Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y GENÉTICA DE FAMILIAS ESPAÑOLAS AFECTADAS DE RETINOSIS PIGMENTARIA. CASOS RECESIVOS Y ESPORÁDICOS

TESIS DOCTORAL

Almudena Ávila Fernández
IIS-Fundación Jiménez Díaz – CIBERER
Madrid, 2011

La Dra. Carmen Ayuso, Jefa Asociada del Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz y Directora Científica del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz,

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada "*Caracterización Clínica y Genética de Familias Españolas Afectadas de Retinosis Pigmentaria. Casos Recesivos y Esporádicos*", que presenta Dña. Almudena Ávila Fernández para obtener el Grado de Doctor, ha sido realizada bajo mi dirección, autorizándola para su presentación al Tribunal Calificador.

Madrid, 25 de enero de 2011

Fdo. Dra. Carmen Ayuso García

Directora de la Tesis Doctoral

Fdo. Prof. Dr. José Fernández Piqueras

Tutor de la Tesis Doctoral

Área de Genética y Genómica del IIS-FJD 91 550 48 72
Fundación Jiménez Díaz – Avda. de los Reyes Católicos nº2, 28040 (Madrid)

“Lo esencial es invisible a los ojos”

Antoine de Saint-Exupery

(1900-1944)

A Jorge,

a mis padres,

a mis hermanos y sobrinos,

a vosotros os dedico esta tesis.

ÍNDICE

Resumen XIII

Clave de abreviaturas XVI

Índice de figuras XXIII

Índice de tablas XXVII

1. Introducción 1

1.1. La visión 2
1.1.1. Anatomía y fisiología de la retina 2
1.1.2. Cascada de la fototransducción 5
1.1.3. El ciclo visual 8
1.1.4. Adaptación a la oscuridad 9
1.2. Distrofias de retina 11
1.2.1. Retinosis pigmentaria 11
1.2.2. Aspectos genéticos de la retinosis pigmentaria 13
1.3. Genes analizados en este estudio 18
1.3.1. Gen *CERKL* (*Ceramide kinase-like*) 18
1.3.2. Gen *CNGA1* (*Cyclic nucleotide gated channel alpha 1*) 19
1.3.3. Gen *CNGB1* (*Cyclic nucleotide gated channel beta 1*) 20
1.3.4. Gen *CRB1* (*Crumbs homolog 1*) 21
1.3.5. Gen *EYS* (*Eyes shut drosophila homolog*) 22
1.3.6. Gen *LCA5* (*Libercilin*) 24
1.3.7. Gen *LRAT* (*Lecithin retinol acyltransferase*) 24
1.3.8. Gen *MERTK* (*Mer tyrosine kinase protooncogene*) 25
1.3.9. Gen *NR2E3* (*Nuclear receptor subfamily 2, group e, member 3*) 26
1.3.10. Gen *PCDH21* (*Protocadherin 21*) 27
1.3.11. Gen *PDE6A* (*Phosphodiesterase 6A*) 28
1.3.12. Gen *PDE6B* (*Phosphodiesterase 6B*) 28
1.3.13. Gen *PDE6C* (*Phosphodiesterase 6C*) 29
1.3.14. Gen *RDH12* (*Retinol dehidrogenase 12*) 30
1.3.15. Gen *RGR* (*G protein-coupled receptor, retinal*) 31

1.3.16. Gen *RLBP1* (*Retinaldehyde-binding protein 1*) 31
1.3.17. Gen *RP1* (*RP1 Gene*) 32
1.3.18. Gen *RPE65* (*Retinal pigment epithelium-specific protein, 65-kd*) 33
1.3.19. Gen *SAG* (*S-antigen*) 34
1.3.20. Gen *SPATA7* (*Spermatogenesis-associated protein*) 34
1.3.21. Gen *TULP1* (*Tubby-like protein 1*) 35
1.3.22. Gen *USH2A* (*Usherin*) 36
1.3.23. Gen *USH3A* (*Clarin 1*) 38
1.4. Ventajas del diagnóstico molecular. Técnica actuales 40
1.5. Posibilidades terapéuticas 42

2. Objetivos 44

2.1. Objetivo general 45
2.2. Objetivos específicos 45

3. Pacientes y métodos 46

3.1. Pacientes 47
3.1.1. Familias en estudio 47
3.1.2. Individuos control 48
3.2. Métodos 49
3.2.1. Extracción de ADN 49
3.2.2. Técnicas de análisis directo 49
3.2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa 49
3.2.2.2. Ensayo de restricción 67
3.2.2.3. Técnicas de secuenciación de ADN 67
3.2.2.4. *High Resolution Melting* (HRM) 72
3.2.3. Técnicas de análisis indirecto 73
3.2.3.1. Marcadores microsatélites (STRs) 74
3.2.3.2. Polimorfismos de base única (SNPs) 75
3.2.4. Mapeo de homocigosidad 77
3.2.5. Estudio de patogenicidad de las variantes 77
3.2.6. Análisis estadístico 78

