E. M., Sheils, D. y Humphries, P. (1992): **Autosomal dominant retinitis pigmentosa: a novel mutation at the peripherin/RDS locus in the original 6p-linked pedigree.** *Genomics* **14**:805-807.
162. Farrar, G. J., Kenna, P., Jordan, S. A., Kumar-Singh, R., Humphries, M. M., Sharp, E. M., Sheils, D. M. y Humphries, P. (1991a): **A three-base-pair deletion in the peripherin-RDS gene in one form of retinitis pigmentosa.** *Nature* **354**:478-480.
163. Farrar, G. J., Kenna, P., Redmond, R., Shiels, D., McWilliam, P., Humphries, M. M., Sharp, E. M., Jordan, S., Kumar-Singh, R. y Humphries, P. (1991b): **Autosomal dominant retinitis pigmentosa: a mutation in codon 178 of the rhodopsin gene in two families of Celtic origin.** *Genomics* **11**:1170-1171.
164. Farrar, G. J., Kenna, P. F. y Humphries, P. (2002): **On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention.** *EMBO J* **21**:857-864.
165. Farrar, G. J., McWilliam, P., Bradley, D. G., Kenna, P., Lawler, M., Sharp, E. M., Humphries, M. M., Eiberg, H., Conneally, P. M., Trofatter, J. A. y Humphries, P. (1990): **Autosomal dominant retinitis pigmentosa: linkage to rhodopsin and evidence for genetic heterogeneity.** *Genomics* **8**:35-40.
166. Felbor, U., Schilling, H. y Weber, B. H. (1997): **Adult vitelliform macular dystrophy is frequently associated with mutations in the peripherin/RDS gene.** *Hum Mutat* **10**:301-309.
167. Feng, W., Yasumura, D., Matthes, M. T., Lavail, M. M. y Vollrath, D. (2002): **Mertk triggers uptake of photoreceptor outer segments during phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells.** *J Biol Chem* **277**:17016-17022.

168. Finckh, U., Xu, S., Kumaramanickavel, G., Schurmann, M., Makkadan, J. K., Fernandez, S. T., John, S., Weber, J. L., Denton, M. J. y Gal, A. (1998): **Homozygosity mapping of autosomal recessive retinitis pigmentosa locus (RP22) on chromosome 16p12.1-p12.3.** *Genomics* **48**:341-345.
169. Finnemann, S. C. (2003): **Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors.** *EMBO J* **22**:4143-4154.
170. Finnemann, S. C., Bonilha, V. L., Marmorstein, A. D. y Rodríguez-Boulan, E. (1997): **Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization.** *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:12932-12937.
171. Finnemann, S. C., Leung, L. W. y Rodríguez-Boulan, E. (2002): **The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium.** *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:3842-3847.
172. Finnemann, S. C. y Rodríguez-Boulan, E. (1999): **Macrophage and retinal pigment epithelium phagocytosis: apoptotic cells and photoreceptors compete for alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins, and protein kinase C regulates alphavbeta5 binding and cytoskeletal linkage.** *J Exp Med* **190**:861-874.
173. Finnemann, S. C. y Silverstein, R. L. (2001): **Differential roles of CD36 and alphavbeta5 integrin in photoreceptor phagocytosis by the retinal pigment epithelium.** *J Exp Med* **194**:1289-1298.
174. Fiore, R. y Puschel, A. W. (2003): **The function of semaphorins during nervous system development.** *Front Biosci* **8**:s484-s499.
175. Fishman, G. A., Grover, S., Buraczynska, M., Wu, W. y Swaroop, A. (1998a): **A new 2-base pair deletion in the RPGR gene in a black family with X-linked retinitis pigmentosa.** *Arch Ophthalmol* **116**:213-218.
176. Fishman, G. A., Grover, S., Jacobson, S. G., Alexander, K. R., Derlacki, D. J., Wu, W., Buraczynska, M. y Swaroop, A. (1998b): **X-linked retinitis pigmentosa in two families with a missense mutation in the RPGR gene and putative change of glycine to valine at codon 60.** *Ophthalmology* **105**:2286-2296.
177. Fishman, G. A., Roberts, M. F., Derlacki, D. J., Grimsby, J. L., Yamamoto, H., Sharon, D., Nishiguchi, K. M. y Dryja, T. P. (2004): **Novel mutations in the cellular retinaldehyde-binding protein gene (RLBP1) associated with retinitis punctata albescens: evidence of interfamilial genetic heterogeneity and fundus changes in heterozygotes.** *Arch Ophthalmol* **122**:70-75.
178. Flannery, J. G. y Fisher, S. K. (1984): **Circadian disc shedding in Xenopus retina in vitro.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **25**:229-232.
179. Fliegeauf, M., Benzing, T. y Omran, H. (2007): **When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies.** *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:880-893.
180. Fong, H. K., Lin, M. Y. y Pandey, S. (2006): **Exon-skipping variant of RGR opsin in human retina and pigment epithelium.** *Exp Eye Res* **83**:133-140.
181. Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D. A., Engel, A. y Palczewski, K. (2004): **The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane.** *FEBS Lett* **564**:281-288.
182. Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D. A., Engel, A. y Palczewski, K. (2003): **Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes.** *Nature* **421**:127-128.
183. Frago, L. M., Canon, S., de la Rosa, E. J., Leon, Y. y Varela-Nieto, I. (2003): **Programmed cell death in the developing inner ear is balanced by nerve growth factor and insulin-like growth factor I.** *J Cell Sci* **116**:475-486.
184. Freund, C. L., Gregory-Evans, C. Y., Furukawa, T., Papaioannou, M., Looser, J., Ploder, L., Bellingham, J., Ng, D., Herbrick, J. A., Duncan, A., Scherer, S. W., Tsui, L. C., Loutradis-Anagnostou, A., Jacobson, S. G., Cepko, C. L., Bhattacharya, S. S. y McInnes, R. R. (1997): **Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor.** *Cell* **91**:543-553.
185. Freund, C. L., Wang, Q. L., Chen, S., Muskat, B. L., Wiles, C. D., Sheffield, V. C., Jacobson, S. G., McInnes, R. R., Zack, D. J. y Stone, E. M. (1998): **De novo mutations in the CRX homeobox gene associated with Leber congenital amaurosis.** *Nat Genet* **18**:311-312.
186. Fuchs, S., Nakazawa, M., Maw, M., Tamai, M., Oguchi, Y. y Gal, A. (1995): **A homozygous 1-base pair deletion in the arrestin gene is a frequent cause of Oguchi disease in Japanese.** *Nat Genet* **10**:360-362.
187. Fujita, R., Buraczynska, M., Gieser, L., Wu, W., Forsythe, P., Abrahamson, M., Jacobson, S. G., Sieving, P. A., Andreasson, S. y Swaroop, A. (1997): **Analysis of the RPGR gene in 11 pedigrees with the retinitis pigmentosa type 3**

genotype: paucity of mutations in the coding region but splice defects in two families. *Am J Hum Genet* **61**:571-580.

188. Fukui, T., Yamamoto, S., Nakano, K., Tsujikawa, M., Morimura, H., Nishida, K., Ohguro, N., Fujikado, T., Irifune, M., Kuniyoshi, K., Okada, A. A., Hirakata, A., Miyake, Y. y Tano, Y. (2002): **ABCA4 gene mutations in Japanese patients with Stargardt disease and retinitis pigmentosa.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:2819-2824.
189. Furukawa, T., Morrow, E. M. y Cepko, C. L. (1997): **Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation.** *Cell* **91**:531-541.
190. Furukawa, T., Morrow, E. M., Li, T., Davis, F. C. y Cepko, C. L. (1999): **Retinopathy and attenuated circadian entrainment in Crx-deficient mice.** *Nat Genet* **23**:466-470.

G

191. Gal, A., Li, Y., Thompson, D. A., Weir, J., Orth, U., Jacobson, S. G., pfelstedt-Sylla, E. y Vollrath, D. (2000): **Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa.** *Nat Genet* **26**:270-271.
192. Gal, A., Orth, U., Baehr, W., Schwinger, E. y Rosenberg, T. (1994): **Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in autosomal dominant stationary night blindness.** *Nat Genet* **7**:64-68.
193. Gamundi, M. J., Hernan, I., Martínez-Gimeno, M., Maseras, M., García-Sandoval, B., Ayuso, C., Antiñolo, G., Baiget, M. y Carballo, M. (2006): **Three novel and the common Arg677Ter RP1 protein truncating mutations causing autosomal dominant retinitis pigmentosa in a Spanish population.** *BMC Med Genet* **7**:35.
194. Gamundi, M. J., Hernan, I., Maseras, M., Baiget, M., Ayuso, C., Borrego, S., Antiñolo, G., Millán, J. M., Valverde, D. y Carballo, M. (2005): **Sequence variations in the retinal fascin FSCN2 gene in a Spanish population with autosomal dominant retinitis pigmentosa or macular degeneration.** *Mol Vis* **11**:922-928.
195. Gao, H. y Hollyfield, J. G. (1992): **Aging of the human retina. Differential loss of neurons and retinal pigment epithelial cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **33**:1-17.
196. Gao, J., Cheon, K., Nusinowitz, S., Liu, Q., Bei, D., Atkins, K., Azimi, A., Daiger, S. P., Farber, D. B., Heckenlively, J. R., Pierce, E. A., Sullivan, L. S. y Zuo, J. (2002): **Progressive photoreceptor degeneration, outer segment dysplasia, and rhodopsin mislocalization in mice with targeted disruption of the retinitis pigmentosa-1 (Rp1) gene.** *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:5698-5703.
197. Gao, Y. Q., Danciger, M., Zhao, D. Y., Blaney, J., Piriev, N. I., Shih, J., Jacobson, S. G., Heckenlively, J. H. y Farber, D. B. (1996): **Screening of the PDE6B gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Exp Eye Res* **62**:149-154.
198. García-Hoyos, M., García-Sandoval, B., Cantalapiedra, D., Riveiro, R., Lorda-Sanchez, I., Trujillo-Tiebas, M. J., Rodríguez DE, A. M., Millán, J. M., Baiget, M., Ramos, C. y Ayuso, C. (2006): **Mutational screening of the RP2 and RPGR genes in Spanish families with X-linked retinitis pigmentosa.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**:3777-3782.
199. Gerber, S., Rozet, J. M., Bonneau, D., Souied, E., Camuzat, A., Dufier, J. L., Amalric, P., Weissenbach, J., Munnich, A. y Kaplan, J. (1995): **A gene for late-onset fundus flavimaculatus with macular dystrophy maps to chromosome 1p13.** *Am J Hum Genet* **56**:396-399.
200. Gerber, S., Rozet, J. M., Takezawa, S. I., dos Santos, L. C., Lopes, L., Gribouval, O., Penet, C., Perrault, I., Ducroq, D., Souied, E., Jeanpierre, M., Romana, S., Frezal, J., Ferraz, F., Yu-Umesono, R., Munnich, A. y Kaplan, J. (2000): **The photoreceptor cell-specific nuclear receptor gene (PNR) accounts for retinitis pigmentosa in the Crypto-Jews from Portugal (Marranos), survivors from the Spanish Inquisition.** *Hum Genet* **107**:276-284.
201. Gerber, S., Rozet, J. M., van de Pol, T. J., Hoyng, C. B., Munnich, A., Blankenagel, A., Kaplan, J. y Cremers, F. P. (1998): **Complete exon-intron structure of the retina-specific ATP binding transporter gene (ABCR) allows the identification of novel mutations underlying Stargardt disease.** *Genomics* **48**:139-142.
202. German, O. L., Miranda, G. E., Abrahan, C. E. y Rotstein, N. P. (2006): **Ceramide is a mediator of apoptosis in retina photoreceptors.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**:1658-1668.
203. Gieser, L., Fujita, R., Goring, H. H., Ott, J., Hoffman, D. R., Cideciyan, A. V., Birch, D. G., Jacobson, S. G. y Swaroop, A. (1998): **A novel locus (RP24) for X-linked retinitis pigmentosa maps to Xq26-27.** *Am J Hum Genet* **63**:1439-1447.

204. Gire, A. I., Sullivan, L. S., Bowne, S. J., Birch, D. G., Hughbanks-Wheaton, D., Heckenlively, J. R. y Daiger, S. P. (2007): **The Gly56Arg mutation in NR2E3 accounts for 1-2% of autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Mol Vis* **13**:1970-1975.
205. Goldberg, A. F. (2006): **Role of peripherin/rds in vertebrate photoreceptor architecture and inherited retinal degenerations.** *Int Rev Cytol* **253**:131-175.
206. Goldberg, A. F. y Molday, R. S. (1996): **Defective subunit assembly underlies a digenic form of retinitis pigmentosa linked to mutations in peripherin/rds and rom-1.** *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:13726-13730.
207. Goldstein, O., Zangerl, B., Pearce-Kelling, S., Sidjanin, D. J., Kijas, J. W., Felix, J., Acland, G. M. y Aguirre, G. D. (2006): **Linkage disequilibrium mapping in domestic dog breeds narrows the progressive rod-cone degeneration interval and identifies ancestral disease-transmitting chromosome.** *Genomics* **88**:541-550.
208. Gollapalli, D. R., Maiti, P. y Rando, R. R. (2003): **RPE65 operates in the vertebrate visual cycle by stereospecifically binding all-trans-retinyl esters.** *Biochemistry* **42**:11824-11830.
209. Gollapalli, D. R. y Rando, R. R. (2004): **The specific binding of retinoic acid to RPE65 and approaches to the treatment of macular degeneration.** *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:10030-10035.
210. Gollapalli, D. R. y Rando, R. R. (2003): **All-trans-retinyl esters are the substrates for isomerization in the vertebrate visual cycle.** *Biochemistry* **42**:5809-5818.
211. Govardovskii, V. I., Calvert, P. D. y Arshavsky, V. Y. (2000): **Photoreceptor light adaptation. Untangling desensitization and sensitization.** *J Gen Physiol* **116**:791-794.
212. Graham, D. K., Dawson, T. L., Mullaney, D. L., Snodgrass, H. R. y Earp, H. S. (1994): **Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer.** *Cell Growth Differ* **5**:647-657.
213. Grainger, R. J. y Beggs, J. D. (2005): **Prp8 protein: at the heart of the spliceosome.** *RNA* **11**:533-557.
214. Grayson, C., Bartolini, F., Chapple, J. P., Willison, K. R., Bhamidipati, A., Lewis, S. A., Luthert, P. J., Hardcastle, A. J., Cowan, N. J. y Cheetham, M. E. (2002): **Localization in the human retina of the X-linked retinitis pigmentosa protein RP2, its homologue cofactor C and the RP2 interacting protein Arl3.** *Hum Mol Genet* **11**:3065-3074.
215. Gregory, C. Y., Abrams, T. A. y Hall, M. O. (1994): **Stimulation of A2 adenosine receptors inhibits the ingestion of photoreceptor outer segments by retinal pigment epithelium.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**:819-825.
216. Griffin, C. A., Ding, C. L., Jabs, E. W., Hawkins, A. L., Li, X. y Levine, M. A. (1993): **Human rod cGMP-gated cation channel gene maps to 4p12-->centromere by chromosomal in situ hybridization.** *Genomics* **16**:302-303.
217. Grover, S., Fishman, G. A. y Stone, E. M. (2004): **A novel IMPDH1 mutation (Arg231Pro) in a family with a severe form of autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Ophthalmology* **111**:1910-1916.
218. Gu, J. J., Kaiser-Rogers, K., Rao, K. y Mitchell, B. S. (1994): **Assignment of the human type I IMP dehydrogenase gene (IMPDH1) to chromosome 7q31.3-q32).** *Genomics* **24**:179-181.
219. Gu, S., Kumaramanickavel, G., Srikumari, C. R., Denton, M. J. y Gal, A. (1999): **Autosomal recessive retinitis pigmentosa locus RP28 maps between D2S1337 and D2S286 on chromosome 2p11-p15 in an Indian family.** *J Med Genet* **36**:705-707.
220. Gu, S., Lennon, A., Li, Y., Lorenz, B., Fossarello, M., North, M., Gal, A. y Wright, A. (1998): **Tubby-like protein-1 mutations in autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *Lancet* **351**:1103-1104.
221. Gu, S. M., Thompson, D. A., Srikumari, C. R., Lorenz, B., Finckh, U., Nicoletti, A., Murthy, K. R., Rathmann, M., Kumaramanickavel, G., Denton, M. J. y Gal, A. (1997): **Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy.** *Nat Genet* **17**:194-197.
222. Guillonneau, X., Piriev, N. I., Danciger, M., Kozak, C. A., Cideciyan, A. V., Jacobson, S. G. y Farber, D. B. (1999): **A nonsense mutation in a novel gene is associated with retinitis pigmentosa in a family linked to the RP1 locus.** *Hum Mol Genet* **8**:1541-1546.
223. Guttridge, K. L., Luft, J. C., Dawson, T. L., Kozłowska, E., Mahajan, N. P., Varnum, B. y Earp, H. S. (2002): **Mer receptor tyrosine kinase signaling: prevention of apoptosis and alteration of cytoskeletal architecture without stimulation or proliferation.** *J Biol Chem* **277**:24057-24066.