3.2.7. Herramientas bioinformáticas 78
3.2.8. Descripción del protocolo de actuación 78

4. Resultados 81

4.1. Caracterización molecular de los pacientes 81
4.1.1. Resultados obtenidos con el *microarray* de genotipado 81
4.1.2. Distribución de los genes implicados en las familias con mutación 82
4.1.2.1. Familias con mutación en el gen *CERKL* 83
4.1.2.2. Familias con mutación en el gen *CNGA1* 85
4.1.2.3. Familias con mutación en el gen *CRB1* 85
4.1.2.4. Familias con mutación en el gen *PDE6A* 86
4.1.2.5. Familias con mutación en el gen *PDE6B* 89
4.1.2.6. Familias con mutación en el gen *RDH12* 89
4.1.2.7. Familias con mutación en el gen *RLBP1* 91
4.1.2.8. Familias con mutación en el gen *RPE65* 92
4.1.2.9. Familias con mutación en el gen *SAG* 93
4.1.2.10. Familias con mutación en el gen *USH2A* 95
4.1.3. Análisis de los resultados obtenidos en los apartados 4.1.1 y 4.1.2 101
4.1.3.1. Familias caracterizadas 101
4.1.3.2. Análisis de homocigosidad. Familias consanguíneas y no consanguíneas 106
4.1.3.3. Espectro de genes responsables en población española 106
4.1.3.4. Mutaciones frecuentes 108
4.1.4. Resultados derivados del mapeo de homocigosidad 111
4.1.4.1. Regiones de homocigosidad 111
4.1.4.2. Cribado de genes 114
4.1.5. Estudios derivados de los resultados obtenidos en el apartado 4.1.4 119
4.1.5.1. Cribado del gen LCA5 119
4.1.6. Análisis de los resultados obtenido tras el mapeo de homocigosidad 119
4.2. Correlación genotipo-fenotipo 122
4.2.1. Gen *CERKL* 122
4.2.2. Gen *CNGA1* 122
4.2.3. Gen *CNGB1* 123

4.2.4. Gen *CRB1* 123
4.2.5. Gen *EYS* 123
4.2.6. Gen *LCA5* 124
4.2.7. Gen *MERTK* 125
4.2.8. Gen *PCDH21* 125
4.2.9. Gen *PDE6A* 125
4.2.10. Gen *PDE6B* 126
4.2.11. Gen *RDH12* 126
4.2.12. Gen *RLBP1* 126
4.2.13. Gen *RP1* 127
4.2.14. Gen *RPE65* 127
4.2.15. Gen *SAG* 128
4.2.16. Gen *SPATA7* 128
4.2.17. Gen *USH2A* 128

5. Discusión 138

5.1. Uso del *microarray* de genotipado y posterior análisis mediante otras técnicas de laboratorio 140
5.1.1. Familias caracterizadas 140
5.1.2. Espectro de genes y mutaciones responsables en población españolas 143
5.1.3. Nuevas variantes identificadas mediante secuenciación automática 147
5.1.4. Familias con mutación en heterocigosis 148
5.1.5. Análisis de homocigosidad 150
5.2. Resultados derivados del uso del microarray de SNPs para mapeo de homocigosidad 151
5.2.1. Regiones de homocigosidad 151
5.2.2. Cribado de genes candidatos. Identificación de mutaciones causales 153
5.2.3. Ventajas e inconvenientes del mapeo de homocigosidad 158
5.3. Importancia de la caracterización molecular de las familias 160
5.4. Correlación genotipo-fenotipo 161
5.4.1. Nuevos hallazgos derivados de este 167

6. Conclusiones 172

7. Bibliografía 175

8. Anexos 207

8.1. Anexo I: Consentimiento informado pacientes y donantes voluntarios 208
8.2. Anexo II: Estructura de las familias estudiadas 217
8.3. Anexo III: Regiones de ligamiento 239
8.4. Anexo IV: Publicaciones derivadas de este trabajo 245

RESUMEN

La retinosis pigmentaria (RP) recibe su nombre por la presencia característica de depósitos de pigmento en la media periferia de la retina. Puede presentarse como una única manifestación, RP no sindrómica, o puede aparecer asociada a otros cuadros clínicos concretos como en el caso de los síndromes. La prevalencia de la RP no sindrómica es de 1/4000. La retinosis pigmentaria es una enfermedad hereditaria en la que se han descrito distintos tipos de herencia: autosómica dominante (adRP), autosómica recesiva (arRP), ligada al cromosoma X (xlRP), mitocondrial, digenismo, trialelismo y casos esporádicos (sRP). Este trabajo se centra en familias españolas afectadas arRP y sRP, es decir, aquellos casos que aparecen sin antecedentes familiares y resulta imposible conocer *a priori* su patrón de herencia. La arRP representa un 34% de las genealogías españolas, siendo la forma más frecuente de retinosis pigmentaria después se las formas esporádicas, que cuentan con un 40-50% de los casos de RP no sindrómicos. La RP, al igual que el resto de las distrofias de retina (DR), presenta una gran heterogeneidad genética. Hasta el presente, se han descrito 50 genes como causa de RP, 33 de los cuales se han asociado a arRP.

Debido a las dificultades para el estudio genético de la RP a nivel técnico y económico, derivados de la heterogeneidad de la enfermedad, el objetivo principal de este trabajo ha sido la utilización de un abordaje metodológico múltiple con el fin de identificar las mutaciones y genes responsables de los casos familiares y esporádicos, de familias españolas afectadas de RP juvenil y RP típica, ya que una buena caracterización molecular proporciona a las familias afectadas una serie de ventajas: dar un adecuado consejo genético a las familias, confirmar el diagnóstico clínico, proporcionar un pronostico de la enfermedad, e incluir a los pacientes en ensayos clínicos.

En primer lugar, se llevó a cabo el análisis de 272 familias españolas no emparentadas mediante un *microarray* de mutaciones específico de arRP, seguido del cribado de los genes candidatos. Con esta estrategia se caracterizó molecularmente al 11% de las familias estudiadas y se pudo concluir que: los casos esporádicos en su mayoría presentan una herencia autosómica recesiva, como lo demuestra la similitud en el porcentaje y tipo de genes mutados en ambos tipos de familias; que las familias RP juveniles y típicas son similares en cuanto al porcentaje de casos mutados detectados tras el uso del *microarray* de genotipado. Sin embargo, sus características genéticas son

muy diferentes en cuanto al tipo de genes mutados. Para el grupo de las RP juveniles, *RDH12* es el gen con mayor tasa de mutación, siendo *USH2A* seguido del gen *CERKL* para las familias españolas afectadas de RP típica. Mientras que para el grupo de las familias afectadas de RP juvenil no se ha identificado una mutación frecuente, para las familias afectadas de RP típica, la mutación más frecuente es p.Arg257ter en el gen *CERKL*, seguida de la mutación p.Cys759Phe en el gen *USH2A*. Todos los pacientes afectados de RP típica que tienen la mutación p.Arg257ter en el gen *CERKL* en homocigosis, han heredado la región afectada de un mismo ancestro común y presentan un fenotipo característico.

El bajo número de familias caracterizadas, a diferencia de los datos descritos para otros tipos de DR con la misma técnica en población española, se debe a la mayor heterogeneidad genética de la arRP, así como a la no inclusión de varios genes candidatos en el *microarray* de genotipado, y pone de manifiesto la necesidad del uso de otras herramientas con el fin de poder llegar a una completa caracterización molecular de las familias españolas afectadas de arRP.

En segundo lugar, se realizó un estudio de mapeo de homocigosidad en 18 familias consanguíneas, en las que no se encontraron las mutaciones causales tras el análisis previo, mediante la utilización de un *microarray* de SNPs repartidos a lo largo de todo el genoma con el fin de identificar nuevas mutaciones asociadas a RP en nuestra población. Esto nos llevó a la identificación de nuevas variantes en genes asociados a la patología, permitiendo el diagnóstico genético del 55% de las familias estudiadas. Por lo que se confirma que el mapeo de homocigosidad es un abordaje eficaz para la caracterización molecular de familias españolas consanguíneas afectadas de arRP.

Por último, se analizaron los datos oftalmológicos de las familias caracterizadas con el fin de establecer una correlación genotipo-fenotipo que nos permita proporcionar al paciente un pronóstico más exacto de la enfermedad. Para determinados genes y mutaciones, posible establecer una correlación genotipo-fenotipo. Por el contrario, para otros genes, existe una mayor variabilidad clínica. La caracterización molecular de familias españolas diagnosticadas *a priori* de arRP ha permitido modificar el diagnóstico clínico de algunas de las familias estudiadas.

Por todo lo anterior, el algoritmo propuesto para la caracterización de los casos familiares y esporádicos en población española afectada de RP juvenil y típica, consiste en la aplicación conjunta de un *microarray* de genotipado específico para arRP y cribado de los genes candidatos como primer abordaje al diagnóstico, seguido de otras estrategias, como puede ser el mapeo de homocigosidad.

CLAVE DE ABREVIATURAS

A

ABCR	*Atp-Binding Cassette transporter, Retina-specific*
ADRP	Retinosis Pigmentaria autosómica dominante (del inglés, *Autosomic Dominant Retinitis Pigmentosa*)
ADN	Ácido desoxirribonucleótido
AHI1	*Abelson helper integration site 1*
APEX	*Arrayed Primer Extension*
ARRP	Retinosis Pigmentaria autosómica recesiva (del inglés, *Autosomic Recessive Retinitis Pigmentosa*)
ATL	Audiometría Tonal Liminar
AV	Agudeza Visual