H

224. Hackam, A. S., Strom, R., Liu, D., Qian, J., Wang, C., Otteson, D., Gunatilaka, T., Farkas, R. H., Chowers, I., Kageyama, M., Leveillard, T., Sahel, J. A., Campochiaro, P. A., Parmigiani, G. y Zack, D. J. (2004): **Identification of gene expression changes associated with the progression of retinal degeneration in the rd1 mouse.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**:2929-2942.
225. Haeseleer, F., Jang, G. F., Imanishi, Y., Driessen, C. A., Matsumura, M., Nelson, P. S. y Palczewski, K. (2002): **Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina.** *J Biol Chem* **277**:45537-45546.
226. Hageman, G. S. y Johnson, L. V. (1991): **The photoreceptor-retinal pigmented epithelium interface.** En: *Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision.* Heckenlively, J. R. y Arden, G. B. Mosby Year Book. St. Louis. Págs: 53-68.
227. Hageman, G. S., Zhu, X. L., Waheed, A. y Sly, W. S. (1991): **Localization of carbonic anhydrase IV in a specific capillary bed of the human eye.** *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:2716-2720.
228. Hagstrom, S. A., Adamian, M., Scimeca, M., Pawlyk, B. S., Yue, G. y Li, T. (2001): **A role for the Tubby-like protein 1 in rhodopsin transport.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**:1955-1962.
229. Hagstrom, S. A., Duyao, M., North, M. A. y Li, T. (1999): **Retinal degeneration in tulp1^{-/-} mice: vesicular accumulation in the interphotoreceptor matrix.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**:2795-2802.
230. Hagstrom, S. A., North, M. A., Nishina, P. L., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (1998): **Recessive mutations in the gene encoding the tubby-like protein TULP1 in patients with retinitis pigmentosa.** *Nat Genet* **18**:174-176.
231. Haider, N. B., Jacobson, S. G., Cideciyan, A. V., Swiderski, R., Streb, L. M., Searby, C., Beck, G., Hockey, R., Hanna, D. B., Gorman, S., Duhl, D., Carmi, R., Bennett, J., Weleber, R. G., Fishman, G. A., Wright, A. F., Stone, E. M. y Sheffield, V. C. (2000): **Mutation of a nuclear receptor gene, NR2E3, causes enhanced S cone syndrome, a disorder of retinal cell fate.** *Nat Genet* **24**:127-131.
232. Haim, M. (2002): **Epidemiology of retinitis pigmentosa in Denmark.** *Acta Ophthalmol Scand* **80**: 1-34.
233. Hall, M. O. y Abrams, T. (1987): **Kinetic studies of rod outer segment binding and ingestion by cultured rat RPE cells.** *Exp Eye Res* **45**:907-922.
234. Hall, M. O., Abrams, T. A. y Mittag, T. W. (1993): **The phagocytosis of rod outer segments is inhibited by drugs linked to cyclic adenosine monophosphate production.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**:2392-2401.
235. Hall, M. O., Burgess, B. L., Abrams, T. A. y Martínez, M. O. (1996): **Carbachol does not correct the defect in the phagocytosis of outer segments by Royal College of Surgeons rat retinal pigment epithelial cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**:1473-1477.
236. Hall, M. O., Obin, M. S., Prieto, A. L., Burgess, B. L. y Abrams, T. A. (2002): **Gas6 binding to photoreceptor outer segments requires gamma-carboxyglutamic acid (Gla) and Ca(2+) and is required for OS phagocytosis by RPE cells in vitro.** *Exp Eye Res* **75**:391-400.
237. Hall, M. O., Prieto, A. L., Obin, M. S., Abrams, T. A., Burgess, B. L., Heeb, M. J. y Agnew, B. J. (2001): **Outer segment phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells requires Gas6.** *Exp Eye Res* **73**:509-520.
238. Hallett, M. A., Delaat, J. L., Arikawa, K., Schlamp, C. L., Kong, F. y Williams, D. S. (1996): **Distribution of guanylate cyclase within photoreceptor outer segments.** *J Cell Sci* **109** (Pt 7):1803-1812.
239. Hameed, A., Abid, A., Aziz, A., Ismail, M., Mehdi, S. Q. y Khaliq, S. (2003): **Evidence of RPGRIP1 gene mutations associated with recessive cone-rod dystrophy.** *J Med Genet* **40**:616-619.
240. Hameed, A., Khaliq, S., Ismail, M., Anwar, K., Mehdi, S. Q., Bessant, D., Payne, A. M. y Bhattacharya, S. S. (2001): **A new locus for autosomal recessive RP (RP29) mapping to chromosome 4q32-q34 in a Pakistani family.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**:1436-1438.
241. Hamel, C. (2006): **Retinitis pigmentosa.** *Orphanet.J Rare.Dis.* [on line] **1**:40. Disponible en: <http://www.orphandis.com/>
242. Hamel, C. P., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G. y Redmond, T. M. (1994): **The gene for the retinal pigment epithelium-specific protein RPE65 is localized to human 1p31 and mouse 3.** *Genomics* **20**:509-512.

243. Hamel, C. P., Tsilou, E., Pfeffer, B. A., Hooks, J. J., Detrick, B. y Redmond, T. M. (1993): **Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro.** *J Biol Chem* **268**:15751-15757.
244. Hamel, C. (2003): **Retinitis Pigmentosa.** *Orphanet Encyclopedia* [on line]. Disponible en: <http://www.orpha.net>
245. Hanein, S., Perrault, I., Gerber, S., Tanguy, G., Barbet, F., Ducroq, D., Calvas, P., Dollfus, H., Hamel, C., Loppönen, T., Munier, F., Santos, L., Shalev, S., Zafeiriou, D., Dufier, J. L., Munnich, A., Rozet, J. M. y Kaplan, J. (2004): **Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis.** *Hum Mutat* **23**:306-317.
246. Hanson, S. M., Van, E. N., Francis, D. J., Altenbach, C., Vishnivetskiy, S. A., Arshavsky, V. Y., Klug, C. S., Hubbell, W. L. y Gurevich, V. V. (2007): **Structure and function of the visual arrestin oligomer.** *EMBO J* **26**:1726-1736.
247. Hao, W. y Fong, H. K. (1996): **Blue and ultraviolet light-absorbing opsin from the retinal pigment epithelium.** *Biochemistry* **35**:6251-6256.
248. Hao, W. y Fong, H. K. (1999): **The endogenous chromophore of retinal G protein-coupled receptor opsin from the pigment epithelium.** *J Biol Chem* **274**:6085-6090.
249. Harada, T., Harada, C., Nakayama, N., Okuyama, S., Yoshida, K., Kohsaka, S., Matsuda, H. y Wada, K. (2000): **Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration.** *Neuron* **26**:533-541.
250. Hardcastle, A. J., Thiselton, D. L., Van, M. L., Saha, B. K., Jay, M., Plant, C., Taylor, R., Bird, A. C. y Bhattacharya, S. (1999): **Mutations in the RP2 gene cause disease in 10% of families with familial X-linked retinitis pigmentosa assessed in this study.** *Am J Hum Genet* **64**:1210-1215.
251. Hardcastle, A. J., Thiselton, D. L., Zito, I., Ebenezer, N., Mah, T. S., Gorin, M. B. y Bhattacharya, S. S. (2000): **Evidence for a new locus for X-linked retinitis pigmentosa (RP23).** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**:2080-2086.
252. Hargrave, P. A. y McDowell, J. H. (1992): **Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors.** *FASEB J* **6**:2323-2331.
253. Hartong, D. T., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (2006): **Retinitis pigmentosa.** *Lancet* **368**:1795-1809.
254. Hawkins, R. K., Jansen, H. G. y Sanyal, S. (1985): **Development and degeneration of retina in rds mutant mice: photoreceptor abnormalities in the heterozygotes.** *Exp Eye Res* **41**:701-720.
255. He, G. S. y Grabowski, G. A. (1992): **Gaucher disease: A G+1----A+1 IVS2 splice donor site mutation causing exon 2 skipping in the acid beta-glucosidase mRNA** *Am J Hum Genet* **51**:810-820.
256. He, W., Ikeda, S., Bronson, R. T., Yan, G., Nishina, P. M., North, M. A. y Naggert, J. K. (2000): **GFP-tagged expression and immunohistochemical studies to determine the subcellular localization of the tubby gene family members.** *Brain Res Mol Brain Res* **81**:109-117.
257. Heck, M., Schädel, S. A., Maretzki, D. y Hofmann, K. P. (2003): **Secondary binding sites of retinoids in opsin: characterization and role in regeneration.** *Vision Res* **43**:3003-3010.
258. Heckenlively, J. R., Chang, B., Erway, L. C., Peng, C., Hawes, N. L., Hageman, G. S. y Roderick, T. H. (1995): **Mouse model for Usher syndrome: linkage mapping suggests homology to Usher type I reported at human chromosome 11p15.** *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:11100-11104.
259. Heng, H. H., Wang, A. y Hu, J. (1998): **Mapping of the human HPRP3 and HPRP4 genes encoding U4/U6-associated splicing factors to chromosomes 1q21.1 and 9q31-q33.** *Genomics* **48**:273-275.
260. Herron, W. L., Riegel, B. W., Myers, O. E. y Rubin, M. L. (1969): **Retinal dystrophy in the rat--a pigment epithelial disease.** *Invest Ophthalmol* **8**:595-604.
261. Heth, C. A. y Marescalchi, P. A. (1994): **Inositol triphosphate generation in cultured rat retinal pigment epithelium.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**:409-416.
262. Heth, C. A. y Schmidt, S. Y. (1992): **Protein phosphorylation in retinal pigment epithelium of Long-Evans and Royal College of Surgeons rats.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **33**:2839-2847.
263. Higgins, M. K., Oprian, D. D. y Schertler, G. F. (2006): **Recoverin binds exclusively to an amphipathic peptide at the N terminus of rhodopsin kinase, inhibiting rhodopsin phosphorylation without affecting catalytic activity of the kinase.** *J Biol Chem* **281**:19426-19432.

264. Higgins, M. K., Weitz, D., Warne, T., Schertler, G. F. y Kaupp, U. B. (2002): **Molecular architecture of a retinal cGMP-gated channel: the arrangement of the cytoplasmic domains.** *EMBO J* **21**:2087-2094.
265. Hims, M. M., Diager, S. P. y Inglehearn, C. F. (2003): **Retinitis pigmentosa: genes, proteins and prospects.** *Dev Ophthalmol* **37**:109-125.
266. Hirsch, J. A., Schubert, C., Gurevich, V. V. y Sigler, P. B. (1999): **The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation.** *Cell* **97**:257-269.
267. Hisatomi, O. y Tokunaga, F. (2002): **Molecular evolution of proteins involved in vertebrate phototransduction.** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **133**:509-522.
268. Hoffmann, K. y Lindner, T. H. (2005): **easyLINKAGE-Plus--automated linkage analyses using large-scale SNP data.** *Bioinformatics.* **21**:3565-3567.
269. Holbrook, J. A., Neu-Yilik, G., Hentze, M. W. y Kulozik, A. E. (2004): **Nonsense-mediated decay approaches the clinic.** *Nat Genet* **36**:801-808.
270. Hollander, B. A., Liang, M. Y. y Besharse, J. C. (1999): **Linkage of a nucleolin-related protein and casein kinase II with the detergent-stable photoreceptor cytoskeleton.** *Cell Motil Cytoskel* **43**:114-127.
271. Hong, D. H. y Li, T. (2002): **Complex expression pattern of RPGR reveals a role for purine-rich exonic splicing enhancers.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:3373-3382.
272. Hong, D. H., Pawlyk, B., Sokolov, M., Strissel, K. J., Yang, J., Tulloch, B., Wright, A. F., Arshavsky, V. Y. y Li, T. (2003): **RPGR isoforms in photoreceptor connecting cilia and the transitional zone of motile cilia.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:2413-2421.
273. Hong, D. H., Pawlyk, B. S., Shang, J., Sandberg, M. A., Berson, E. L. y Li, T. (2000): **A retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-deficient mouse model for X-linked retinitis pigmentosa (RP3).** *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:3649-3654.
274. Hong, D. H., Yue, G., Adamian, M. y Li, T. (2001): **Retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGRr)-interacting protein is stably associated with the photoreceptor ciliary axoneme and anchors RPGR to the connecting cilium.** *J Biol Chem* **276**:12091-12099.
275. Hosking, L., Lumsden, S., Lewis, K., Yeo, A., McCarthy, L., Bansal, A., Riley, J., Purvis, I. y Xu, C. F. (2004): **Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing.** *Eur J Hum Genet* **12**:395-399.
276. Huang, P. C., Gaitan, A. E., Hao, Y., Petters, R. M. y Wong, F. (1993): **Cellular interactions implicated in the mechanism of photoreceptor degeneration in transgenic mice expressing a mutant rhodopsin gene.** *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:8484-8488.
277. Huang, S. H., Pittler, S. J., Huang, X., Oliveira, L., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (1995): **Autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the alpha subunit of rod cGMP phosphodiesterase.** *Nat Genet* **11**:468-471.
278. Humayun, M. S., Prince, M., de Juan E Jr, Barron, Y., Moskowitz, M., Klock, I. B. y Milam, A. H. (1999): **Morphometric analysis of the extramacular retina from postmortem eyes with retinitis pigmentosa.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**:143-148.
279. Humphries, M. M., Rancourt, D., Farrar, G. J., Kenna, P., Hazel, M., Bush, R. A., Sieving, P. A., Sheils, D. M., McNally, N., Creighton, P., Erven, A., Boros, A., Gulya, K., Capecchi, M. R. y Humphries, P. (1997): **Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene.** *Nat Genet* **15**:216-219.
280. Humphries, P., Farrar, G. J. y Kenna, P. (1993): **Autosomal dominant Retinitis Pigmentosa: molecular, genetic and clinical aspects.** *Prog Retin Res* **12**:231-245.
- I**
281. Iannaccone, A., Breuer, D. K., Wang, X. F., Kuo, S. F., Normando, E. M., Filippova, E., Baldi, A., Hiriyan, S., MacDonald, C. B., Baldi, F., Cosgrove, D., Morton, C. C., Swaroop, A. y Jablonski, M. M. (2003): **Clinical and immunohistochemical evidence for an X linked retinitis pigmentosa syndrome with recurrent infections and hearing loss in association with an RPGR mutation.** *J Med Genet* **40**:e118.
282. Ikeda, S., He, W., Ikeda, A., Naggert, J. K., North, M. A. y Nishina, P. M. (1999): **Cell-specific expression of tubby gene family members (tub, Tulp1,2, and 3) in the retina.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**:2706-2712.

283. Imanishi, Y., Batten, M. L., Piston, D. W., Baehr, W. y Palczewski, K. (2004): **Noninvasive two-photon imaging reveals retinyl ester storage structures in the eye.** *J Cell Biol* **164**:373-383.
284. Inagaki, Y., Mitsutake, S. y Igarashi, Y. (2006): **Identification of a nuclear localization signal in the retinitis pigmentosa-mutated RP26 protein, ceramide kinase-like protein.** *Biochem Biophys Res Commun* **343**:982-987.
285. Inglehearn, C. F., Carter, S. A., Keen, T. J., Lindsey, J., Stephenson, A. M., Bashir, R., Al-Magthteh, M., Moore, A. T., Jay, M., Bird, A. C. (1993): **A new locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 7p.** *Nat Genet* **4**:51-53.
286. Inglehearn, C. F., Keen, T. J., Al-Magthteh, M., Gregory, C. Y., Jay, M. R., Moore, A. T., Bird, A. C. y Bhattacharya, S. S. (1994): **Further refinement of the location for autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 7p (RP9).** *Am J Hum Genet* **54**:675-680.

J

287. Jaakson, K., Zernant, J., Kulm, M., Hutchinson, A., Tonisson, N., Glavac, D., Ravnik-Glavac, M., Hawlina, M., Meltzer, M. R., Caruso, R. C., Testa, F., Maugeri, A., Hoyng, C. B., Gouras, P., Simonelli, F., Lewis, R. A., Lupski, J. R., Cremers, F. P. y Allikmets, R. (2003): **Genotyping microarray (gene chip) for the ABCR (ABCA4) gene.** *Hum Mutat* **22**:395-403.
288. Jacobson, S. G., Buraczynska, M., Milam, A. H., Chen, C., Jarvalainen, M., Fujita, R., Wu, W., Huang, Y., Cideciyan, A. V. y Swaroop, A. (1997): **Disease expression in X-linked retinitis pigmentosa caused by a putative null mutation in the RPGR gene.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**:1983-1997.
289. Jacobson, S. G., Cideciyan, A. V., Aleman, T. S., Pianta, M. J., Sumaroka, A., Schwartz, S. B., Smilko, E. E., Milam, A. H., Sheffield, V. C. y Stone, E. M. (2003): **Crumbs homolog 1 (CRB1) mutations result in a thick human retina with abnormal lamination.** *Hum Mol Genet* **12**:1073-1078.
290. Jacobson, S. G., Cideciyan, A. V., Iannaccone, A., Weleber, R. G., Fishman, G. A., Maguire, A. M., Affatigato, L. M., Bennett, J., Pierce, E. A., Danciger, M., Farber, D. B. y Stone, E. M. (2000): **Disease expression of RP1 mutations causing autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**:1898-1908.
291. Jahng, W. J., David, C., Nesnas, N., Nakanishi, K. y Rando, R. R. (2003): **A cleavable affinity biotinylating agent reveals a retinoid binding role for RPE65.** *Biochemistry* **42**:6159-6168.
292. Jaszai, J., Fargeas, C. A., Florek, M., Huttner, W. B. y Corbeil, D. (2007): **Focus on molecules: prominin-1 (CD133).** *Exp Eye Res* **85**:585-586.
293. Jiang, M., Pandey, S. y Fong, H. K. (1993): **An opsin homologue in the retina and pigment epithelium.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**:3669-3678.
294. Jin, Z. B., Liu, X. Q., Uchida, A., Vervoort, R., Morishita, K., Hayakawa, M., Murakami, A., Matsumoto, N., Niikawa, N. y Nao-i N. (2005): **Novel deletion spanning RCC1-like domain of RPGR in Japanese X-linked retinitis pigmentosa family.** *Mol Vis* **11**:535-541.
295. John, S., Shephard, N., Liu, G., Zeggini, E., Cao, M., Chen, W., Vasavda, N., Mills, T., Barton, A., Hinks, A., Eyre, S., Jones, K. W., Ollier, W., Silman, A., Gibson, N., Worthington, J. y Kennedy, G. C. (2004): **Whole-genome scan, in a complex disease, using 11,245 single-nucleotide polymorphisms: comparison with microsatellites.** *Am J Hum Genet* **75**:54-64.
296. John, S. K., Smith, J. E., Aguirre, G. D. y Milam, A. H. (2000): **Loss of cone molecular markers in rhodopsin-mutant human retinas with retinitis pigmentosa.** *Mol Vis* **6**:204-215.
297. Jonas, J. B., Schneider, U. y Naumann, G. O. (1992): **Count and density of human retinal photoreceptors.** *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **230**:505-510.
298. Jones, S. E., Wood-Gush, H. G., Cunningham, J. R., Szczesny, P. J. y Neal, M. J. (1990): **Abnormalities in expression of human retinal mRNA** *Neurochem Int* **17**:495-503.
299. Jordan, S. A., Farrar, G. J., Kenna, P., Humphries, M. M., Sheils, D. M., Kumar-Singh, R., Sharp, E. M., Soriano, N., Ayuso, C., Benitez, J. y Humphries, P. (1993): **Localization of an autosomal dominant retinitis pigmentosa gene to chromosome 7q.** *Nat Genet* **4**:54-58.
300. Jordan, S. A., Farrar, G. J., Kumar-Singh, R., Kenna, P., Humphries, M. M., Allamand, V., Sharp, E. M. y Humphries, P. (1992): **Autosomal dominant retinitis pigmentosa (adRP; RP6): cosegregation of RP6 and the peripherin-RDS locus in a late-onset family of Irish origin.** *Am J Hum Genet* **50**:634-639.