B

BBS2	*Bardet-Biedl syndrome 2*

C

C	Citosina
C2ORF71	*Chromosome 2 open reading frame 71*
CERK	*Ceramide kinase*
CERKL	*Ceramide kinase-like*
CLRN1	*Clarin 1*
CN	Ceguera nocturna
CNGA1	*Cyclic nucleotide gated channel alpha 1*
CNGB1	*Cyclic nucleotide gated channel beta 1*
CRB1	*Crumbs homolog 1*
CRBP	*Cellular Retinol-Binding Protein*
CRX	*Cone-rod homeobox*

CV	Campo Visual

D

DCB	Distrofia de conos y bastones
DDNTPs	Dideoxinucleótidos trifosfato
DNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DR	Distrofia hereditaria de retina

E

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	*Epidermal grow factor*
EPR	Epitelio Pigmentario de la Retina
ERG	Electrorretinograma
EYS	*Eyes shut homolog*
Eys	*Eyes shut*

F

FAM161	*Family with sequence similarity 161, member A*
FNIII	Fibronectina III

G

5'-GMPc	5'- Guanosín monofosfato cíclico
G	Guanina
GAF	Dominios conservados de unión a GMPc
GC	Guanilato ciclasa
GCAPs	Proteínas activadoras de la guanilato ciclasa

GDP	Guanosín difosfato
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GTP	Guanosín trifosfato

H

HRM	*High Resolution Melting*

I

IMPG2	*Interphotoreceptor matrix proteoglycan 2*
IRBP	*Intersticial Retinol Binding Pprotein*

L

LCA	Amaurosis congénita de Leber
LCA5	*Libercilin*
LOH	Pérdida heterocigosidad (del inglés, *Loss of Heterozygosiy*)
LRAT	*Lecithin Retinol Acyltransferase*

M

MERTK	*C-mer proto-oncogene tyrosine kinase*

N

NPHP1	*Nephronophthisis 1*
NR2E3	*Nuclear receptor subfamily 2, group E, member 3*
Nr2e3	*Nuclear receptor subfamily 2, group E, member 3*

O

ORL	Otorrinolaringólogo

P

PCDH21	*Protocadherin 21*
Pcdh21	*Protocadherin 21*
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *Polymerase Chain Reaction)*
PDE	Fosfodiesterasa
PDE6A	*Phosphodiesterase 6A, cGMP-specific, rod, alpha*
PDE6B	*Phosphodiesterase 6B, cGMP-specific, rod, beta*
PDE6C	*Phosphodiesterase 6C, cGMP-specific, cone, alpha prime*
PDE6G	*Phosphodiesterase 6G, cGMP-specific, rod, gamma*
PNR	*Photoreceptor-specific nuclear receptor*
PRCD	*Progressive rod-cone degeneration*
PROM1	*Prominin 1*

R

RDCVF	Factor de Neuroprotección
RDH11	*Retinol dehydrogenase 11*
Rdh12	*Retinol dehydrogenase 12*
RDH12	*All-trans-retinol dehidrogenase*
REC	Recoverina
RGAS9-Gβ5	*Regulators of G Protein Signaling family with the long splice variant of type 5 g protein β subunit*
RGR	*G protein –coupled receptor, retinal*
RHO	Rodopsina

RLBP1	*Retinalaldehyde-Binding Protein*
RP	Retinosis Pigmentaria
RP1	*Retinitis pigmentosa 1*
RPA	*Retinosis Puntata Albescens*
RPE65	*Retinal Pigment Epithelium-specific protein 65kDa*
RPGR	*Retinitis pigmentosa GTPase regulator*
RPGRIPL1	*RPGRIP1-like*

S

SAG	*S-antigen*
SNPs	Polimorfismo de base única (del ingles, *Single Nucleotide Polimorphisms*)
SPAM	*Spacemarker*
SPATA7	*Spermatogenesis associated 7*
SRP	Retinosis Pigmentaria esporádica (del ingles*, Sporadic Retinitis pigmentosa*)
STRs	Marcadores microsatélites (del ingles, *Short Tandem Repeats*)

T

TTC8	*Tetratricopeptide repeat domain 8*
TULP1	*Tubby like protein 1*

U

USH	Síndrome de Usher
USH2A	*Usher syndrome 2A*
USH3A	*Clarin 1*

V

VLGR1	*G protein-coupled receptor 98*

X

XLRP	Retinosis pigmentaria ligada al cromosoma X (del inglés, *X-linked Retinitis Pigmentosa*)

Z

ZNF513	*Zinc finger protein 513*

ÍNDICE DE FIGURAS

1. **Introducción**

Figura 1.1. A. Estructura del globo ocular. B. Sección transversal de la retina.
Figura 1.2. Representación de la estructura de los fotorreceptores.
Figura 1.3. Esquema del proceso de activación de la rodopsina.
Figura 1.4. Representación simplificada de la cascada de la fototransducción.
Figura 1.5. Representación simplificada del ciclo visual.
Figura 1.6. Foto de un fondo de ojo.
Figura 1.7. Representación de la heterogeneidad genética de las DR.
Figura 1.8. Localización subcelular de la isoforma *CERKLa*.
Figura 1.9. Representación simplificada de los canales catiónicos dependientes de GMPc.
Figura 1.10. Representación esquemática de la estructura de la proteína codificada por el gen *EYS* en humanos y por eys en *drosophila*.
Figura 1.11. Representación esquemática de la estructura de los dominios de la proteína codificada por el gen *MERTK*.
Figura 1.12. Representación esquemática de la red de interacciones proteicas en el cilio de las células fotorreceptoras.
Figura 1.13. Representación esquemática de la red de interacciones proteicas en el cilio de las células fotorreceptoras y su relación con el transporte vesicular.

3. **Pacientes y métodos**

Figura 3.1. Esquema de funcionamiento del microarray de genotipado.
Figura 3.2. Esquema de funcionamiento del microarray de SNPs.
Figura 3.3. Imagen obtenida de la aplicación de la técnica HRM.
Figura 3.4. Parámetros específicos de ejecución del programa *GeneHunter* utilizados para llevar a cabo el análisis de ligamiento.
Figura 3.5. Protocolo de actuación a seguir en este trabajo.

Figura 4.1. Segregación de la mutación c.769C>T p.Arg257ter en el gen *CERKL*.

Figura 4.2. A. Estudio de cosegregación de los genes *CNGA1*, *CRB1* y *PDE6A* para las familias RP-1147, RP-0561, RP-341 y RP-0235. B. Segregación de las mutaciones detectadas en las familias RP-0159, RP-0531 y RP-1080.

Figura 4.3. Alineación múltiple de la proteína *RDH12* en diferentes especies.

Figura 4.4. Alineación múltiple de la proteína *RPE65* en diferentes especies.

Figura 4.3. Segregación de las mutaciones detectadas en las familias RP-0054, RP-0379, RP-1339, RP-0979 y RP-1115.

Figura 4.6. Estudio de cosegregación del gen *SAG* para la familia RP-1292.

Figura 4.7. Alineación múltiple de la proteína *USH2A* en diferentes especies.

Figura 4.8. Estudio de cosegregación del gen *USH2A* y segregación de las mutaciones para las familias RP-0467, RP1016, RP-1053 y RP-1071.

Figura 4.9. Estudio de cosegregación del gen *USH2A* y segregación de las mutaciones para las familias RP-0721, RP-0653, RP-1059 y RP-0260.

Figura 4.10. Segregación de las mutaciones detectadas en el gen *USH2A* en las familias RP-0332, RP-0930 y RP-0849.

Figura 4.11. Porcentaje de familias caracterizadas tras el estudio. A. sRP *vs* arRP. B. RP juvenil *vs* RP típica.

Figura 4.12. Representación de la distribución de los genes implicados para los grupos sRP *vs* arRP.

Figura 4.13. Representación de la distribución de los genes implicados para los grupos RP típica *vs* RP juvenil.

Figura 4.14. Mapa de España. Distribución geográfica de las familias que presentan la mutación p.Arg257ter en el gen *CERKL*.

Figura 4.15. Mapa de España. Origen geográfico de los abuelos del *probandus* que presentan la mutación p.Cys759Phe en el gen *USH2A*.

Figura 4.16. Alineación múltiple de la proteína *RPE65* en diferentes especies.

Figura 4.17. Alineación múltiple de la proteína *CNGB1* en diferentes especies.

Figura 4.18. Segregación de las mutaciones detectadas en las familias RP-0573, RP-0509, RP-0503, RP-0055 y RP-0034.

Figura 4.19. Segregación de las mutaciones detectadas en las familias RP-0285, RP-1190, RP-1374, RP-1296 y RP-1411.

Figura 4.20. Fondo de ojo que presentan los pacientes que con la mutación p.Arg257ter en el gen *CERKL* en homocigosis.

Figura 4.21. Fondo de ojo del caso índice de la familia RP-0285.

Figura 4.22. Fondo de ojo del hermano afecto de la familia RP-0285.

Figura 4.23. Fondo de ojo del caso índice de la familia RP-0979.

ÍNDICE DE TABLAS

1. Introducción

Tabla 1.1. Aspectos clínicos de retinosis pigmentaria.
Tabla 1.2. Genes asociados a arRP.