K

301. Kajiwara, K., Hahn, L. B., Mukai, S., Travis, G. H., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (1991): **Mutations in the human retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Nature* **354**:480-483.
302. Kajiwara, K., Sandberg, M. A., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (1993): **A null mutation in the human peripherin/RDS gene in a family with autosomal dominant retinitis punctata albescens.** *Nat Genet* **3**:208-212.
303. Kanski, J. J. (2003): **Clinical Ophthalmology: A Systemic Approach.** 5ª Edición. Butterworth-Heinemann. Philadelphia. Págs: 491-494.
304. Kaplan, J., Gerber, S., Larget-Piet, D., Rozet, J. M., Dollfus, H., Dufier, J. L., Odent, S., Postel-Vinay, A., Janin, N., Briard, M. L., Frézal, J. y Munnich, A. (1993): **A gene for Stargardt's disease (fundus flavimaculatus) maps to the short arm of chromosome 1.** *Nat Genet* **5**:308-311.
305. Kaufman, K. L. y Aim, A. (2003): **Adler Fisiología del ojo.** 10ª Edición. Harcourt Brace & Company-ELSEVIER. Madrid. Pág: 363.
306. Kawamura, M., Wada, Y., Noda, Y., Itabashi, T., Ogawa, S., Sato, H., Tanaka, K., Ishibashi, T. y Tamai, M. (2004): **Novel 2336-2337delCT mutation in RP1 gene in a Japanese family with autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Am J Ophthalmol* **137**:1137-1139.
307. Kedziński, W., Bok, D. y Travis, G. H. (1998): **Non-cell-autonomous photoreceptor degeneration in rds mutant mice mosaic for expression of a rescue transgene.** *J Neurosci* **18**:4076-4082.
308. Kedziński, W., Bok, D. y Travis, G. H. (1999a): **Transgenic analysis of rds/peripherin N-glycosylation: effect on dimerization, interaction with rom1, and rescue of the rds null phenotype.** *J Neurochem* **72**:430-438.
309. Kedziński, W., Moghrabi, W. N., Allen, A. C., Jablonski-Stiemke, M. M., Azarian, S. M., Bok, D. y Travis, G. H. (1996): **Three homologs of rds/peripherin in *Xenopus laevis* photoreceptors that exhibit covalent and non-covalent interactions.** *J Cell Sci* **109** (Pt 10):2551-2560.
310. Kedziński, W., Nusinowitz, S., Birch, D., Clarke, G., McInnes, R. R., Bok, D. y Travis, G. H. (2001): **Deficiency of rds/peripherin causes photoreceptor death in mouse models of digenic and dominant retinitis pigmentosa.** *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:7718-7723.
311. Kedziński, W., Weng, J. y Travis, G. H. (1999b): **Analysis of the rds/peripherin.rom1 complex in transgenic photoreceptors that express a chimeric protein.** *J Biol Chem* **274**:29181-29187.
312. Keen, T. J., Hims, M. M., McKie, A. B., Moore, A. T., Doran, R. M., Mackey, D. A., Mansfield, D. C., Mueller, R. F., Bhattacharya, S. S., Bird, A. C., Markham, A. F. y Inglehearn, C. F. (2002): **Mutations in a protein target of the Pim-1 kinase associated with the RP9 form of autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Eur J Hum Genet* **10**:245-249.
313. Kennan, A., Aherne, A. y Humphries, P. (2005): **Light in retinitis pigmentosa.** *Trends Genet* **21**:103-110.
314. Kennan, A., Aherne, A., Palfi, A., Humphries, M., McKee, A., Stitt, A., Simpson, D. A., Demtroder, K., Orntoft, T., Ayuso, C., Kenna, P. F., Farrar, G. J. y Humphries, P. (2002): **Identification of an IMPDH1 mutation in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP10) revealed following comparative microarray analysis of transcripts derived from retinas of wild-type and Rho(-/-) mice.** *Hum Mol Genet* **11**:547-557.
315. Keresztes, G., Martemyanov, K. A., Krispel, C. M., Mutai, H., Yoo, P. J., Maison, S. F., Burns, M. E., Arshavsky, V. Y. y Heller, S. (2004): **Absence of the RGS9.Gbeta5 GTPase-activating complex in photoreceptors of the R9AP knockout mouse.** *J Biol Chem* **279**:1581-1584.
316. Khaliq, S., Abid, A., Ismail, M., Hameed, A., Mohyuddin, A., Lall, P., Aziz, A., Anwar, K. y Mehdi, S. Q. (2005): **Novel association of RP1 gene mutations with autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *J Med Genet* **42**:436-438.
317. Khaliq, S., Hameed, A., Ismail, M., Mehdi, S. Q., Bessant, D. A., Payne, A. M. y Bhattacharya, S. S. (1999): **Refinement of the locus for autosomal recessive Retinitis pigmentosa (RP25) linked to chromosome 6q in a family of Pakistani origin.** *Am J Hum Genet* **65**:571-574.
318. Khanna, H., Hurd, T. W., Lillo, C., Shu, X., Parapuram, S. K., He, S., Akimoto, M., Wright, A. F., Margolis, B., Williams, D. S. y Swaroop, A. (2005): **RPGR-ORF15, which is mutated in retinitis pigmentosa, associates with SMC1, SMC3, and microtubule transport proteins.** *J Biol Chem* **280**:33580-33587.

319. Kikawa, E., Nakazawa, M., Chida, Y., Shiono, T. y Tamai, M. (1994): **A novel mutation (Asn244Lys) in the peripherin/RDS gene causing autosomal dominant retinitis pigmentosa associated with bull's-eye maculopathy detected by nonradioisotopic SSCP.** *Genomics* **20**:137-139.
320. Kimberling, W. J., Weston, M. D., Moller, C., Davenport, S. L., Shugart, Y. Y., Priluck, I. A., Martini, A., Milani, M. y Smith, R. J. (1990): **Localization of Usher syndrome type II to chromosome 1q.** *Genomics* **7**:245-249.
321. Kimberling, W. J., Weston, M. D., Moller, C., Van, A. A., Cremers, C. W., Sumegi, J., Ing, P. S., Connolly, C., Martini, A., Milani, M., Tamayo, M. L., Bernal, J., Greenberg, J. y Ayuso, C. (1995): **Gene mapping of Usher syndrome type IIa: localization of the gene to a 2.1-cM segment on chromosome 1q41.** *Am J Hum Genet* **56**:216-223.
322. Kindzelskii, A. L., Elner, V. M., Elner, S. G., Yang, D., Hughes, B. A. y Petty, H. R. (2004): **Toll-like receptor 4 (TLR4) of retinal pigment epithelial cells participates in transmembrane signaling in response to photoreceptor outer segments.** *J Gen Physiol* **124**:139-149.
323. Kirschner, R., Rosenberg, T., Schultz-Heienbrok, R., Lenzner, S., Feil, S., Roepman, R., Cremers, F. P., Ropers, H. H. y Berger, W. (1999): **RPGR transcription studies in mouse and human tissues reveal a retina-specific isoform that is disrupted in a patient with X-linked retinitis pigmentosa.** *Hum Mol Genet* **8**:1571-1578.
324. Kivela, T. y Uusitalo, M. (1998): **Structure, development and function of cytoskeletal elements in non-neuronal cells of the human eye.** *Prog Retin Eye Res* **17**:385-428.
325. Klevering, B. J., Blankenagel, A., Maugeri, A., Cremers, F. P., Hoyng, C. B. y Rohrschneider, K. (2002): **Phenotypic spectrum of autosomal recessive cone-rod dystrophies caused by mutations in the ABCA4 (ABCR) gene.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:1980-1985.
326. Klevering, B. J., Maugeri, A., Wagner, A., Go, S. L., Vink, C., Cremers, F. P. y Hoyng, C. B. (2004a): **Three families displaying the combination of Stargardt's disease with cone-rod dystrophy or retinitis pigmentosa.** *Ophthalmology* **111**:546-553.
327. Klevering, B. J., Yzer, S., Rohrschneider, K., Zonneveld, M., Allikmets, R., van den Born, L. I., Maugeri, A., Hoyng, C. B. y Cremers, F. P. (2004b): **Microarray-based mutation analysis of the ABCA4 (ABCR) gene in autosomal recessive cone-rod dystrophy and retinitis pigmentosa.** *Eur J Hum Genet* **12**:1024-1032.
328. Kleyn, P. W., Fan, W., Kovats, S. G., Lee, J. J., Pulido, J. C., Wu, Y., Berkemeier, L. R., Misumi, D. J., Holmgren, L., Charlat, O., Woolf, E. A., Tayber, O., Brody, T., Shu, P., Hawkins, F., Kennedy, B., Baldini, L., Ebeling, C., Alperin, G. D., Deeds, J., Lakey, N. D., Culpepper, J., Chen, H., Glucksmann-Kuis, M. A., Carlson, G. A., Duyk, G. M. y Moore, K. J. (1996): **Identification and characterization of the mouse obesity gene *tubby*: a member of a novel gene family.** *Cell* **85**:281-290.
329. Kobayashi, M., Takezawa, S., Hara, K., Yu, R. T., Umesono, Y., Agata, K., Taniwaki, M., Yasuda, K. y Umesono, K. (1999): **Identification of a photoreceptor cell-specific nuclear receptor.** *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:4814-4819.
330. Koenekoop, R. K., Loyer, M., Hand, C. K., Al, M. H., Dembinska, O., Beneish, R., Racine, J. y Rouleau, G. A. (2003): **Novel RPGR mutations with distinct retinitis pigmentosa phenotypes in French-Canadian families.** *Am J Ophthalmol* **136**:678-687.
331. Kolb, H. (2003): **How the retina works.** *Am Sci* **91**:28-35.
332. Kondo, H., Qin, M., Mizota, A., Kondo, M., Hayashi, H., Hayashi, K., Oshima, K., Tahira, T. y Hayashi, K. (2004): **A homozygosity-based search for mutations in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa, using microsatellite markers.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**:4433-4439.
333. Kondo, H., Tahira, T., Mizota, A., chi-Usami, E., Oshima, K. y Hayashi, K. (2003): **Diagnosis of autosomal dominant retinitis pigmentosa by linkage-based exclusion screening with multiple locus-specific microsatellite markers.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:1275-1281.
334. Körschen, H. G., Beyermann, M., Muller, F., Heck, M., Vantler, M., Koch, K. W., Kellner, R., Wolfrum, U., Bode, C., Hofmann, K. P. y Kaupp, U. B. (1999): **Interaction of glutamic-acid-rich proteins with the cGMP signalling pathway in rod photoreceptors.** *Nature* **400**:761-766.
335. Kozminski, K. G., Beech, P. L. y Rosenbaum, J. L. (1995): **The Chlamydomonas kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane.** *J Cell Biol* **131**:1517-1527.
336. Kramer, R. H. y Molokanova, E. (2001): **Modulation of cyclic-nucleotide-gated channels and regulation of vertebrate phototransduction.** *J Exp Biol* **204**:2921-2931.
337. Kruglyak, L. (1997): **The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies.** *Nat Genet* **17**:21-24.
338. Kruglyak, L. y Nickerson, D. A. (2001): **Variation is the spice of life.** *Nat Genet* **27**:234-236.

339. Kubota, R., Noda, S., Wang, Y., Minoshima, S., Asakawa, S., Kudoh, J., Mashima, Y., Oguchi, Y. y Shimizu, N. (1997): **A novel myosin-like protein (myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor: molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping.** *Genomics* **41**:360-369.
340. Kumanogoh, A., Marukawa, S., Suzuki, K., Takegahara, N., Watanabe, C., Ch'ng, E., Ishida, I., Fujimura, H., Sakoda, S., Yoshida, K. y Kikutani, H. (2002): **Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2.** *Nature* **419**:629-633.
341. Kumar, A., Shetty, J., Kumar, B. y Blanton, S. H. (2004): **Confirmation of linkage and refinement of the RP28 locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa on chromosome 2p14-p15 in an Indian family.** *Mol Vis* **10**:399-402.
342. Kumar, R., Chen, S., Scheurer, D., Wang, Q. L., Duh, E., Sung, C. H., Rehemtulla, A., Swaroop, A., Adler, R. y Zack, D. J. (1996): **The bZIP transcription factor Nrl stimulates rhodopsin promoter activity in primary retinal cell cultures.** *J Biol Chem* **271**:29612-29618.
343. Kumar-Singh, R., Kenna, P. F., Farrar, G. J. y Humphries, P. (1993): **Evidence for further genetic heterogeneity in autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Genomics* **15**:212-215.
344. Kumaramanickavel, G., Maw, M., Denton, M. J., John, S., Srikumari, C. R., Orth, U., Oehlmann, R. y Gal, A. (1994): **Missense rhodopsin mutation in a family with recessive RP.** *Nat Genet* **8**:10-11.
- ## L
345. Lamb, T. D. y Pugh, E. N. (2004): **Dark adaptation and the retinoid cycle of vision.** *Prog Retin Eye Res* **23**:307-380.
346. Lamb, T. D. y Pugh, E. N. (2006): **Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**:5137-5152.
347. Lauber, J., Plessel, G., Prehn, S., Will, C. L., Fabrizio, P., Groning, K., Lane, W. S. y Luhrmann, R. (1997): **The human U4/U6 snRNP contains 60 and 90kD proteins that are structurally homologous to the yeast splicing factors Prp4p and Prp3p.** *RNA* **3**:926-941.
348. Lavail, M. M. (1976): **Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting.** *Science* **194**:1071-1074.
349. Lavail, M. M. (1980): **Circadian nature of rod outer segment disc shedding in the rat.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **19**:407-411.
350. Lavail, M. M., Yasumura, D., Matthes, M. T., Lau-Villacorta, C., Unoki, K., Sung, C. H. y Steinberg, R. H. (1998): **Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**:592-602.
351. Lerner, L. E., Gribanova, Y. E., Ji, M., Knox, B. E. y Farber, D. B. (2001): **Nrl and Sp nuclear proteins mediate transcription of rod-specific cGMP-phosphodiesterase beta-subunit gene: involvement of multiple response elements.** *J Biol Chem* **276**:34999-35007.
352. Leveillard, T., Mohand-Said, S., Lorentz, O., Hicks, D., Fintz, A. C., Clerin, E., Simonutti, M., Forster, V., Cavusoglu, N., Chalmel, F., Dolle, P., Poch, O., Lambrou, G. y Sahel, J. A. (2004): **Identification and characterization of rod-derived cone viability factor.** *Nat Genet* **36**:755-759.
353. Lewis, C. A., Batlle, I. R., Batlle, K. G., Banerjee, P., Cideciyan, A. V., Huang, J., Aleman, T. S., Huang, Y., Ott, J., Gilliam, T. C., Knowles, J. A. y Jacobson, S. G. (1999a): **Tubby-like protein 1 homozygous splice-site mutation causes early-onset severe retinal degeneration.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**:2106-2114.
354. Lewis, J. M., Cheresch, D. A. y Schwartz, M. A. (1996): **Protein kinase C regulates alpha v beta 5-dependent cytoskeletal associations and focal adhesion kinase phosphorylation.** *J Cell Biol* **134**:1323-1332.
355. Lewis, R. A., Otterud, B., Stauffer, D., Lalouel, J. M. y Leppert, M. (1990): **Mapping recessive ophthalmic diseases: linkage of the locus for Usher syndrome type II to a DNA marker on chromosome 1q.** *Genomics* **7**:250-256.
356. Lewis, R. A., Shroyer, N. F., Singh, N., Allikmets, R., Hutchinson, A., Li, Y., Lupski, J. R., Leppert, M. y Dean, M. (1999b): **Genotype/Phenotype analysis of a photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, in Stargardt disease.** *Am J Hum Genet* **64**:422-434.
357. Li, X., Chen, S., Wang, Q., Zack, D. J., Snyder, S. H. y Borjigin, J. (1998): **A pineal regulatory element (PIRE) mediates transactivation by the pineal/retina-specific transcription factor CRX.** *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:1876-1881.

358. Li, Z. Y., Jacobson, S. G. y Milam, A. H. (1994): **Autosomal dominant retinitis pigmentosa caused by the threonine-17-methionine rhodopsin mutation: retinal histopathology and immunocytochemistry.** *Exp Eye Res* **58**:397-408.
359. Li, Z. Y., Kljavin, I. J. y Milam, A. H. (1995): **Rod photoreceptor neurite sprouting in retinitis pigmentosa.** *J Neurosci* **15**:5429-5438.
360. Liang, Y., Fotiadis, D., Filipek, S., Saperstein, D. A., Palczewski, K. y Engel, A. (2003): **Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes.** *J Biol Chem* **278**:21655-21662.
361. Liang, Y., Fotiadis, D., Maeda, T., Maeda, A., Modzelewska, A., Filipek, S., Saperstein, D. A., Engel, A. y Palczewski, K. (2004): **Rhodopsin signaling and organization in heterozygote rhodopsin knockout mice.** *J Biol Chem* **279**:48189-48196.
362. Linari, M., Ueffing, M., Manson, F., Wright, A., Meitinger, T. y Becker, J. (1999): **The retinitis pigmentosa GTPase regulator, ROPG, interacts with the delta subunit of rod cyclic GMP phosphodiesterase.** *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:1315-1320.
363. Ling, L., Templeton, D. y Kung, H. J. (1996): **Identification of the major autophosphorylation sites of Nyk/Mer, an NCAM-related receptor tyrosine kinase.** *J Biol Chem* **271**:18355-18362.
364. Liu, J., Huang, Q., Higdon, J., Liu, W., Xie, T., Yamashita, T., Cheon, K., Cheng, C. y Zuo, J. (2005): **Distinct gene expression profiles and reduced JNK signaling in retinitis pigmentosa caused by RP1 mutations.** *Hum Mol Genet* **14**:2945-2958.
365. Liu, Q., Lyubarsky, A., Skalet, J. H., Pugh, E. N. y Pierce, E. A. (2003): **RP1 is required for the correct stacking of outer segment discs.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:4171-4183.
366. Liu, Q., Zhou, J., Daiger, S. P., Farber, D. B., Heckenlively, J. R., Smith, J. E., Sullivan, L. S., Zuo, J., Milam, A. H. y Pierce, E. A. (2002): **Identification and subcellular localization of the RP1 protein in human and mouse photoreceptors.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:22-32.
367. Liu, Q., Zuo, J. y Pierce, E. A. (2004): **The retinitis pigmentosa 1 protein is a photoreceptor microtubule-associated protein.** *J Neurosci* **24**:6427-6436.
368. Liu, X., Bulgakov, O. V., Darrow, K. N., Pawlyk, B., Adamian, M., Liberman, M. C. y Li, T. (2007): **Usherin is required for maintenance of retinal photoreceptors and normal development of cochlear hair cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:4413-4418.
369. Liu, X., Udovichenko, I. P., Brown, S. D., Steel, K. P. y Williams, D. S. (1999): **Myosin VIIa participates in opsin transport through the photoreceptor cilium.** *J Neurosci* **19**:6267-6274.
370. Liu, X. Z., Walsh, J., Mburu, P., Kendrick-Jones, J., Cope, M. J., Steel, K. P. y Brown, S. D. (1997): **Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness.** *Nat Genet* **16**:188-190.
371. Lobanova, E. S., Finkelstein, S., Song, H., Tsang, S. H., Chen, C. K., Sokolov, M., Skiba, N. P. y Arshavsky, V. Y. (2007): **Transducin translocation in rods is triggered by saturation of the GTPase-activating complex.** *J Neurosci* **27**:1151-1160.
372. Loewen, C. J. y Molday, R. S. (2000): **Disulfide-mediated oligomerization of Peripherin/Rds and Rom-1 in photoreceptor disk membranes. Implications for photoreceptor outer segment morphogenesis and degeneration.** *J Biol Chem* **275**:5370-5378.
373. Loewen, C. J., Moritz, O. L. y Molday, R. S. (2001): **Molecular characterization of peripherin-2 and rom-1 mutants responsible for digenic retinitis pigmentosa.** *J Biol Chem* **276**:22388-22396.
374. Loewen, C. J., Moritz, O. L., Tam, B. M., Papermaster, D. S. y Molday, R. S. (2003): **The role of subunit assembly in peripherin-2 targeting to rod photoreceptor disk membranes and retinitis pigmentosa.** *Mol Biol Cell* **14**:3400-3413.
375. Lolley, R. N., Rong, H. y Craft, C. M. (1994): **Linkage of photoreceptor degeneration by apoptosis with inherited defect in phototransduction.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**:358-362.
376. Lorenz, B., Gyurus, P., Preising, M., Bremser, D., Gu, S., Andrassi, M., Gerth, C. y Gal, A. (2000): **Early-onset severe rod-cone dystrophy in young children with RPE65 mutations.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**:2735-2742.
377. Lorenz, B. y Preising, M. (2004): **Usher syndrome.** *Orphanet Encyclopedia* [on line]. Disponible en: <http://www.orpha.net>