3. Pacientes y métodos

Tabla 3.1. Clasificación de las familias estudiadas.
Tabla 3.2. Condiciones de la PCR.
Tabla 3.3. Cebadores exón 5 del gen *CERKL*.
Tabla 3.4. Cebadores del gen *CLRN1*.
Tabla 3.5. Cebadores del gen *CNGA1*.
Tabla 3.6. Cebadores del gen *CNGB1*.
Tabla 3.7. Cebadores del gen *CRB1*.
Tabla 3.8. Cebadores del gen *EYS*.
Tabla 3.9. Cebadores del gen *LCA5*.
Tabla 3.10. Cebadores del gen *LRAT*.
Tabla 3.11. Cebadores del gen *MERTK*.
Tabla 3.12. Cebadores del gen *PCDH21*.
Tabla 3.13. Cebadores del gen *PDE6A*.
Tabla 3.14. Cebadores exón 4 del gen *PDE6B*.
Tabla 3.15. Cebadores exón 4 del gen *PDE6C*.
Tabla 3.16. Cebadores del gen *RDH12*.
Tabla 3.17. Cebadores del gen *RGR*.
Tabla 3.18. Cebadores del gen *RP1*.
Tabla 3.19. Cebadores del gen *RPE65*.
Tabla 3.20. Cebadores del gen *SAG*.
Tabla 3.21. Cebadores del gen *USH2A*.
Tabla 3.22. Condiciones del ensayo de restricción.
Tabla 3.23. Enzima de restricción utilizada para cada ensayo.
Tabla 3.24. Condiciones de la reacción de secuenciación.
Tabla 3.25. Marcadores analizados mediante SNaPshot.
Tabla 3.26. Genes incluidos en el microarray de arRP.

Tabla 3.27. Microsatélites *CNGA1*.
Tabla 3.28. Microsatélites *CRB1*.
Tabla 3.29. Microsatélites *PDE6A.*
Tabla 3.30. Microsatélites *SAG*.
Tabla 3.31. Microsatélites *USH2A.*
Tabla 3.32. Condiciones de la PCR de microsatélites.

4. Resultados

Tabla 4.1. Resultados obtenidos tras el análisis con el microarray de genotipado según clasificación genética. A. Porcentaje de familias con al menos una mutación. B. Porcentaje de alelos mutados.
Tabla 4.2. Resultados obtenidos tras el análisis con el microarray de genotipado según clasificación clínica. A. Porcentaje de familias con al menos una mutación. B. Porcentaje de alelos mutados.
Tabla 4.3. Número de familias con uno o dos alelos mutados mediante el microarray de genotipado.
Tabla 4.4. Familias con mutaciones en el gen *CNGA1*.
Tabla 4.5. Familias con mutaciones en el gen *CRB1*.
Tabla 4.6. Familias con mutaciones en el gen *PDE6A.*
Tabla 4.7. Familias con mutaciones en el gen *RDH12*.
Tabla 4.8. Familias con mutaciones en el gen *SAG*.
Tabla 4.9. Familias con mutaciones en el gen *USH2A.*
Tabla 4.10. Mutaciones identificadas tras el análisis molecular en pacientes afectados de RP Juvenil.
Tabla 4.11. Mutaciones identificadas tras el análisis molecular en pacientes afectados de RP Típica.
Tabla 4.12. Haplotipo asociado a la mutación p.Arg257ter en el gen *CERKL* en las distintas familias.
Tabla 4.13. Resultados obtenidos tras el mapeo de homocigosidad.
Tabla 4.14. Nuevas variantes detectadas tras el cribado de genes de las regiones de homocigosidad mediante secuenciación automática.
Tabla 4.15. Datos oftalmológicos de las familias caracterizadas molecularmente.

INTRODUCCIÓN

1.1. LA VISIÓN

1.1.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA RETINA

La visión o el sentido de la vista es aquel que nos permite conocer el mundo que nos rodea y relacionarnos. El órgano encargado es el ojo o globo ocular (Figura 1.1). Anatómicamente, está formado por tres túnicas o capas concéntricas y por un sistema de medios transparentes y refringentes que se alojan en su interior. Las tres capas son, de la externa a la más interna: túnica fibrosa o esclerótica, túnica vascular o coroides y túnica nerviosa o retina. Los medios refringentes constituyen el sistema dióptrico del ojo, y están formados por el cristalino, el humor acuoso, el humor vítreo y la córnea.