378. Lotery, A. J., Jacobson, S. G., Fishman, G. A., Weleber, R. G., Fulton, A. B., Namperumalsamy, P., Heon, E., Levin, A. V., Grover, S., Rosenow, J. R., Kopp, K. K., Sheffield, V. C. y Stone, E. M. (2001a): **Mutations in the CRB1 gene cause Leber congenital amaurosis.** *Arch Ophthalmol* **119**:415-420.
379. Lotery, A. J., Malik, A., Shami, S. A., Sindhi, M., Chohan, B., Maqbool, C., Moore, P. A., Denton, M. J. y Stone, E. M. (2001b): **CRB1 mutations may result in retinitis pigmentosa without para-arteriolar RPE preservation.** *Ophthalmic Genet* **22**:163-169.
380. Lotery, A. J., Namperumalsamy, P., Jacobson, S. G., Weleber, R. G., Fishman, G. A., Musarella, M. A., Hoyt, C. S., Heon, E., Levin, A., Jan, J., Lam, B., Carr, R. E., Franklin, A., Radha, S., Andorf, J. L., Sheffield, V. C. y Stone, E. M. (2000): **Mutation analysis of 3 genes in patients with Leber congenital amaurosis.** *Arch Ophthalmol* **118**:538-543.
381. Luo, H. R., Moreau, G. A., Levin, N. y Moore, M. J. (1999): **The human Prp8 protein is a component of both U2- and U12-dependent spliceosomes.** *RNA* **5**:893-908.
382. Lythgoe, J. N. y Partridge, J. C. (1989): **Visual pigments and the acquisition of visual information.** *J Exp Biol* **146**:1-20.

M

383. Ma, J. x., Zhang, J., Othersen, K. L., Moiseyev, G., Ablonczy, Z., Redmond, T. M., Chen, Y. y Crouch, R. K. (2001): **Expression, Purification, and MALDI Analysis of RPE65.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**:1429-1435.
384. Mahtani, M. M. y Willard, H. F. (1998): **Physical and genetic mapping of the human X chromosome centromere: repression of recombination.** *Genome Res* **8**:100-110.
385. Maita, H., Kitaura, H., Ariga, H. y Iguchi-Ariga, S. M. (2004a): **Association of PAP-1 and Prp3p, the products of causative genes of dominant retinitis pigmentosa, in the tri-snRNP complex.** *Exp Cell Res* **302**:61-68.
386. Maita, H., Kitaura, H., Keen, T. J., Inglehearn, C. F., Ariga, H. y Iguchi-Ariga, S. M. (2004b): **PAP-1, the mutated gene underlying the RP9 form of dominant retinitis pigmentosa, is a splicing factor.** *Exp Cell Res* **300**:283-296.
387. Makarova, O. V., Makarov, E. M., Liu, S., Vormlocher, H. P. y Luhrmann, R. (2002): **Protein 61K, encoded by a gene (PRPF31) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6*U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing.** *EMBO J* **21**:1148-1157.
388. Mansergh, F. C., Millington-Ward, S., Kennan, A., Kiang, A. S., Humphries, M., Farrar, G. J., Humphries, P. y Kenna, P. F. (1999): **Retinitis pigmentosa and progressive sensorineural hearing loss caused by a C12258A mutation in the mitochondrial MTTS2 gene.** *Am J Hum Genet* **64**:971-985.
389. Marlhens, F., Bareil, C., Griffoin, J. M., Zrenner, E., Amalric, P., Eliaou, C., Liu, S. Y., Harris, E., Redmond, T. M., Arnaud, B., Claustres, M. y Hamel, C. P. (1997): **Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis.** *Nat Genet* **17**:139-141.
390. Marlhens, F., Griffoin, J. M., Bareil, C., Arnaud, B., Claustres, M. y Hamel, C. P. (1998): **Autosomal recessive retinal dystrophy associated with two novel mutations in the RPE65 gene.** *Eur J Hum Genet* **6**:527-531.
391. Marmorstein, A. D. (2001): **The polarity of the retinal pigment epithelium.** *Traffic* **2**:867-872.
392. Marszalek, J. R. y Goldstein, L. S. (2000): **Understanding the functions of kinesin-II.** *Biochim Biophys Acta* **1496**:142-150.
393. Marszalek, J. R., Liu, X., Roberts, E. A., Chui, D., Marth, J. D., Williams, D. S. y Goldstein, L. S. (2000): **Genetic evidence for selective transport of opsin and arrestin by kinesin-II in mammalian photoreceptors.** *Cell* **102**:175-187.
394. Martínez-Gimeno, M., Gamundi, M. J., Hernan, I., Maseras, M., Milla, E., Ayuso, C., García-Sandoval, B., Beneyto, M., Vilela, C., Baiget, M., Antiñolo, G. y Carballo, M. (2003): **Mutations in the pre-mRNA splicing-factor genes PRPF3, PRPF8, and PRPF31 in Spanish families with autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:2171-2177.
395. Martínez-Gimeno, M., Maseras, M., Baiget, M., Beneito, M., Antiñolo, G., Ayuso, C. y Carballo, M. (2001): **Mutations P51L and G122E in retinal transcription factor NRL associated with autosomal dominant and sporadic retinitis pigmentosa.** *Hum Mutat* **17**:520.
396. Martínez-Mir, A., Bayes, M., Vilageliu, L., Grinberg, D., Ayuso, C., Del, R. T., García-Sandoval, B., Bussaglia, E., Baiget, M., González-Duarte, R. y Balcells, S. (1997a): **A new locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP19) maps to 1p13-1p21.** *Genomics* **40**:142-146.

397. Martínez-Mir, A., Paloma, E., Allikmets, R., Ayuso, C., Del, R. T., Dean, M., Vilageliu, L., González-Duarte, R. y Balcells, S. (1998): **Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR.** *Nat Genet* **18**:11-12.
398. Martínez-Mir, A., Vilela, C., Bayes, M., Valverde, D., Dain, L., Beneyto, M., Marco, M., Baiget, M., Grinberg, D., Balcells, S., González-Duarte, R. y Vilageliu, L. (1997b): **Putative association of a mutant ROM1 allele with retinitis pigmentosa.** *Hum Genet* **99**:827-830.
399. Mashima, Y., Saga, M., Hiida, Y., Imamura, Y., Kudoh, J. y Shimizu, N. (2000): **Novel mutation in RP2 gene in two brothers with X-linked retinitis pigmentosa and mtDNA mutation of leber hereditary optic neuropathy who showed marked differences in clinical severity.** *Am J Ophthalmol* **130**:357-359.
400. Mata, N. L., Moghrabi, W. N., Lee, J. S., Bui, T. V., Radu, R. A., Horwitz, J. y Travis, G. H. (2004): **Rpe65 is a retinyl ester binding protein that presents insoluble substrate to the isomerase in retinal pigment epithelial cells.** *J Biol Chem* **279**:635-643.
401. Mata, N. L., Radu, R. A., Clemmons, R. C. y Travis, G. H. (2002): **Isomerization and oxidation of vitamin a in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight.** *Neuron* **36**:69-80.
402. Mataftsi, A., Schorderet, D. F., Chachoua, L., Boussalah, M., Nouri, M. T., Barthelmes, D., Borruat, F. X. y Munier, F. L. (2007): **Novel TULP1 mutation causing leber congenital amaurosis or early onset retinal degeneration.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**:5160-5167.
403. Maugeri, A., Klevering, B. J., Rohrschneider, K., Blankenagel, A., Brunner, H. G., Deutman, A. F., Hoyng, C. B. y Cremers, F. P. (2000): **Mutations in the ABCA4 (ABCR) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy.** *Am J Hum Genet* **67**:960-966.
404. Maugeri, A., van Driel, M. A., van de Pol, D. J., Klevering, B. J., van Haren, F. J., Tijmes, N., Bergen, A. A., Rohrschneider, K., Blankenagel, A., Pinckers, A. J., Dahl, N., Brunner, H. G., Deutman, A. F., Hoyng, C. B. y Cremers, F. P. (1999): **The 2588G->C mutation in the ABCR gene is a mild frequent founder mutation in the Western European population and allows the classification of ABCR mutations in patients with Stargardt disease.** *Am J Hum Genet* **64**:1024-1035.
405. Maw, M. A., Corbeil, D., Koch, J., Hellwig, A., Wilson-Wheeler, J. C., Bridges, R. J., Kumaramanickavel, G., John, S., Nancarrow, D., Roper, K., Weigmann, A., Huttner, W. B. y Denton, M. J. (2000): **A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration.** *Hum Mol Genet* **9**:27-34.
406. Maw, M. A., Kennedy, B., Knight, A., Bridges, R., Roth, K. E., Mani, E. J., Mukkadan, J. K., Nancarrow, D., Crabb, J. W. y Denton, M. J. (1997): **Mutation of the gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *Nat Genet* **17**:198-200.
407. McBee, J. K., Palczewski, K., Baehr, W. y Pepperberg, D. R. (2001): **Confronting complexity: the interlink of phototransduction and retinoid metabolism in the vertebrate retina.** *Prog Retin Eye Res* **20**:469-529.
408. McColl, A. J. y Converse, C. A. (1995): **Lipid studies in retinitis pigmentosa.** *Prog Lipid Res* **34**:1-16.
409. McGee, T. L., Devoto, M., Ott, J., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (1997): **Evidence that the penetrance of mutations at the RP11 locus causing dominant retinitis pigmentosa is influenced by a gene linked to the homologous RP11 allele.** *Am J Hum Genet* **61**:1059-1066.
410. McGuire, R. E., Jordan, S. A., Braden, V. V., Bouffard, G. G., Humphries, P., Green, E. D. y Daiger, S. P. (1996): **Mapping the RP10 locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on 7q: refined genetic positioning and localization within a well-defined YAC contig.** *Genome Res* **6**:255-266.
411. McHenry, C. L., Liu, Y., Feng, W., Nair, A. R., Feathers, K. L., Ding, X., Gal, A., Vollrath, D., Sieving, P. A. y Thompson, D. A. (2004): **MERTK arginine-844-cysteine in a patient with severe rod-cone dystrophy: loss of mutant protein function in transfected cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**:1456-1463.
412. McKay, G. J., Clarke, S., Davis, J. A., Simpson, D. A. y Silvestri, G. (2005): **Pigmented paravenous chorioretinal atrophy is associated with a mutation within the crumbs homolog 1 (CRB1) gene.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**:322-328.
413. McKie, A. B., McHale, J. C., Keen, T. J., Tarttelin, E. E., Goliath, R., van Lith-Verhoeven, J. J., Greenberg, J., Ramesar, R. S., Hoyng, C. B., Cremers, F. P., Mackey, D. A., Bhattacharya, S. S., Bird, A. C., Markham, A. F. y Inglehearn, C. F. (2001): **Mutations in the pre-mRNA splicing factor gene PRPC8 in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP13).** *Hum Mol Genet* **10**:1555-1562.
414. McLaughlin, B. J., Cooper, N. G. F. y Shepherd, V. L. (1994): **How good is the evidence to suggest that phagocytosis of ROS by RPE is receptor mediated?** *Prog Retin Eye Res* **1**:147-164.

415. McLaughlin, M. E., Ehrhart, T. L., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (1995): **Mutation spectrum of the gene encoding the beta subunit of rod phosphodiesterase among patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:3249-3253.
416. McLaughlin, M. E., Sandberg, M. A., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (1993): **Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa.** *Nat Genet* **4**:130-134.
417. McLean, J. E., Hamaguchi, N., Belenky, P., Mortimer, S. E., Stanton, M. y Hedstrom, L. (2004): **Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase binds nucleic acids in vitro and in vivo.** *Biochem J* **379**:243-251.
418. McWilliam, P., Farrar, G. J., Kenna, P., Bradley, D. G., Humphries, M. M., Sharp, E. M., McConnell, D. J., Lawler, M., Sheils, D., Ryan, C., Stevens, K., Daiger, S. P. y Humphries, P. (1989): **Autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP): localization of an ADRP gene to the long arm of chromosome 3.** *Genomics* **5**:619-622.
419. Mears, A. J., Gieser, L., Yan, D., Chen, C., Fahrner, S., Hirianna, S., Fujita, R., Jacobson, S. G., Sieving, P. A. y Swaroop, A. (1999): **Protein-truncation mutations in the RP2 gene in a North American cohort of families with X-linked retinitis pigmentosa.** *Am J Hum Genet* **64**:897-900.
420. Mears, A. J., Hirianna, S., Vervoort, R., Yashar, B., Gieser, L., Fahrner, S., Daiger, S. P., Heckenlively, J. R., Sieving, P. A., Wright, A. F. y Swaroop, A. (2000): **Remapping of the RP15 locus for X-linked cone-rod degeneration to Xp11.4-p21.1, and identification of a de novo insertion in the RPGR exon ORF15.** *Am J Hum Genet* **67**:1000-1003.
421. Mears, A. J., Kondo, M., Swain, P. K., Takada, Y., Bush, R. A., Saunders, T. L., Sieving, P. A. y Swaroop, A. (2001): **Nrl is required for rod photoreceptor development.** *Nat Genet* **29**:447-452.
422. Mehalow, A. K., Kameya, S., Smith, R. S., Hawes, N. L., Denegre, J. M., Young, J. A., Bechtold, L., Haider, N. B., Tepass, U., Heckenlively, J. R., Chang, B., Naggert, J. K. y Nishina, P. M. (2003): **CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina.** *Hum Mol Genet* **12**:2179-2189.
423. Meindl, A., Dry, K., Herrmann, K., Manson, F., Ciccodicola, A., Edgar, A., Carvalho, M. R., Achatz, H., Hellebrand, H., Lennon, A., Migliaccio, C., Porter, K., Zrenner, E., Bird, A., Jay, M., Lorenz, B., Wittwer, B., D'Urso, M., Meitinger, T. y Wright, A. (1996): **A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3).** *Nat Genet* **13**:35-42.
424. Melamud, A., Shen, G. Q., Chung, D., Xi, Q., Simpson, E., Li, L., Peachey, N. S., Zegarra, H., Hagstrom, S. A., Wang, Q. K. y Traboulsi, E. I. (2006): **Mapping a new genetic locus for X linked retinitis pigmentosa to Xq28.** *J Med Genet* **43**:e27.
425. Merin, S. y Auerbach, E. (1976): **Retinitis pigmentosa.** *Surv Ophthalmol* **20**:303-346.
426. Meuleman, J., van de Pavert, S. A. y Wijnholds, J. (2004): **Crumbs homologue 1 in polarity and blindness.** *Biochem Soc Trans* **32**:828-830.
427. Miano, M. G., Testa, F., Filippini, F., Trujillo, M., Conte, I., Lanzara, C., Millán, J. M., De, B. C., Grammatico, B., Mangino, M., Torrente, I., Carozzo, R., Simonelli, F., Rinaldi, E., Ventruto, V., D'Urso, M., Ayuso, C. y Ciccodicola, A. (2001): **Identification of novel RP2 mutations in a subset of X-linked retinitis pigmentosa families and prediction of new domains.** *Hum Mutat* **18**:109-119.
428. Miano, M. G., Testa, F., Strazzullo, M., Trujillo, M., De, B. C., Grammatico, B., Simonelli, F., Mangino, M., Torrente, I., Ruberto, G., Beneyto, M., Antiñolo, G., Rinaldi, E., Danesino, C., Ventruto, V., D'Urso, M., Ayuso, C., Baiget, M. y Ciccodicola, A. (1999): **Mutation analysis of the RPGR gene reveals novel mutations in south European patients with X-linked retinitis pigmentosa.** *Eur J Hum Genet* **7**:687-694.
429. Miceli, M. V., Newsome, D. A. y Tate, D. J., Jr. (1997): **Vitronectin is responsible for serum-stimulated uptake of rod outer segments by cultured retinal pigment epithelial cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**:1588-1597.
430. Middeldorp, A., Jagmohan-Changur, S., Helmer, Q., van der Klift, H. M., Tops, C. M., Vasen, H. F., Devilee, P., Morreau, H., Houwing-Duistermaat, J. J., Wijnen, J. T. y van, W. T. (2007): **A procedure for the detection of linkage with high density SNP arrays in a large pedigree with colorectal cancer.** *BMC Cancer* **7**:6.
431. Milam, A. H., Hendrickson, A. E., Xiao, M., Smith, J. E., Possin, D. E., John, S. K. y Nishina, P. M. (2000): **Localization of tubby-like protein 1 in developing and adult human retinas.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**:2352-2356.
432. Milam, A. H., Li, Z. Y., Cideciyan, A. V. y Jacobson, S. G. (1996): **Clinicopathologic effects of the Q64ter rhodopsin mutation in retinitis pigmentosa.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**:753-765.
433. Milam, A. H., Li, Z. Y. y Fariss, R. N. (1998): **Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa.** *Prog Retin Eye Res* **17**:175-205.

434. Milam, A. H., Rose, L., Cideciyan, A. V., Barakat, M. R., Tang, W. X., Gupta, N., Aleman, T. S., Wright, A. F., Stone, E. M., Sheffield, V. C. y Jacobson, S. G. (2002): **The nuclear receptor NR2E3 plays a role in human retinal photoreceptor differentiation and degeneration.** *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:473-478.
435. Millán, J. M., Fuchs, S., Paricio, N., Wedemann, H., Gal, A., Najera, C. y Prieto, F. (1995): **Gly114Asp mutation of rhodopsin in autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Mol Cell Probes* **9**:67-69.
436. Min, K. C., Zvyaga, T. A., Cypess, A. M. y Sakmar, T. P. (1993): **Characterization of mutant rhodopsins responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. Mutations on the cytoplasmic surface affect transducin activation.** *J Biol Chem* **268**:9400-9404.
437. Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A. H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J. T., Bray, R. A., Waller, E. K. y Buck, D. W. (1997): **A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning.** *Blood* **90**:5013-5021.
438. Mitton, K. P., Swain, P. K., Chen, S., Xu, S., Zack, D. J. y Swaroop, A. (2000): **The leucine zipper of NRL interacts with the CRX homeodomain. A possible mechanism of transcriptional synergy in rhodopsin regulation.** *J Biol Chem* **275**:29794-29799.
439. Mohand-Said, S., Hicks, D., Leveillard, T., Picaud, S., Porto, F. y Sahel, J. A. (2001): **Rod-cone interactions: developmental and clinical significance.** *Prog Retin Eye Res* **20**:451-467.
440. Mohand-Said, S., Deudon-Combe, A., Hicks, D., Simonutti, M., Forster, V., Fintz, A. C., Leveillard, T., Dreyfus, H. y Sahel, J. A. (1998): **Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse.** *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:8357-8362.
441. Moiseyev, G., Chen, Y., Takahashi, Y., Wu, B. X. y Ma, J. X. (2005): **RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle.** *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:12413-12418.
442. Moiseyev, G., Crouch, R. K., Goletz, P., Oatis, J., Jr., Redmond, T. M. y Ma, J. X. (2003): **Retinyl esters are the substrate for isomerohydrolase.** *Biochemistry* **42**:2229-2238.
443. Moiseyev, G., Takahashi, Y., Chen, Y., Gentleman, S., Redmond, T. M., Crouch, R. K. y Ma, J. X. (2006): **RPE65 is an iron(II)-dependent isomerohydrolase in the retinoid visual cycle.** *J Biol Chem* **281**:2835-2840.
444. Molday, R. S. (1998): **Photoreceptor membrane proteins, phototransduction, and retinal degenerative diseases. The Friedenwald Lecture.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**:2491-2513.
445. Molokanova, E. y Kramer, R. H. (2001): **Mechanism of inhibition of cyclic nucleotide-gated channel by protein tyrosine kinase probed with genistein.** *J Gen Physiol* **117**:219-234.
446. Molokanova, E., Savchenko, A. y Kramer, R. H. (2000): **Interactions of cyclic nucleotide-gated channel subunits and protein tyrosine kinase probed with genistein.** *J Gen Physiol* **115**:685-696.
447. Molokanova, E., Trivedi, B., Savchenko, A. y Kramer, R. H. (1997): **Modulation of rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channels by tyrosine phosphorylation.** *J Neurosci* **17**:9068-9076.
448. Moore, A., Escudier, E., Roger, G., Tamalet, A., Pelosse, B., Marlin, S., Clement, A., Geremek, M., Delaisi, B., Bridoux, A. M., Coste, A., Witt, M., Duriez, B. y Amselem, S. (2006): **RPGR is mutated in patients with a complex X linked phenotype combining primary ciliary dyskinesia and retinitis pigmentosa.** *J Med Genet* **43**:326-333.
449. Mordes, D., Yuan, L., Xu, L., Kawada, M., Molday, R. S. y Wu, J. Y. (2007): **Identification of photoreceptor genes affected by PRPF31 mutations associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Neurobiol Dis* **26**:291-300.
450. Morimura, H., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (1999a): **Recessive mutations in the RLBP1 gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in a form of retinitis punctata albescens.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**:1000-1004.
451. Morimura, H., Fishman, G. A., Grover, S. A., Fulton, A. B., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (1998): **Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or leber congenital amaurosis.** *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:3088-3093.
452. Morimura, H., Saindelle-Ribeaudeau, F., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (1999b): **Mutations in RGR, encoding a light-sensitive opsin homologue, in patients with retinitis pigmentosa.** *Nat Genet* **23**:393-394.
453. Moritz, O. L. y Molday, R. S. (1996): **Molecular cloning, membrane topology, and localization of bovine rom-1 in rod and cone photoreceptor cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**:352-362.

454. Morrow, E. M., Furukawa, T. y Cepko, C. L. (1998): **Vertebrate photoreceptor cell development and disease.** *Trends Cell Biol* **8**:353-358.
455. Morrow, E. M., Furukawa, T., Raviola, E. y Cepko, C. L. (2005): **Synaptogenesis and outer segment formation are perturbed in the neural retina of Crx mutant mice.** *BMC Neurosci* **6**:5.
456. Mortimer, S. E. y Hedstrom, L. (2005): **Autosomal dominant retinitis pigmentosa mutations in inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type I disrupt nucleic acid binding.** *Biochem J* **390**:41-47.
457. Mukherjee, P. K., Marcheselli, V. L., de, R., V, Gordon, W. C., Jackson, F. E. y Bazan, N. G. (2007): **Photoreceptor outer segment phagocytosis attenuates oxidative stress-induced apoptosis with concomitant neuroprotectin D1 synthesis.** *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:13158-13163.
458. Muresan, V., Joshi, H. C. y Besharse, J. C. (1993): **Gamma-tubulin in differentiated cell types: localization in the vicinity of basal bodies in retinal photoreceptors and ciliated epithelia.** *J Cell Sci* **104** (Pt 4):1229-1237.
459. Musarella, M. A., Burghes, A., Anson-Cartwright, L., Mahtani, M. M., Argonza, R., Tsui, L. C. y Worton, R. (1988): **Localization of the gene for X-linked recessive type of retinitis pigmentosa (XLRP) to Xp21 by linkage analysis.** *Am J Hum Genet* **43**:484-494.

N

460. Nakai, K. y Sakamoto, H. (1994): **Construction of a novel database containing aberrant splicing mutations of mammalian genes.** *Gene* **141**:171-177.
461. Nakamachi, Y., Nakamura, M., Fujii, S., Yamamoto, M. y Okubo, K. (1998): **Oguchi disease with sectoral retinitis pigmentosa harboring adenine deletion at position 1147 in the arrestin gene.** *Am J Ophthalmol* **125**:249-251.
462. Nakazawa, M., Wada, Y. y Tamai, M. (1998): **Arrestin gene mutations in autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *Arch Ophthalmol* **116**:498-501.
463. Nandrot, E., Dufour, E. M., Provost, A. C., Pequignot, M. O., Bonnel, S., Gogat, K., Marchant, D., Rouillac, C., Sepulchre de, C. B., Bihoreau, M. T., Shaver, C., Duffier, J. L., Marsac, C., Lathrop, M., Menasche, M. y Abitbol, M. M. (2000): **Homozygous deletion in the coding sequence of the c-mer gene in RCS rats unravels general mechanisms of physiological cell adhesion and apoptosis.** *Neurobiol Dis* **7**:586-599.
464. Nandrot, E. F., Kim, Y., Brodie, S. E., Huang, X., Sheppard, D. y Finnemann, S. C. (2004): **Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin.** *J Exp Med* **200**:1539-1545.
465. Nash, M. S. y Osborne, N. N. (1995): **Agonist-induced effects on cyclic AMP metabolism are affected in pigment epithelial cells of the Royal College of Surgeons rat.** *Neurochem Int* **27**:253-262.
466. Nash, M. S., Wood, J. P. y Osborne, N. N. (1997): **Protein kinase C activation by serotonin potentiates agonist-induced stimulation of cAMP production in cultured rat retinal pigment epithelial cells.** *Exp Eye Res* **64**:249-255.
467. Nasonkin, I., Illing, M., Koehler, M. R., Schmid, M., Molday, R. S. y Weber, B. H. (1998): **Mapping of the rod photoreceptor ABC transporter (ABCR) to 1p21-p22.1 and identification of novel mutations in Stargardt's disease.** *Hum Genet* **102**:21-26.
468. Nathans, J. y Hogness, D. S. (1984): **Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin.** *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:4851-4855.
469. Ngo, J. T., Klisak, I., Sparkes, R. S., Mohandas, T., Yamaki, K., Shinohara, T. y Bateman, J. B. (1990): **Assignment of the S-antigen gene (SAG) to human chromosome 2q24-q37.** *Genomics* **7**:84-87.
470. Nguyen-Legros, J. y Hicks, D. (2000): **Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium.** *Int Rev Cytol* **196**:245-313.
471. Nichols, B. E., Sheffield, V. C., Vandenburgh, K., Drack, A. V., Kimura, A. E. y Stone, E. M. (1993): **Butterfly-shaped pigment dystrophy of the fovea caused by a point mutation in codon 167 of the RDS gene.** *Nat Genet* **3**:202-207.
472. Nickell, S., Park, P. S., Baumeister, W. y Palczewski, K. (2007): **Three-dimensional architecture of murine rod outer segments determined by cryoelectron tomography.** *J Cell Biol* **177**:917-925.

473. Nir, I., Harrison, J. M., Haque, R., Low, M. J., Grandy, D. K., Rubinstein, M. y Iuvone, P. M. (2002): **Dysfunctional light-evoked regulation of cAMP in photoreceptors and abnormal retinal adaptation in mice lacking dopamine D4 receptors.** *J Neurosci* **22**:2063-2073.
474. Nishiguchi, K. M., Friedman, J. S., Sandberg, M. A., Swaroop, A., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (2004): **Recessive NRL mutations in patients with clumped pigmentary retinal degeneration and relative preservation of blue cone function.** *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:17819-17824.
475. Noben-Trauth, K., Naggert, J. K., North, M. A. y Nishina, P. M. (1996): **A candidate gene for the mouse mutation tubby.** *Nature* **380**:534-538.
476. North, M. A., Naggert, J. K., Yan, Y., Noben-Trauth, K. y Nishina, P. M. (1997): **Molecular characterization of TUB, TULP1, and TULP2, members of the novel tubby gene family and their possible relation to ocular diseases.** *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:3128-3133.

O

477. O'Day, W. T. y Young, R. W. (1978): **Rhythmic daily shedding of outer-segment membranes by visual cells in the goldfish.** *J Cell Biol* **76**:593-604.
478. O'Rahilly, R. (1975): **The prenatal development of the human eye.** *Exp Eye Res* **21**:93-112.
479. Oh, K. T., Longmuir, R., Oh, D. M., Stone, E. M., Kopp, K., Brown, J., Fishman, G. A., Sonkin, P., Gehrs, K. M. y Weleber, R. G. (2003): **Comparison of the clinical expression of retinitis pigmentosa associated with rhodopsin mutations at codon 347 and codon 23.** *Am J Ophthalmol* **136**:306-313.
480. Oh, K. T., Oh, D. M., Weleber, R. G., Stone, E. M., Parikh, A., White, J., boer-Shields, K. A., Streb, L. y Vallar, C. (2004): **Genotype-phenotype correlation in a family with Arg135Leu rhodopsin retinitis pigmentosa.** *Br J Ophthalmol* **88**:1533-1537.
481. Omar, R., Dain, S. y Herse, P. (2005): **Color vision deficiency in Retinitis Pigmentosa.** *International Congress Series 1282*. Págs: 684-688.
482. Osborne, N. N., Fitzgibbon, F., Nash, M., Liu, N. P., Leslie, R. y Cholewinski, A. (1993): **Serotonergic, 5-HT₂, receptor-mediated phosphoinositide turnover and mobilization of calcium in cultured rat retinal pigment epithelium cells.** *Vision Res* **33**:2171-2179.
483. Ott, J., Bhattacharya, S., Chen, J. D., Denton, M. J., Donald, J., Dubay, C., Farrar, G. J., Fishman, G. A., Frey, D., Gal, A., Humphries, P., Jay, B., Jay, M., Litt, M., Mächler, M., Musarella, M., Neugebauer, M., Nussbaum, R. L., Terwilliger, J. D., Weleber, R. G., Wirth, B., Wong, F., Worton, R. G. y Wright, A. F. (1990): **Localizing multiple X chromosome-linked retinitis pigmentosa loci using multilocus homogeneity tests.** *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:701-704.
484. Otto, E. A., Loeys, B., Khanna, H., Hellems, J., Sudbrak, R., Fan, S., Muerb, U., O'Toole, J. F., Helou, J., Attanasio, M., Utsch, B., Sayer, J. A., Lillo, C., Jimeno, D., Coucke, P., De, P. A., Reinhardt, R., Klages, S., Tsuda, M., Kawakami, I., Kusakabe, T., Omran, H., Imm, A., Tippens, M., Raymond, P. A., Hill, J., Beales, P., He, S., Kispert, A., Margolis, B., Williams, D. S., Swaroop, A. y Hildebrandt, F. (2005): **Nephrocystin-5, a ciliary IQ domain protein, is mutated in Senior-Loken syndrome and interacts with RPGR and calmodulin.** *Nat Genet* **37**:282-288.
485. Otto-Bruc, A., Fariss, R. N., Haeseleer, F., Huang, J., Buczylo, J., Surgucheva, I., Baehr, W., Milam, A. H. y Palczewski, K. (1997): **Localization of guanylate cyclase-activating protein 2 in mammalian retinas.** *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:4727-4732.

P

486. Pagon, R. A. (1988): **Retinitis pigmentosa.** *Surv Ophthalmol* **33**:137-177.
487. Palczewski, K., Buczylo, J., Ohguro, H., Annan, R. S., Carr, S. A., Crabb, J. W., Kaplan, M. W., Johnson, R. S. y Walsh, K. A. (1994): **Characterization of a truncated form of arrestin isolated from bovine rod outer segments.** *Prot Sci* **3**:314-324.
488. Palczewski, K., McDowell, J. H., Jakes, S., Ingebritsen, T. S. y Hargrave, P. A. (1989): **Regulation of rhodopsin dephosphorylation by arrestin.** *J Biol Chem* **264**:15770-15773.

489. Paloma, E., Coco, R., Martínez-Mir, A., Vilageliu, L., Balcells, S. y González-Duarte, R. (2002a): **Analysis of ABCA4 in mixed Spanish families segregating different retinal dystrophies.** *Hum Mutat* **20**:476.
490. Paloma, E., Hjelmqvist, L., Bayes, M., García-Sandoval, B., Ayuso, C., Balcells, S. y González-Duarte, R. (2000): **Novel mutations in the TULP1 gene causing autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**:656-659.
491. Paloma, E., Martínez-Mir, A., García-Sandoval, B., Ayuso, C., Vilageliu, L., González-Duarte, R. y Balcells, S. (2002b): **Novel homozygous mutation in the alpha subunit of the rod cGMP gated channel (CNGA1) in two Spanish sibs affected with autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *J Med Genet* **39**:E66.
492. Pandey, S., Blanks, J. C., Spee, C., Jiang, M. y Fong, H. K. (1994): **Cytoplasmic retinal localization of an evolutionary homolog of the visual pigments.** *Exp Eye Res* **58**:605-613.
493. Panetti, T. S., Wilcox, S. A., Horzempa, C. y Keown-Longo, P. J. (1995): **Alpha v beta 5 integrin receptor-mediated endocytosis of vitronectin is protein kinase C-dependent.** *J Biol Chem* **270**:18593-18597.
494. Papaioannou, M., Chakarova, C. F., Prescott, D. C., Waseem, N., Theis, T., Lopez, I., Gill, B., Koenekoop, R. K. y Bhattacharya, S. S. (2005): **A new locus (RP31) for autosomal dominant retinitis pigmentosa maps to chromosome 9p.** *Hum Genet* **118**:501-503.
495. Park, P. S., Filipek, S., Wells, J. W. y Palczewski, K. (2004): **Oligomerization of G protein-coupled receptors: past, present, and future.** *Biochemistry* **43**:15643-15656.
496. Pasterkamp, R. J. y Kolodkin, A. L. (2003): **Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity.** *Curr Opin Neurobiol* **13**:79-89.
497. Payne, A., Vithana, E., Khaliq, S., Hameed, A., Deller, J., bu-Safieh, L., Kermani, S., Leroy, B. P., Mehdi, S. Q., Moore, A. T., Bird, A. C. y Bhattacharya, S. S. (2000): **RP1 protein truncating mutations predominate at the RP1 adRP locus.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**:4069-4073.
498. Pazour, G. J., Baker, S. A., Deane, J. A., Cole, D. G., Dickert, B. L., Rosenbaum, J. L., Witman, G. B. y Besharse, J. C. (2002): **The intraflagellar transport protein, IFT88, is essential for vertebrate photoreceptor assembly and maintenance.** *J Cell Biol* **157**:103-113.
499. Pazour, G. J., Dickert, B. L. y Witman, G. B. (1999): **The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly.** *J Cell Biol* **144**:473-481.
500. Pazour, G. J. y Rosenbaum, J. L. (2002): **Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases.** *Trends Cell Biol* **12**:551-555.
501. Pelletier, V., Jambou, M., Delphin, N., Zinovieva, E., Stum, M., Gigarel, N., Dollfus, H., Hamel, C., Toutain, A., Dufier, J. L., Roche, O., Munnich, A., Bonnefont, J. P., Kaplan, J. y Rozet, J. M. (2007): **Comprehensive survey of mutations in RP2 and RPGR in patients affected with distinct retinal dystrophies: genotype-phenotype correlations and impact on genetic counseling.** *Hum Mutat* **28**:81-91.
502. Pellikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C. J., Ready, D. F. y Tepass, U. (2002): **Crumbs, the Drosophila homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis.** *Nature* **416**:143-149.
503. Pentia, D. C., Hosier, S. y Cote, R. H. (2006): **The glutamic acid-rich protein-2 (GARP2) is a high affinity rod photoreceptor phosphodiesterase (PDE6)-binding protein that modulates its catalytic properties.** *J Biol Chem* **281**:5500-5505.
504. Pepe, I. M. (2001): **Recent advances in our understanding of rhodopsin and phototransduction.** *Prog Retin Eye Res* **20**:733-759.
505. Phelan, J. K. y Bok, D. (2000): **A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes.** *Mol Vis* **6**:116-124.
506. Pierce, E. A., Quinn, T., Meehan, T., McGee, T. L., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (1999): **Mutations in a gene encoding a new oxygen-regulated photoreceptor protein cause dominant retinitis pigmentosa.** *Nat Genet* **22**:248-254.
507. Piriev, N. I., Shih, J. M. y Farber, D. B. (1998): **Defective RNA splicing resulting from a mutation in the cyclic guanosine monophosphate-phosphodiesterase beta-subunit gene.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**:463-470.
508. Pittler, S. J. y Baehr, W. (1991): **Identification of a nonsense mutation in the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene of the rd mouse.** *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:8322-8326.