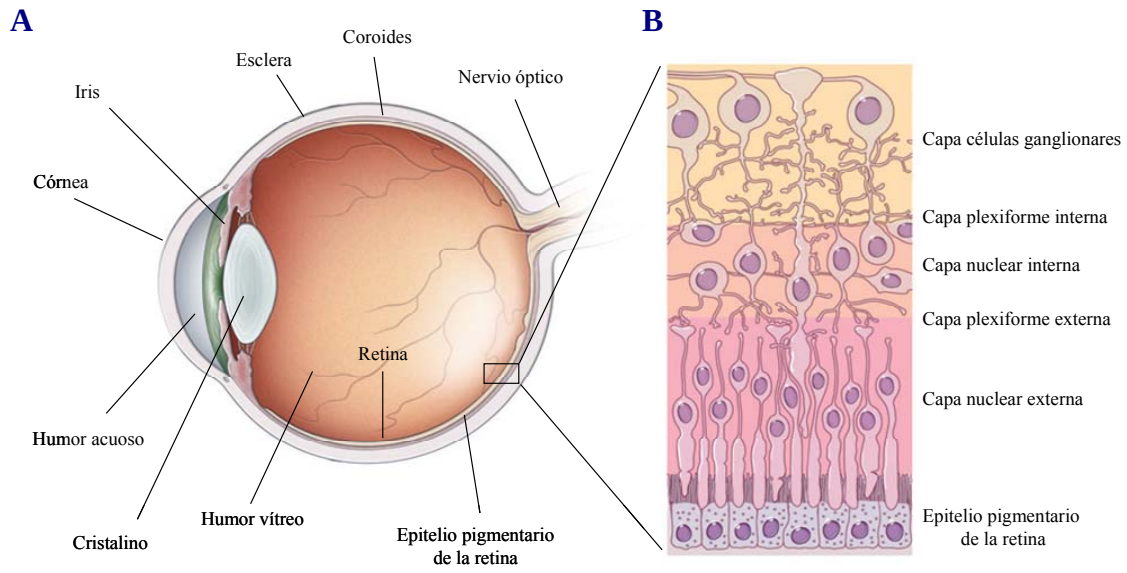


Figura 1.1. **A.** Estructura del globo ocular donde se observan las tres capas concéntricas: esclera, coroides y retina y los medios refringentes: cristalino, humor acuoso, humor vítreo y córnea. **B.** Sección transversal de la retina: epitelio pigmentario de la retina, capa nuclear externa, capa plexiforme externa, capa nuclear interna, capa plexiforme interna y capa de células ganglionares. Modificada de Jacobson *et al*., 2010.

Aunque todas las partes del ojo son fundamentales para percibir la información visual, la retina es el eje principal de todo el sistema.

La retina es esencialmente una parte del sistema nervioso central, sus células son neuronas especializadas. Se desarrolla a partir de una invaginación del cerebro anterior denominada copa óptica. La capa externa de la copa óptica da lugar al epitelio

pigmentario de la retina (EPR), monocapa celular adherida a la membrana de Brusch que la separa de la coroides, mientras que la capa interna y más gruesa da lugar a la retina. El correcto desarrollo de las células de la retina y su conectividad son esenciales para la función de la misma. Este desarrollo está regulado de forma espacio temporal por la expresión de genes específicos en la célula adecuada y en el momento justo, debido a la acción de un número limitado de factores de transcripción.

La retina se diferencia anatómicamente básicamente en dos regiones: la retina anterior o ciega, que reviste la cara posterior del cuerpo ciliar y el iris, y la retina posterior o sensitiva que es la encargada de la percepción visual. En la retina posterior se observan la papila del nervio óptico y la mácula. La papila del nervio óptico corresponde al punto ciego de la retina, ya que carece de fotorreceptores, y es por donde los axones de las células ganglionares abandonan la retina para formar el nervio óptico. La mácula, de unos 5mm de diámetro, situada en su eje óptico, es la encargada de la visión de mayor nitidez y definición. Está dividida en dos zonas: la fóvea y la foveola. La mácula presenta unas características histológicas que la diferencian del resto de la retina.

La retina es un tejido muy complejo. Fue Santiago Ramón y Cajal quién en al año 1892 utilizando el método de Golgi describió en detalle los componentes celulares de la retina (Figura 1.1). La retina está compuesta por tres capas que contienen cuerpos celulares y dos capas donde se producen las interacciones sinápticas. En la capa nuclear externa es donde se encuentran los cuerpos celulares de los fotorreceptores. La capa nuclear interna contiene los cuerpos celulares de las células horizontales, bipolares y amacrinas y la capa de células ganglionares contiene los cuerpos celulares de estas células, además de algunos cuerpos de células amacrinas desplazadas. Entre estas tres capas se localizan las capas plexiformes: la plexiforme externa donde contactan los fotorreceptores con las dendritas de las células bipolares y horizontales, y la plexiforme interna donde contactan los axones de las células bipolares con las dendritas de las células ganglionares. Por último, los axones de las células ganglionares se dirigen hacia la papila del nervio óptico formando la capa de fibras del nervio óptico.

Los fotorreceptores, los conos y los bastones, son las células nerviosas más abundantes de la retina cuya función específica es la fototransducción. Los bastones son

aquellas células que responden a estímulos débiles de luz y se encargan de la visión escotópica; su pigmento más abundante es la rodopsina. El bastón es el fotorreceptor más abundante en la retina periférica. Los conos son los responsables de la visión en color y de la agudeza visual; su pigmento son las fotopsinas, y dependiendo del pigmento que portan se pueden dividir en rojos, verdes y azules. La región que contiene mayor cantidad de conos es la fóvea, donde se encuentran los conos verdes y rojos.

Los fotorreceptores tienen una morfología común. Su estructura (Figura 1.2) está formada por:

- El segmento externo, es una prolongación celular que adopta la forma de cono o bastón; es el polo sensorial de la célula y se encuentra en íntimo contacto con el EPR. Está formado por microvesículas que dan lugar a discos apilados rodeados de membrana plasmática.
- Cilio conector, estructura que conecta el segmento externo con el segmento interno, y a través del cual viajan una gran cantidad de moléculas necesarias para la constante renovación de los discos, y por lo tanto para el correcto funcionamiento de la retina.
- El segmento interno, es el encargado del metabolismo celular que da lugar a la síntesis de macromoléculas y aporta la energía necesaria para la fototransducción. En la región próxima al cilio conector se encuentran las mitocondrias apiladas. En este segmento también se localizan el resto de orgánulos y gran cantidad de glucógeno. La zona más interna la componen el núcleo y el cuerpo sináptico, a través del cual se establece la sinapsis con la célula bipolar.