509. Pittler, S. J., Baehr, W., Wasmuth, J. J., McConnell, D. G., Champagne, M. S., vanTuinen, P., Ledbetter, D. y Davis, R. L. (1990): **Molecular characterization of human and bovine rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase alpha-subunit and chromosomal localization of the human gene.** *Genomics* **6**:272-283.
510. Pittler, S. J., Lee, A. K., Altherr, M. R., Howard, T. A., Seldin, M. F., Hurwitz, R. L., Wasmuth, J. J. y Baehr, W. (1992): **Primary structure and chromosomal localization of human and mouse rod photoreceptor cGMP-gated cation channel.** *J Biol Chem* **267**:6257-6262.
511. Pittler, S. J., Zhang, Y., Chen, S., Mears, A. J., Zack, D. J., Ren, Z., Swain, P. K., Yao, S., Swaroop, A. y White, J. B. (2004): **Functional analysis of the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase alpha-subunit gene promoter: Nrl and Crx are required for full transcriptional activity.** *J Biol Chem* **279**:19800-19807.
512. Poetsch, A., Molday, L. L. y Molday, R. S. (2001): **The cGMP-gated channel and related glutamic acid-rich proteins interact with peripherin-2 at the rim region of rod photoreceptor disc membranes.** *J Biol Chem* **276**:48009-48016.
513. Pomares, E., Marfany, G., Brion, M. J., Carracedo, A. y González-Duarte, R. (2007): **Novel high-throughput SNP genotyping cosegregation analysis for genetic diagnosis of autosomal recessive retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis.** *Hum Mutat* **28**:511-516.
514. Porter, M. E., Bower, R., Knott, J. A., Byrd, P. y Dentler, W. (1999): **Cytoplasmic dynein heavy chain 1b is required for flagellar assembly in Chlamydomonas.** *Mol Biol Cell* **10**:693-712.
515. Portera-Cailliau, C., Sung, C. H., Nathans, J. y Adler, R. (1994): **Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa.** *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:974-978.
516. Pugh, E. N. (2001): **Rods are rods and cones cones, and (never) the twain shall meet.** *Neuron* **32**:375-376.
517. Pugh, E. N. (2006): **RGS expression level precisely regulates the duration of rod photoresponses.** *Neuron* **51**:391-393.
518. Pusch, C. M., Broghammer, M., Jurklics, B., Besch, D. y Jacobi, F. K. (2002): **Ten novel ORF15 mutations confirm mutational hot spot in the RPGR gene in European patients with X-linked retinitis pigmentosa.** *Hum Mutat* **20**:405.

R

519. Rattner, A., Chen, J. y Nathans, J. (2004): **Proteolytic shedding of the extracellular domain of photoreceptor cadherin. Implications for outer segment assembly.** *J Biol Chem* **279**:42202-42210.
520. Rattner, A., Smallwood, P. M. y Nathans, J. (2000): **Identification and characterization of all-trans-retinol dehydrogenase from photoreceptor outer segments, the visual cycle enzyme that reduces all-trans-retinal to all-trans-retinol.** *J Biol Chem* **275**:11034-11043.
521. Rattner, A., Sun, H. y Nathans, J. (1999): **Molecular genetics of human retinal disease.** *Annu Rev Genet* **33**:89-131.
522. Rebello, G., Ramesar, R., Vorster, A., Roberts, L., Ehrenreich, L., Oppon, E., Gama, D., Bardien, S., Greenberg, J., Bonapace, G., Waheed, A., Shah, G. N. y Sly, W. S. (2004): **Apoptosis-inducing signal sequence mutation in carbonic anhydrase IV identified in patients with the RP17 form of retinitis pigmentosa.** *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:6617-6622.
523. Rebello, G., Vorster, A., Greenberg, J., Coutts, N., Roberts, L., Ehrenreich, L., Gama, D. y Ramesar, R. (2003): **Analysis of RPGR in a South African family with X-linked retinitis pigmentosa: research and diagnostic implications.** *Clin Genet* **64**:137-141.
524. Redmond, T. M., Yu, S., Lee, E., Bok, D., Hamasaki, D., Chen, N., Goletz, P., Ma, J. X., Crouch, R. K. y Pfeifer, K. (1998): **Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle.** *Nat Genet* **20**:344-351.
525. Rehemtulla, A., Warwar, R., Kumar, R., Ji, X., Zack, D. J. y Swaroop, A. (1996): **The basic motif-leucine zipper transcription factor Nrl can positively regulate rhodopsin gene expression.** *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:191-195.
526. Reiners, J., Nagel-Wolfrum, K., Jurgens, K., Marker, T. y Wolfrum, U. (2006): **Molecular basis of human Usher syndrome: deciphering the meshes of the Usher protein network provides insights into the pathomechanisms of the Usher disease.** *Exp Eye Res* **83**:97-119.
527. Reiners, J., Reidel, B., El-Amraoui, A., Boeda, B., Huber, I., Petit, C. y Wolfrum, U. (2003): **Differential distribution of harmonin isoforms and their possible role in Usher-1 protein complexes in mammalian photoreceptor cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:5006-5015.

528. Reingruber, J. y Holcman, D. (2008): **The dynamics of phosphodiesterase activation in rods and cones.** *Biophys J* **94**:1954-1970.
529. Reme, C., Wirz-Justice, A., Rhyner, A. y Hofmann, S. (1986): **Circadian rhythm in the light response of rat retinal disk-shedding and autophagy.** *Brain Res* **369**:356-360.
530. Riazuddin, S. A., Zulfiqar, F., Zhang, Q., Sergeev, Y. V., Qazi, Z. A., Husnain, T., Caruso, R., Riazuddin, S., Sieving, P. A. y Hejtmancik, J. F. (2005): **Autosomal recessive retinitis pigmentosa is associated with mutations in RP1 in three consanguineous Pakistani families.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**:2264-2270.
531. Rice, D. S., Huang, W., Jones, H. A., Hansen, G., Ye, G. L., Xu, N., Wilson, E. A., Troughton, K., Vaddi, K., Newton, R. C., Zambrowicz, B. P. y Sands, A. T. (2004): **Severe Retinal Degeneration Associated with Disruption of Semaphorin 4A.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**:2767-2777.
532. Ridge, K. D. y Palczewski, K. (2007): **Visual rhodopsin sees the light: structure and mechanism of G protein signaling.** *J Biol Chem* **282**:9297-9301.
533. Rivolta, C., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (2002a): **Paternal uniparental heterodisomy with partial isodisomy of chromosome 1 in a patient with retinitis pigmentosa without hearing loss and a missense mutation in the Usher syndrome type II gene USH2A.** *Arch Ophthalmol* **120**:1566-1571.
534. Rivolta, C., McGee, T. L., Rio, F. T., Jensen, R. V., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (2006): **Variation in retinitis pigmentosa-11 (PRPF31 or RP11) gene expression between symptomatic and asymptomatic patients with dominant RP11 mutations.** *Hum Mutat* **27**:644-653.
535. Rivolta, C., Peck, N. E., Fulton, A. B., Fishman, G. A., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (2001): **Novel frameshift mutations in CRX associated with Leber congenital amaurosis.** *Hum Mutat* **18**:550-551.
536. Rivolta, C., Sharon, D., DeAngelis, M. M. y Dryja, T. P. (2002b): **Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns.** *Hum Mol Genet* **11**:1219-1227.
537. Rivolta, C., Sweklo, E. A., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (2000): **Missense mutation in the USH2A gene: association with recessive retinitis pigmentosa without hearing loss.** *Am J Hum Genet* **66**:1975-1978.
538. Roberts, L., Bartmann, L., Ramesar, R. y Greenberg, J. (2006): **Novel variants in the hotspot region of RP1 in South African patients with retinitis pigmentosa.** *Mol Vis* **12**:177-183.
539. Robson, A. G., Egan, C. A., Luong, V. A., Bird, A. C., Holder, G. E. y Fitzke, F. W. (2004): **Comparison of fundus autofluorescence with photopic and scotopic fine-matrix mapping in patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**:4119-4125.
540. Robson, A. G., El-Amir, A., Bailey, C., Egan, C. A., Fitzke, F. W., Webster, A. R., Bird, A. C. y Holder, G. E. (2003): **Pattern ERG correlates of abnormal fundus autofluorescence in patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:3544-3550.
541. Robson, A. G., Saihan, Z., Jenkins, S. A., Fitzke, F. W., Bird, A. C., Webster, A. R. y Holder, G. E. (2006): **Functional characterisation and serial imaging of abnormal fundus autofluorescence in patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity.** *Br J Ophthalmol* **90**:472-479.
542. Rodríguez de Turco, E. B., Gordon, W. C. y Bazan, N. G. (1992): **Light stimulates in vivo inositol lipid turnover in frog retinal pigment epithelial cells at the onset of shedding and phagocytosis of photoreceptor membranes.** *Exp Eye Res* **55**:719-725.
543. Roepman, R., Bernoud-Hubac, N., Schick, D. E., Maugeri, A., Berger, W., Ropers, H. H., Cremers, F. P. y Ferreira, P. A. (2000): **The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) interacts with novel transport-like proteins in the outer segments of rod photoreceptors.** *Hum Mol Genet* **9**:2095-2105.
544. Roepman, R., van, D. G., Rosenberg, T., Pinckers, A. J., Bleeker-Wagemakers, L. M., Bergen, A. A., Post, J., Beck, A., Reinhardt, R., Ropers, H. H., Cremers, F. P. y Berger, W. (1996): **Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 3: homology with the guanine-nucleotide-exchange factor RCC1.** *Hum Mol Genet* **5**:1035-1041.
545. Rohrer, B., Pinto, F. R., Hulse, K. E., Lohr, H. R., Zhang, L. y Almeida, J. S. (2004): **Multidestructive pathways triggered in photoreceptor cell death of the rd mouse as determined through gene expression profiling.** *J Biol Chem* **279**:41903-41910.
546. Rosenbaum, J. L., Cole, D. G. y Diener, D. R. (1999): **Intraflagellar transport: the eyes have it.** *J Cell Biol* **144**:385-388.
547. Rosenbaum, J. L. y Witman, G. B. (2002): **Intraflagellar transport.** *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:813-825.

548. Rosenfeld, P. J., Cowley, G. S., McGee, T. L., Sandberg, M. A., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (1992): **A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *Nat Genet* **1**:209-213.
549. Rottbauer, W., Gautel, M., Zehelein, J., Labeit, S., Franz, W. M., Fischer, C., Vollrath, B., Mall, G., Dietz, R., Kubler, W. y Katus, H. A. (1997): **Novel splice donor site mutation in the cardiac myosin-binding protein-C gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. Characterization Of cardiac transcript and protein.** *J Clin Invest* **100**:475-482.
550. Rozet, J. M., Perrault, I., Gigarel, N., Souied, E., Ghazi, I., Gerber, S., Dufier, J. L., Munnich, A. y Kaplan, J. (2002): **Dominant X linked retinitis pigmentosa is frequently accounted for by truncating mutations in exon ORF15 of the RPGR gene.** *J Med Genet* **39**:284-285.
551. Ruiz, A., Borrego, S., Marcos, I. y Antiñolo, G. (1998): **A major locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa on 6q, determined by homozygosity mapping of chromosomal regions that contain gamma-aminobutyric acid-receptor clusters.** *Am J Hum Genet* **62**:1452-1459.
552. Ruiz, A., Kuehn, M. H., Andorf, J. L., Stone, E., Hageman, G. S. y Bok, D. (2001): **Genomic organization and mutation analysis of the gene encoding lecithin retinol acyltransferase in human retinal pigment epithelium.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**:31-37.
553. Ruiz, A., Winston, A., Lim, Y. H., Gilbert, B. A., Rando, R. R. y Bok, D. (1999): **Molecular and biochemical characterization of lecithin retinol acyltransferase.** *J Biol Chem* **274**:3834-3841.
554. Ryeom, S. W., Silverstein, R. L., Scotto, A. y Sparrow, J. R. (1996a): **Binding of anionic phospholipids to retinal pigment epithelium may be mediated by the scavenger receptor CD36.** *J Biol Chem* **271**:20536-20539.
555. Ryeom, S. W., Sparrow, J. R. y Silverstein, R. L. (1996b): **CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium.** *J Cell Sci* **109**:387-395.

S

556. Sadler, T. W. (2004): **Langman Embriología Médica. Con orientación clínica.** 9ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid.
557. Saishin, Y., Ishikawa, R., Ugawa, S., Guo, W., Ueda, T., Morimura, H., Kohama, K., Shimizu, H., Tano, Y. y Shimada, S. (2000): **Retinal fascin: functional nature, subcellular distribution, and chromosomal localization.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**:2087-2095.
558. Saishin, Y., Shimada, S., Morimura, H., Sato, K., Ishimoto, I., Tano, Y. y Tohyama, M. (1997): **Isolation of a cDNA encoding a photoreceptor cell-specific actin-bundling protein: retinal fascin.** *FEBS Lett* **414**:381-386.
559. Sakai, N., Santamarina-Fojo, S., Yamashita, S., Matsuzawa, Y. y Brewer, H. B. (1996): **Exon 10 skipping caused by intron 10 splice donor site mutation in cholesteryl ester transfer protein gene results in abnormal downstream splice site selection.** *J Lipid Res* **37**:2065-2073.
560. Sakuma, H., Inana, G., Murakami, A., Yajima, T., Weleber, R. G., Murphey, W. H., Gass, J. D., Hotta, Y., Hayakawa, M., Fujiki, K., Gao, Y. Q., Danciger, M., Farber, D., Cideciyan, A. V. y Jacobson, S. G. (1995): **A heterozygous putative null mutation in ROM1 without a mutation in peripherin/RDS in a family with retinitis pigmentosa.** *Genomics* **27**:384-386.
561. Sandberg, M. A., Brockhurst, R. J., Gaudio, A. R. y Berson, E. L. (2005): **The association between visual acuity and central retinal thickness in retinitis pigmentosa.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**:3349-3354.
562. Santagata, S., Boggon, T. J., Baird, C. L., Gomez, C. A., Zhao, J., Shan, W. S., Myszka, D. G. y Shapiro, L. (2001): **G-protein signaling through tubby proteins.** *Science* **292**:2041-2050.
563. Sato, M., Nakazawa, M., Usui, T., Tanimoto, N., Abe, H. y Ohguro, H. (2005): **Mutations in the gene coding for guanylate cyclase-activating protein 2 (GUCA1B gene) in patients with autosomal dominant retinal dystrophies.** *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **243**:235-242.
564. Sazer, S. (1996): **The search for the primary function of the Ran GTPase continues.** *Trends Cell Biol* **6**:81-85.
565. Schädel, S. A., Heck, M., Maretzki, D., Filipek, S., Teller, D. C., Palczewski, K. y Hofmann, K. P. (2003): **Ligand channeling within a G-protein-coupled receptor. The entry and exit of retinals in native opsin.** *J Biol Chem* **278**:24896-24903.
566. Schmitt, A. y Wolfrum, U. (2001): **Identification of novel molecular components of the photoreceptor connecting cilium by immunoscreens.** *Exp Eye Res* **73**:837-849.

567. Schwahn, U., Lenzner, S., Dong, J., Feil, S., Hinzmann, B., van Duijnhoven, G., Kirschner, R., Hemberger, M., Bergen, A. A., Rosenberg, T., Pinckers, A. J., Fundele, R., Rosenthal, A., Cremers, F. P., Ropers, H. H. y Berger, W. (1998): **Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2.** *Nat Genet* **19**:327-332.
568. Schwahn, U., Paland, N., Techritz, S., Lenzner, S. y Berger, W. (2001): **Mutations in the X-linked RP2 gene cause intracellular misrouting and loss of the protein.** *Hum Mol Genet* **10**:1177-1183.
569. Senechal, A., Humbert, G., Surget, M. O., Bazalgette, C., Bazalgette, C., Arnaud, B., Arndt, C., Laurent, E., Brabet, P. y Hamel, C. P. (2006): **Screening genes of the retinoid metabolism: novel LRAT mutation in leber congenital amaurosis.** *Am J Ophthalmol* **142**:702-704.
570. Seyedahmadi, B. J., Rivolta, C., Keene, J. A., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (2004): **Comprehensive screening of the USH2A gene in Usher syndrome type II and non-syndromic recessive retinitis pigmentosa.** *Exp Eye Res* **79**:167-173.
571. Sharon, D., Bruns, G. A., McGee, T. L., Sandberg, M. A., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (2000): **X-linked retinitis pigmentosa: mutation spectrum of the RPGR and RP2 genes and correlation with visual function.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**:2712-2721.
572. Sharon, D., Sandberg, M. A., Caruso, R. C., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (2003a): **Shared mutations in NR2E3 in enhanced S-cone syndrome, Goldmann-Favre syndrome, and many cases of clumped pigmentary retinal degeneration.** *Arch Ophthalmol* **121**:1316-1323.
573. Sharon, D., Sandberg, M. A., Rabe, V. W., Stillberger, M., Dryja, T. P. y Berson, E. L. (2003b): **RP2 and RPGR mutations and clinical correlations in patients with X-linked retinitis pigmentosa.** *Am J Hum Genet* **73**:1131-1146.
574. Shen, D., Jiang, M., Hao, W., Tao, L., Salazar, M. y Fong, H. K. (1994): **A human opsin-related gene that encodes a retinaldehyde-binding protein.** *Biochemistry* **33**:13117-13125.
575. Shichida, Y. y Yamashita, T. (2003): **Diversity of visual pigments from the viewpoint of G protein activation--comparison with other G protein-coupled receptors.** *Photochem Photobiol Sci* **2**:1237-1246.
576. Shroyer, N. F., Lewis, R. A., Allikmets, R., Singh, N., Dean, M., Leppert, M. y Lupski, J. R. (1999): **The rod photoreceptor ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, and retinal disease: from monogenic to multifactorial.** *Vision Res* **39**:2537-2544.
577. Shu, X., Black, G. C., Rice, J. M., Hart-Holden, N., Jones, A., O'Grady, A., Ramsden, S. y Wright, A. F. (2007): **RPGR mutation analysis and disease: an update.** *Hum Mutat* **28**:322-328.
578. Shu, X., Fry, A. M., Tulloch, B., Manson, F. D., Crabb, J. W., Khanna, H., Faragher, A. J., Lennon, A., He, S., Trojan, P., Giessl, A., Wolfrum, U., Vervoort, R., Swaroop, A. y Wright, A. F. (2005): **RPGR ORF15 isoform co-localizes with RPGRIP1 at centrioles and basal bodies and interacts with nucleophosmin.** *Hum Mol Genet* **14**:1183-1197.
579. Simon, A., Hellman, U., Wernstedt, C. y Eriksson, U. (1995): **The retinal pigment epithelial-specific 11-cis retinol dehydrogenase belongs to the family of short chain alcohol dehydrogenases.** *J Biol Chem* **270**:1107-1112.
580. Simonelli, F., Rinaldi, M., Nesti, A., Testa, F., Rinaldi, E., Ciccodicola, A., Flagiello, L., Miano, M. G., Ventruto, V. y D'Urso, M. (1998): **Ocular signs associated with a rhodopsin mutation (Cys-167→Arg) in a family with autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Br J Ophthalmol* **82**:709.
581. Simovich, M. J., Miller, B., Ezzeldin, H., Kirkland, B. T., McLeod, G., Fulmer, C., Nathans, J., Jacobson, S. G. y Pittler, S. J. (2001): **Four novel mutations in the RPE65 gene in patients with Leber congenital amaurosis.** *Hum Mutat* **18**:164.
582. Skegrod, D., Pulvermuller, A., Krafft, B., Granzin, J., Hofmann, K. P., Buldt, G. y Schlesinger, R. (2007): **N-terminal and C-terminal domains of arrestin both contribute in binding to rhodopsin.** *Photochem Photobiol.* **83**:385-392.
583. Smelser, G. K., Ozanics, V., Rayborn, M. y Sagun, D. (1973): **The fine structure of the retinal transient layer of Chievitz.** *Invest Ophthalmol* **12**:504-512.
584. Smith, W. C., Milam, A. H., Dugger, D., Arendt, A., Hargrave, P. A. y Palczewski, K. (1994): **A splice variant of arrestin. Molecular cloning and localization in bovine retina.** *J Biol Chem* **269**:15407-15410.
585. Sohocki, M. M., Sullivan, L. S., Mintz-Hittner, H. A., Birch, D., Heckenlively, J. R., Freund, C. L., McInnes, R. R. y Daiger, S. P. (1998): **A range of clinical phenotypes associated with mutations in CRX, a photoreceptor transcription-factor gene.** *Am J Hum Genet* **63**:1307-1315.
586. Sokolov, M., Lyubarsky, A. L., Strissel, K. J., Savchenko, A. B., Govardovskii, V. I., Pugh, E. N. y Arshavsky, V. Y. (2002): **Massive light-driven translocation of transducin between the two major compartments of rod cells: a novel mechanism of light adaptation.** *Neuron* **34**:95-106.

587. Sokolov, M., Strissel, K. J., Leskov, I. B., Michaud, N. A., Govardovskii, V. I. y Arshavsky, V. Y. (2004): **Phosducin facilitates light-driven transducin translocation in rod photoreceptors. Evidence from the phosducin knockout mouse.** *J Biol Chem* **279**:19149-19156.
588. Sparkes, R. S., Heinzmann, C., Goldflam, S., Kojis, T., Saari, J. C., Mohandas, T., Klisak, I., Bateman, J. B. y Crabb, J. W. (1992): **Assignment of the gene (RLBP1) for cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) to human chromosome 15q26 and mouse chromosome 7.** *Genomics* **12**:58-62.
589. Sparrow, J. R., Ryeom, S. W., Abumrad, N. A., Ibrahimi, A. y Silverstein, R. L. (1997): **CD36 expression is altered in retinal pigment epithelial cells of the RCS rat.** *Exp Eye Res* **64**:45-56.
590. Sparrow, J. R., Vollmer-Snarr, H. R., Zhou, J., Jang, Y. P., Jockusch, S., Itagaki, Y. y Nakanishi, K. (2003): **A2E-epoxides Damage DNA in Retinal Pigment Epithelial Cells. Vitamin E and other antioxidants inhibit A2E-epoxide formation.** *J Biol Chem* **278**:18207-18213.
591. Spudich, J. L., Yang, C. S., Jung, K. H. y Spudich, E. N. (2000): **Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans.** *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**:365-392.
592. Stone, E. M., Webster, A. R., Vandenburgh, K., Streb, L. M., Hockey, R. R., Lotery, A. J. y Sheffield, V. C. (1998): **Allelic variation in ABCR associated with Stargardt disease but not age-related macular degeneration.** *Nat Genet* **20**:328-329.
593. Strachan, T. y Read, A. P. (2004): **Human Molecular Genetics.** 3ª Edición. Garland Science. New York.
594. Strauss, O. (2005): **The retinal pigment epithelium in visual function.** *Physiol Rev* **85**:845-881.
595. Strissel, K. J., Lishko, P. V., Trieu, L. H., Kennedy, M. J., Hurley, J. B. y Arshavsky, V. Y. (2005): **Recoverin undergoes light-dependent intracellular translocation in rod photoreceptors.** *J Biol Chem* **280**:29250-29255.
596. Strissel, K. J., Sokolov, M., Trieu, L. H. y Arshavsky, V. Y. (2006): **Arrestin translocation is induced at a critical threshold of visual signaling and is superstoichiometric to bleached rhodopsin.** *J Neurosci* **26**:1146-1153.
597. Suber, M. L., Pittler, S. J., Qin, N., Wright, G. C., Holcombe, V., Lee, R. H., Craft, C. M., Lolley, R. N., Baehr, W. y Hurwitz, R. L. (1993): **Irish setter dogs affected with rod/cone dysplasia contain a nonsense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene.** *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:3968-3972.
598. Sugiura, M., Kono, K., Liu, H., Shimizugawa, T., Minekura, H., Spiegel, S. y Kohama, T. (2002): **Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization.** *J Biol Chem* **277**:23294-23300.
599. Sullivan, L. S., Bowne, S. J., Birch, D. G., Hughbanks-Wheaton, D., Heckenlively, J. R., Lewis, R. A., García, C. A., Ruiz, R. S., Blanton, S. H., Northrup, H., Gire, A. I., Seaman, R., Duzkale, H., Spellicy, C. J., Zhu, J., Shankar, S. P. y Daiger, S. P. (2006a): **Prevalence of disease-causing mutations in families with autosomal dominant retinitis pigmentosa: a screen of known genes in 200 families.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**:3052-3064.
600. Sullivan, L. S., Bowne, S. J., Seaman, C. R., Blanton, S. H., Lewis, R. A., Heckenlively, J. R., Birch, D. G., Hughbanks-Wheaton, D. y Daiger, S. P. (2006b): **Genomic rearrangements of the PRPF31 gene account for 2.5% of autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**:4579-4588.
601. Sullivan, L. S., Heckenlively, J. R., Bowne, S. J., Zuo, J., Hide, W. A., Gal, A., Denton, M., Inglehearn, C. F., Blanton, S. H. y Daiger, S. P. (1999): **Mutations in a novel retina-specific gene cause autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Nat Genet* **22**:255-259.
602. Sun, H. y Nathans, J. (1997): **Stargardt's ABCR is localized to the disc membrane of retinal rod outer segments.** *Nat Genet* **17**:15-16.
603. Sung, C. H., Davenport, C. M., Hennessey, J. C., Maumenee, I. H., Jacobson, S. G., Heckenlively, J. R., Nowakowski, R., Fishman, G., Gouras, P. y Nathans, J. (1991): **Rhodopsin mutations in autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:6481-6485.
604. Sung, C. H., Davenport, C. M. y Nathans, J. (1993): **Rhodopsin mutations responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. Clustering of functional classes along the polypeptide chain.** *J Biol Chem* **268**:26645-26649.
605. Sung, C. H., Makino, C., Baylor, D. y Nathans, J. (1994): **A rhodopsin gene mutation responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa results in a protein that is defective in localization to the photoreceptor outer segment.** *J Neurosci* **14**:5818-5833.
606. Surguchov, A., Bronson, J. D., Banerjee, P., Knowles, J. A., Ruiz, C., Subbaraya, I., Palczewski, K. y Baehr, W. (1997): **The human GCAP1 and GCAP2 genes are arranged in a tail-to-tail array on the short arm of chromosome 6 (p21.1).** *Genomics* **39**:312-322.

607. Swain, P. K., Chen, S., Wang, Q. L., Affatigato, L. M., Coats, C. L., Brady, K. D., Fishman, G. A., Jacobson, S. G., Swaroop, A., Stone, E., Sieving, P. A. y Zack, D. J. (1997): **Mutations in the cone-rod homeobox gene are associated with the cone-rod dystrophy photoreceptor degeneration.** *Neuron* **19**:1329-1336.
608. Swain, P. K., Hicks, D., Mears, A. J., Apel, I. J., Smith, J. E., John, S. K., Hendrickson, A., Milam, A. H. y Swaroop, A. (2001): **Multiple phosphorylated isoforms of NRL are expressed in rod photoreceptors.** *J Biol Chem* **276**:36824-36830.
609. Swaroop, A., Wang, Q. L., Wu, W., Cook, J., Coats, C., Xu, S., Chen, S., Zack, D. J. y Sieving, P. A. (1999): **Leber congenital amaurosis caused by a homozygous mutation (R90W) in the homeodomain of the retinal transcription factor CRX: direct evidence for the involvement of CRX in the development of photoreceptor function.** *Hum Mol Genet* **8**:299-305.
610. Swaroop, A., Xu, J. Z., Pawar, H., Jackson, A., Skolnick, C. y Agarwal, N. (1992): **A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain.** *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:266-270.
611. Sweeney, M. O., McGee, T. L., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (2007): **Low prevalence of lecithin retinol acyltransferase mutations in patients with Leber congenital amaurosis and autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *Mol Vis* **13**:588-593.

T

612. Tada, A., Wada, Y., Sato, H., Itabashi, T., Kawamura, M., Tamai, M. y Nishida, K. (2006): **Screening of the MERTK gene for mutations in Japanese patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *Mol Vis* **12**:441-444.
613. Tam, B. M., Moritz, O. L. y Papermaster, D. S. (2004): **The C terminus of peripherin/rds participates in rod outer segment targeting and alignment of disk incisures.** *Mol Biol Cell* **15**:2027-2037.
614. Teirstein, P. S., Goldman, A. I. y O'Brien, P. J. (1980): **Evidence for both local and central regulation of rat rod outer segment disc shedding.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **19**:1268-1273.
615. Thiselton, D. L., Hampson, R. M., Nayudu, M., Van, M. L., Wolf, M. L., Saha, B. K., Bhattacharya, S. S. y Hardcastle, A. J. (1996): **Mapping the RP2 locus for X-linked retinitis pigmentosa on proximal Xp: a genetically defined 5-cM critical region and exclusion of candidate genes by physical mapping.** *Genome Res* **6**:1093-1102.
616. Thiselton, D. L., Zito, I., Plant, C., Jay, M., Hodgson, S. V., Bird, A. C., Bhattacharya, S. S. y Hardcastle, A. J. (2000): **Novel frameshift mutations in the RP2 gene and polymorphic variants.** *Hum Mutat* **15**:580.
617. Thompson, D. A., Gyurus, P., Fleischer, L. L., Bingham, E. L., McHenry, C. L., pfelstedt-Sylla, E., Zrenner, E., Lorenz, B., Richards, J. E., Jacobson, S. G., Sieving, P. A. y Gal, A. (2000): **Genetics and phenotypes of RPE65 mutations in inherited retinal degeneration.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**:4293-4299.
618. Thompson, D. A., Li, Y., McHenry, C. L., Carlson, T. J., Ding, X., Sieving, P. A., pfelstedt-Sylla, E. y Gal, A. (2001): **Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy.** *Nat Genet* **28**:123-124.
619. Thompson, D. A., McHenry, C. L., Li, Y., Richards, J. E., Othman, M. I., Schwinger, E., Vollrath, D., Jacobson, S. G. y Gal, A. (2002): **Retinal dystrophy due to paternal isodisomy for chromosome 1 or chromosome 2, with homoallelism for mutations in RPE65 or MERTK, respectively.** *Am J Hum Genet* **70**:224-229.
620. Tian, G., Huang, Y., Rommelaere, H., Vandekerckhove, J., Ampe, C. y Cowan, N. J. (1996): **Pathway leading to correctly folded beta-tubulin.** *Cell* **86**:287-296.
621. Tosi, G. M., de Santi, M. M., Pradal, U., Braggion, C. y Luzi, P. (2003): **Clinicopathologic reports, case reports, and small case series: usher syndrome type 1 associated with primary ciliary aplasia.** *Arch Ophthalmol* **121**:407-408.
622. Travis, G. H. (1998): **Mechanisms of cell death in the inherited retinal degenerations.** *Am J Hum Genet* **62**:503-508.
623. Travis, G. H., Christerson, L., Danielson, P. E., Klisak, I., Sparkes, R. S., Hahn, L. B., Dryja, T. P. y Sutcliffe, J. G. (1991a): **The human retinal degeneration slow (RDS) gene: chromosome assignment and structure of the mRNA** *Genomics* **10**:733-739.
624. Travis, G. H., Groshan, K. R., Lloyd, M. y Bok, D. (1992): **Complete rescue of photoreceptor dysplasia and degeneration in transgenic retinal degeneration slow (rds) mice.** *Neuron* **9**:113-119.
625. Travis, G. H., Sutcliffe, J. G. y Bok, D. (1991b): **The retinal degeneration slow (rds) gene product is a photoreceptor disc membrane-associated glycoprotein.** *Neuron* **6**:61-70.

626. Troutt, L. L. y Burnside, B. (1988a): **Microtubule polarity and distribution in teleost photoreceptors.** *J Neurosci* **8**:2371-2380.
627. Troutt, L. L. y Burnside, B. (1988b): **The unusual microtubule polarity in teleost retinal pigment epithelial cells.** *J Cell Biol* **107**:1461-1464.
628. Tsang, S. H., Burns, M. E., Calvert, P. D., Gouras, P., Baylor, D. A., Goff, S. P. y Arshavsky, V. Y. (1998): **Role for the target enzyme in deactivation of photoreceptor G protein in vivo.** *Science* **282**:117-121.
629. Tschernutter, M., Jenkins, S. A., Waseem, N. H., Saihan, Z., Holder, G. E., Bird, A. C., Bhattacharya, S. S., Ali, R. R. y Webster, A. R. (2006): **Clinical characterisation of a family with retinal dystrophy caused by mutation in the Mertk gene.** *Br J Ophthalmol* **90**:718-723.
630. Tubb, B. E., Bardien-Kruger, S., Kashork, C. D., Shaffer, L. G., Ramagli, L. S., Xu, J., Siciliano, M. J. y Bryan, J. (2000): **Characterization of human retinal fascin gene (FSCN2) at 17q25: close physical linkage of fascin and cytoplasmic actin genes.** *Genomics* **65**:146-156.
631. Tulvatana, W., Adamian, M., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (1999): **Photoreceptor rosettes in autosomal dominant retinitis pigmentosa with reduced penetrance.** *Arch Ophthalmol* **117**:399-402.
632. Tusón, M., Marfany, G. y González-Duarte, R. (2004): **Mutation of CERKL, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26).** *Am J Hum Genet* **74**:128-138.
633. Tzekov, R. T., Locke, K. G., Hood, D. C. y Birch, D. G. (2003): **Cone and rod ERG phototransduction parameters in retinitis pigmentosa.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:3993-4000.

V

634. Vaithinathan, R., Berson, E. L. y Dryja, T. P. (1994): **Further screening of the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Genomics* **21**:461-463.
635. Valadkhan, S. (2007): **The spliceosome: caught in a web of shifting interactions.** *Curr Opin Struct Biol* **17**:310-315.
636. Valverde, D., Baiget, M., Seminago, R., Del, R. E., García-Sandoval, B., Del, R. T., Bayes, M., Balcells, S., Martínez, A., Grinberg, D. y Ayuso, C. (1996): **Identification of a novel R552Q mutation in exon 13 of the beta-subunit of rod phosphodiesterase gene in a Spanish family with autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *Hum Mutat* **8**:393-394.
637. van de Pavert, S. A., Kantardzhieva, A., Malysheva, A., Meuleman, J., Versteeg, I., Levelt, C., Klooster, J., Geiger, S., Seeliger, M. W., Rashbass, P., Le, B. A. y Wijnholds, J. (2004): **Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure.** *J Cell Sci* **117**:4169-4177.
638. van Heyningen, V. y Yeyati, P. L. (2004): **Mechanisms of non-Mendelian inheritance in genetic disease.** *Hum Mol Genet* **13**:R225-R233.
639. Van Hooser, J. P., Aleman, T. S., He, Y. G., Cideciyan, A. V., Kuksa, V., Pittler, S. J., Stone, E. M., Jacobson, S. G. y Palczewski, K. (2000): **Rapid restoration of visual pigment and function with oral retinoid in a mouse model of childhood blindness.** *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:8623-8628.
640. van Soest, S., van den Ingeborgh, B. L., Gal, A., Farrar, G. J., Bleeker-Wagemakers, L. M., Westerveld, A., Humphries, P., Sandkuijl, L. A. y Bergen, A. A. (1994): **Assignment of a gene for autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP12) to chromosome 1q31-q32.1 in an inbred and genetically heterogeneous disease population.** *Genomics* **22**:499-504.
641. van Soest S., Westerveld, A., de Jong, P. T., Bleeker-Wagemakers, E. M. y Bergen, A. A. (1999): **Retinitis pigmentosa: defined from a molecular point of view.** *Surv Ophthalmol* **43**:321-334.
642. van Wijk E., Pennings, R. J., te, B. H., Claassen, A., Yntema, H. G., Hoefsloot, L. H., Cremers, F. P., Cremers, C. W. y Kremer, H. (2004): **Identification of 51 novel exons of the Usher syndrome type 2A (USH2A) gene that encode multiple conserved functional domains and that are mutated in patients with Usher syndrome type II.** *Am J Hum Genet* **74**:738-744.
643. Vervoort, R., Lennon, A., Bird, A. C., Tulloch, B., Axton, R., Miano, M. G., Meindl, A., Meitinger, T., Ciccodicola, A. y Wright, A. F. (2000): **Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa.** *Nat Genet* **25**:462-466.
644. Vervoort, R. y Wright, A. F. (2002): **Mutations of RPGR in X-linked retinitis pigmentosa (RP3).** *Hum Mutat* **19**:486-500.

645. Vishnivetskiy, S. A., Raman, D., Wei, J., Kennedy, M. J., Hurley, J. B. y Gurevich, V. V. (2007): **Regulation of arrestin binding by rhodopsin phosphorylation level.** *J Biol Chem* **282**:32075-32083.
646. Vithana, E. N., bu-Safieh, L., Allen, M. J., Carey, A., Papaioannou, M., Chakarova, C., Al-Magthteh, M., Ebenezer, N. D., Willis, C., Moore, A. T., Bird, A. C., Hunt, D. M. y Bhattacharya, S. S. (2001): **A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRPF31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11).** *Mol Cell* **8**:375-381.
647. Vithana, E. N., bu-Safieh, L., Pelosini, L., Winchester, E., Hornan, D., Bird, A. C., Hunt, D. M., Bustin, S. A. y Bhattacharya, S. S. (2003): **Expression of PRPF31 mRNA in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa: a molecular clue for incomplete penetrance?** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:4204-4209.
648. Voaden, M. J. (1991): **Retinitis Pigmentosa and its Models.** *Prog Retin Res* **10**:293-331.
649. Vollrath, D., Feng, W., Duncan, J. L., Yasumura, D., D'Cruz, P. M., Chappelow, A., Matthes, M. T., Kay, M. A. y Lavail, M. M. (2001): **Correction of the retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of MerTK.** *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:12584-12589.
- W**
650. Wada, Y., Abe, T., Itabashi, T., Sato, H., Kawamura, M. y Tamai, M. (2003): **Autosomal dominant macular degeneration associated with 208delG mutation in the FSCN2 gene.** *Arch Ophthalmol* **121**:1613-1620.
651. Wada, Y., Abe, T., Takeshita, T., Sato, H., Yanashima, K. y Tamai, M. (2001): **Mutation of human retinal fascin gene (FSCN2) causes autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**:2395-2400.
652. Wada, Y., Nakazawa, M., Abe, T. y Tamai, M. (2000): **A new Leu253Arg mutation in the RP2 gene in a Japanese family with X-linked retinitis pigmentosa.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**:290-293.
653. Wada, Y., Tada, A., Itabashi, T., Kawamura, M., Sato, H. y Tamai, M. (2005): **Screening for mutations in the IMPDH1 gene in Japanese patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Am J Ophthalmol* **140**:163-165.
654. Waheed, A., Zhu, X. L. y Sly, W. S. (1992): **Membrane-associated carbonic anhydrase from rat lung. Purification, characterization, tissue distribution, and comparison with carbonic anhydrase IVs of other mammals.** *J Biol Chem* **267**:3308-3311.
655. Walia, S., Fishman, G. A., Edward, D. P. y Lindeman, M. (2007): **Retinal nerve fiber layer defects in RP patients.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**:4748-4752.
656. Wang, A., Forman-Kay, J., Luo, Y., Luo, M., Chow, Y. H., Plumb, J., Friesen, J. D., Tsui, L. C., Heng, H. H., Woolford, J. L., Jr. y Hu, J. (1997): **Identification and characterization of human genes encoding Hprp3p and Hprp4p, interacting components of the spliceosome.** *Hum Mol Genet* **6**:2117-2126.
657. Wang, D. G., Fan, J. B., Siao, C. J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbell, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, M. S., Shen, N., Kilburn, D., Rioux, J., Nusbaum, C., Rozen, S., Hudson, T. J., Lipshutz, R., Chee, M. y Lander, E. S. (1998): **Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome.** *Science* **280**:1077-1082.
658. Wang, D. Y., Chan, W. M., Tam, P. O., Baum, L., Lam, D. S., Chong, K. K., Fan, B. J. y Pang, C. P. (2005a): **Gene mutations in retinitis pigmentosa and their clinical implications.** *Clin Chim Acta* **351**:5-16.
659. Wang, L., Ribaud, M., Zhao, K., Yu, N., Chen, Q., Sun, Q., Wang, L. y Wang, Q. (2003): **Novel deletion in the pre-mRNA splicing gene PRPF31 causes autosomal dominant retinitis pigmentosa in a large Chinese family.** *Am J Med Genet A* **121**:235-239.
660. Wang, Q. L., Chen, S., Esumi, N., Swain, P. K., Haines, H. S., Peng, G., Melia, B. M., McIntosh, I., Heckenlively, J. R., Jacobson, S. G., Stone, E. M., Swaroop, A. y Zack, D. J. (2004): **QRX, a novel homeobox gene, modulates photoreceptor gene expression.** *Hum Mol Genet* **13**:1025-1040.
661. Wang, S., Huang, S., Liu, N., Chen, L., Oh, C. y Zhao, H. (2005b): **Whole-genome linkage analysis in mapping alcoholism genes using single-nucleotide polymorphisms and microsatellites.** *BMC Genet* **6 Suppl 1**:S28.
662. Waseem, N. H., Vaclavik, V., Webster, A., Jenkins, S. A., Bird, A. C. y Bhattacharya, S. S. (2007): **Mutations in the gene coding for the pre-mRNA splicing factor, PRPF31, in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**:1330-1334.

663. Weber, B., Riess, O., Hutchinson, G., Collins, C., Lin, B. Y., Kowbel, D., Andrew, S., Schappert, K. y Hayden, M. R. (1991): **Genomic organization and complete sequence of the human gene encoding the beta-subunit of the cGMP phosphodiesterase and its localisation to 4p 16.3.** *Nucleic Acids Res* **19**:6263-6268.
664. Weidenhammer, E. M., Ruiz-Noriega, M. y Woolford, J. L., Jr. (1997): **Prp31p promotes the association of the U4/U6 x U5 tri-snRNP with prespliceosomes to form spliceosomes in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Cell Biol* **17**:3580-3588.
665. Weidenhammer, E. M., Singh, M., Ruiz-Noriega, M. y Woolford, J. L., Jr. (1996): **The PRP31 gene encodes a novel protein required for pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Nucleic Acids Res* **24**:1164-1170.
666. Weier, H. U., Fung, J. y Lersch, R. A. (1999): **Assignment of protooncogene MERTK (a.k.a. c-mer) to human chromosome 2q14.1 by in situ hybridization.** *Cytogenet Cell Genet* **84**:91-92.
667. Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A. y Huttner, W. B. (1997): **Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:12425-12430.
668. Weil, D., Kussel, P., Blanchard, S., Levy, G., Levi-Acobas, F., Drira, M., Ayadi, H. y Petit, C. (1997): **The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene.** *Nat Genet* **16**:191-193.
669. Wells, J., Wroblewski, J., Keen, J., Inglehearn, C., Jubb, C., Eckstein, A., Jay, M., Arden, G., Bhattacharya, S., Fitzze, F. y Bird, A. (1993): **Mutations in the human retinal degeneration slow (RDS) gene can cause either retinitis pigmentosa or macular dystrophy.** *Nat Genet* **3**:213-218.
670. Wenzel, A., Oberhauser, V., Pugh, E. N., Lamb, T. D., Grimm, C., Samardzija, M., Fahl, E., Seeliger, M. W., Reme, C. E. y von, L. J. (2005): **The retinal G protein-coupled receptor (RGR) enhances isomerohydrolase activity independent of light.** *J Biol Chem* **280**:29874-29884.
671. Weston, M. D., Eudy, J. D., Fujita, S., Yao, S., Usami, S., Cremers, C., Greenberg, J., Ramesar, R., Martini, A., Moller, C., Smith, R. J., Sumegi, J. y Kimberling, W. J. (2000): **Genomic structure and identification of novel mutations in usherin, the gene responsible for Usher syndrome type IIa.** *Am J Hum Genet* **66**:1199-1210.
672. Whitehead, J. L., Wang, S. Y., Bost-Usinger, L., Hoang, E., Frazer, K. A. y Burnside, B. (1999): **Photoreceptor localization of the KIF3A and KIF3B subunits of the heterotrimeric microtubule motor kinesin II in vertebrate retina.** *Exp Eye Res* **69**:491-503.
673. Whorton, M. R., Jastrzebska, B., Park, P. S., Fotiadis, D., Engel, A., Palczewski, K. y Sunahara, R. K. (2008): **Efficient coupling of transducin to monomeric rhodopsin in a phospholipid bilayer.** *J Biol Chem* **283**:4387-4394.
674. Wolfrum, U. y Salisbury, J. L. (1998): **Expression of centrin isoforms in the mammalian retina.** *Exp Cell Res* **242**:10-17.
675. Wolfrum, U. y Schmitt, A. (2000): **Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells.** *Cell Motil Cytoskel* **46**:95-107.
676. Wong, F. (1997): **Investigating Retinitis Pigmentosa: a laboratory scientist's perspective.** *Prog Retin Eye Res* **16**:353-373.
677. Wright, A. F., Reddick, A. C., Schwartz, S. B., Ferguson, J. S., Aleman, T. S., Kellner, U., Jurklics, B., Schuster, A., Zrenner, E., Wissinger, B., Lennon, A., Shu, X., Cideciyan, A. V., Stone, E. M., Jacobson, S. G. y Swaroop, A. (2004): **Mutation analysis of NR2E3 and NRL genes in Enhanced S Cone Syndrome.** *Hum Mutat* **24**:439.
678. Wrigley, J. D., Ahmed, T., Nevett, C. L. y Findlay, J. B. (2000): **Peripherin/rds influences membrane vesicle morphology. Implications for retinopathies.** *J Biol Chem* **275**:13191-13194.
679. Wu, B. X., Chen, Y., Chen, Y., Fan, J., Rohrer, B., Crouch, R. K. y Ma, J. X. (2002): **Cloning and characterization of a novel all-trans retinol short-chain dehydrogenase/reductase from the RPE.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:3365-3372.
680. Wu, B. X., Moiseyev, G., Chen, Y., Rohrer, B., Crouch, R. K. y Ma, J. X. (2004): **Identification of RDH10, an All-trans Retinol Dehydrogenase, in Retinal Muller Cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**:3857-3862.

X

681. Xi, Q., Pauer, G. J., Ball, S. L., Rayborn, M., Hollyfield, J. G., Peachey, N. S., Crabb, J. W. y Hagstrom, S. A. (2007): **Interaction between the photoreceptor-specific tubby-like protein 1 and the neuronal-specific GTPase dynamin-1.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**:2837-2844.

682. Xi, Q., Pauer, G. J., Marmorstein, A. D., Crabb, J. W. y Hagstrom, S. A. (2005): **Tubby-like protein 1 (TULP1) interacts with F-actin in photoreceptor cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**:4754-4761.
683. Xia, K., Zheng, D., Pan, Q., Liu, Z., Xi, X., Hu, Z., Deng, H., Liu, X., Jiang, D., Deng, H. y Xia, J. (2004): **A novel PRPF31 splice-site mutation in a Chinese family with autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *Mol Vis* **10**:361-365.
684. Xu, S. Y., Schwartz, M., Rosenberg, T. y Gal, A. (1996): **A ninth locus (RP18) for autosomal dominant retinitis pigmentosa maps in the pericentromeric region of chromosome 1.** *Hum Mol Genet* **5**:1193-1197.
685. Xue, L., Gollapalli, D. R., Maiti, P., Jahng, W. J. y Rando, R. R. (2004): **A palmitoylation switch mechanism in the regulation of the visual cycle.** *Cell* **117**:761-771.

Y

686. Yanagihashi, S., Nakazawa, M., Kurotaki, J., Sato, M., Miyagawa, Y. y Ohguro, H. (2003): **Autosomal dominant central areolar choroidal dystrophy and a novel Arg195Leu mutation in the peripherin/RDS gene.** *Arch Ophthalmol* **121**:1458-1461.
687. Yang, Z., Álvarez, B. V., Chakarova, C., Jiang, L., Karan, G., Frederick, J. M., Zhao, Y., Sauve, Y., Li, X., Zrenner, E., Wissinger, B., Hollander, A. I., Katz, B., Baehr, W., Cremers, F. P., Casey, J. R., Bhattacharya, S. S. y Zhang, K. (2005): **Mutant carbonic anhydrase 4 impairs pH regulation and causes retinal photoreceptor degeneration.** *Hum Mol Genet* **14**:255-265.
688. Yang, Z., Peachey, N. S., Moshfeghi, D. M., Thirumalaichary, S., Chorich, L., Shugart, Y. Y., Fan, K. y Zhang, K. (2002): **Mutations in the RPGR gene cause X-linked cone dystrophy.** *Hum Mol Genet* **11**:605-611.
689. Yang-Feng, T. L. y Swaroop, A. (1992): **Neural retina-specific leucine zipper gene NRL (D14S46E) maps to human chromosome 14q11.1-q11.2.** *Genomics* **14**:491-492.
690. Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Meida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A. G., Olweus, J., Kearney, J. y Buck, D. W. (1997): **AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells.** *Blood* **90**:5002-5012.
691. Yokokura, S., Wada, Y., Nakai, S., Sato, H., Yao, R., Yamanaka, H., Ito, S., Sagara, Y., Takahashi, M., Nakamura, Y., Tamai, M. y Noda, T. (2005): **Targeted disruption of FSCN2 gene induces retinopathy in mice.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**:2905-2915.
692. Yokoyama, A., Maruiwa, F., Hayakawa, M., Kanai, A., Vervoort, R., Wright, A. F., Yamada, K., Niikawa, N. y Naoi, N. (2001): **Three novel mutations of the RPGR gene exon ORF15 in three Japanese families with X-linked retinitis pigmentosa.** *Am J Med Genet* **104**:232-238.
693. Yokoyama, S. (2000): **Molecular evolution of vertebrate visual pigments.** *Prog Retin Eye Res* **19**:385-419.
694. Yokoyama, S. (2002): **Molecular evolution of color vision in vertebrates.** *Gene* **300**:69-78.
695. Yokoyama, S. y Takenaka, N. (2005): **Statistical and molecular analyses of evolutionary significance of red-green color vision and color blindness in vertebrates.** *Mol Biol Evol* **22**:968-975.
696. Yokoyama, S. y Yokoyama, R. (1989): **Molecular evolution of human visual pigment genes.** *Mol Biol Evol* **6**:186-197.
697. Yokoyama, S. y Yokoyama, R. (1996): **Adaptative evolution of photoreceptors and visual pigments in vertebrates.** *Annu Rev Ecol Syst* **27**:543-567.
698. Yoon, J. H., Qiu, J., Cai, S., Chen, Y., Cheetham, M. E., Shen, B. y Pfeifer, G. P. (2006): **The retinitis pigmentosa-mutated RP2 protein exhibits exonuclease activity and translocates to the nucleus in response to DNA damage.** *Exp Cell Res* **312**:1323-1334.
699. Young, R. W. (1967): **The renewal of photoreceptor cell outer segments.** *J Cell Biol* **33**:61-72.
700. Young, R. W. y Bok, D. (1969): **Participation of the Retinal Pigment Epithelium in the rod outer segment renewal process.** *J Cell Biol* **42**:392-403.
701. Young, R. W. (1971): **Shedding of discs from rod outer segments in the rhesus monkey.** *J Ultrastruct Res* **34**:190-203.
702. Young, R. W. (1976): **Visual cells and the concept of renewal.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **15**:700-725.
703. Young, R. W. (1978): **The daily rhythm of shedding and degradation of rod and cone outer segment membranes in the chick retina.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **17**:105-116.

704. Yzer, S., Leroy, B. P., De, B. E., de Ravel, T. J., Zonneveld, M. N., Voeselek, K., Kellner, U., Ciriano, J. P., de Faber, J. T., Rohrschneider, K., Roepman, R., den Hollander, A. I., Cruysberg, J. R., Meire, F., Casteels, I., van Moll-Ramirez, N. G., Allikmets, R., van den Born, L. I. y Cremers, F. P. (2006): **Microarray-based mutation detection and phenotypic characterization of patients with Leber congenital amaurosis.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**:1167-1176.

Z

705. Zack, D. J. (2000): **Neurotrophic rescue of photoreceptors: are Muller cells the mediators of survival?** *Neuron* **26**:285-286.
706. Zangerl, B., Goldstein, O., Philp, A. R., Lindauer, S. J., Pearce-Kelling, S. E., Mullins, R. F., Graphodatsky, A. S., Ripoll, D., Felix, J. S., Stone, E. M., Acland, G. M. y Aguirre, G. D. (2006): **Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod-cone degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans.** *Genomics* **88**:551-563.
707. Zernant, J., Kulm, M., Dharmaraj, S., den Hollander, A. I., Perrault, I., Preising, M. N., Lorenz, B., Kaplan, J., Cremers, F. P., Maumenee, I., Koenekoop, R. K. y Allikmets, R. (2005): **Genotyping microarray (disease chip) for Leber congenital amaurosis: detection of modifier alleles.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**:3052-3059.
708. Zhang, H., Liu, X. H., Zhang, K., Chen, C. K., Frederick, J. M., Prestwich, G. D. y Baehr, W. (2004): **Photoreceptor cGMP phosphodiesterase delta subunit (PDEdelta) functions as a prenyl-binding protein.** *J Biol Chem* **279**:407-413.
709. Zhang, L., Wang, T., Wright, A. F., Suri, M., Schwartz, C. E., Stevenson, R. E. y Valle, D. (2006): **A microdeletion in Xp11.3 accounts for co-segregation of retinitis pigmentosa and mental retardation in a large kindred.** *Am J Med Genet A* **140**:349-357.
710. Zhang, Q., Zulfiqar, F., Xiao, X., Riazuddin, S. A., Ayyagari, R., Sabar, F., Caruso, R., Sieving, P. A., Riazuddin, S. y Hejtmancik, J. F. (2005): **Severe autosomal recessive retinitis pigmentosa maps to chromosome 1p13.3-p21.2 between D1S2896 and D1S457 but outside ABCA4.** *Hum Genet* **118**:356-365.
711. Zhao, C., Lu, S., Zhou, X., Zhang, X., Zhao, K. y Larsson, C. (2006): **A novel locus (RP33) for autosomal dominant retinitis pigmentosa mapping to chromosomal region 2cen-q12.1.** *Hum Genet* **119**:617-623.
712. Zhao, M. W., Jin, M. L., He, S., Spee, C., Ryan, S. J. y Hinton, D. R. (1999): **A distinct integrin-mediated phagocytic pathway for extracellular matrix remodeling by RPE cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**:2713-2723.
713. Zhong, H., Molday, L. L., Molday, R. S. y Yau, K. W. (2002): **The heteromeric cyclic nucleotide-gated channel adopts a 3A:1B stoichiometry.** *Nature* **420**:193-198.
714. Zhou, Z., Licklider, L. J., Gygi, S. P. y Reed, R. (2002a): **Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome.** *Nature* **419**:182-185.
715. Zhou, Z., Sim, J., Griffith, J. y Reed, R. (2002b): **Purification and electron microscopic visualization of functional human spliceosomes.** *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:12203-12207.
716. Zhu, X. L. y Sly, W. S. (1990): **Carbonic anhydrase IV from human lung. Purification, characterization, and comparison with membrane carbonic anhydrase from human kidney.** *J Biol Chem* **265**:8795-8801.
717. Zito, I., Downes, S. M., Patel, R. J., Cheetham, M. E., Ebenezer, N. D., Jenkins, S. A., Bhattacharya, S. S., Webster, A. R., Holder, G. E., Bird, A. C., Bamiou, D. E. y Hardcastle, A. J. (2003): **RPGR mutation associated with retinitis pigmentosa, impaired hearing, and sinorespiratory infections.** *J Med Genet* **40**:609-615.
718. Zito, I., Thiselton, D. L., Gorin, M. B., Stout, J. T., Plant, C., Bird, A. C., Bhattacharya, S. S. y Hardcastle, A. J. (1999): **Identification of novel RPGR (retinitis pigmentosa GTPase regulator) mutations in a subset of X-linked /retinitis pigmentosa families segregating with the RP3 locus.** *Hum Genet* **105**:57-62.
719. Znoiko, S. L., Crouch, R. K., Moiseyev, G. y Ma, J. X. (2002): **Identification of the RPE65 protein in mammalian cone photoreceptors.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:1604-1609.