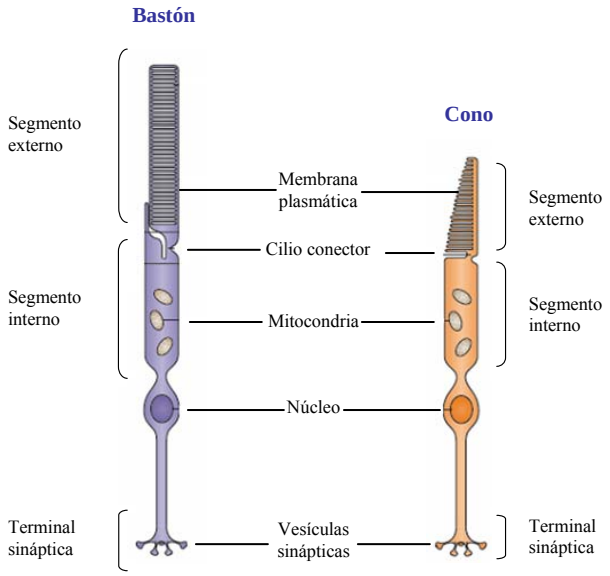


Figura 1.2. Representación de la estructura de los fotorreceptores. Conos y bastones. Modificada de Wright *et al*., 2010.

1.1.2. CASCADA DE LA FOTOTRANSDUCCIÓN

La fototransducción (Figura 1.4) es el proceso a partir del cual los fotones de luz son transformados en señal eléctrica. El proceso comienza cuando el pigmento fotosensible del fotorreceptor absorbe el fotón de luz. En el caso de los bastones, el fotopigmento es la rodopsina (RHO). La rodopsina pertenece al grupo de receptores de membrana asociados a proteína G, y está constituida por una apoproteína denominada opsina y un cromóforo llamado 11 *cis*-retinal; se encuentra integrada en la membrana de los discos contenidos en los segmentos externos de los bastones. Los electrones de la fracción retinal de la rodopsina se fotoactivan y se produce la isomerización de la forma *cis* a la forma todo-*trans* retinal. Tal y como se muestra en la figura 1.3, la opsina sufre cambios conformacionales donde el producto inmediato es la batorrodopsina, sumamente inestable que se descompone a luminirrodopsina. Ésta, a su vez, se descompone a metarrodopsina II. La metarrodopsina II unida covalentemente al todo-*trans* retinal sufre cambios conformacionales afectando a los sitios de unión de la proteína G. De esta forma se produce la activación de la *transducina* [Nathans., 1992; Hessel *et al*., 2001; Hamm., 2001].

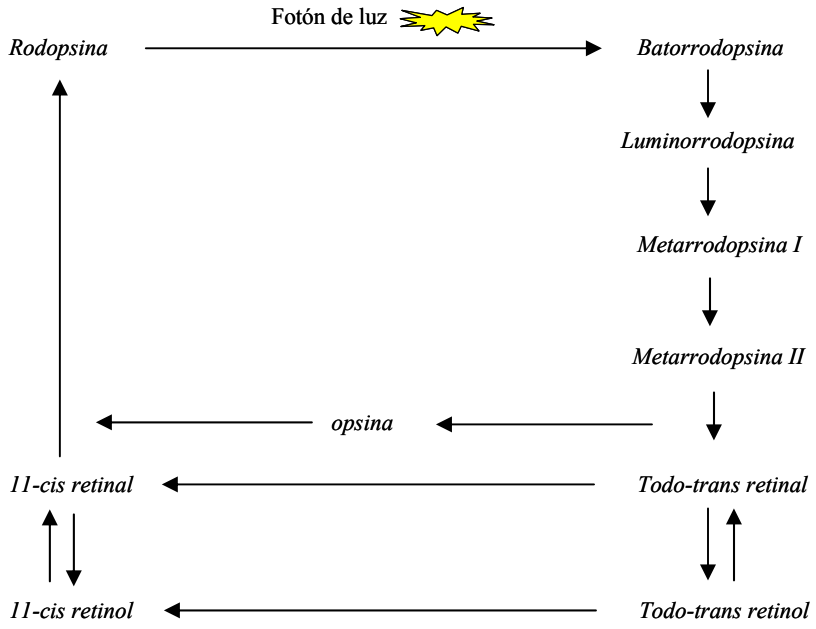


Figura 1.3. Esquema del proceso de activación de la rodopsina.

La transducina es una proteína G reguladora y fijadora de guanosín trifosfato (GTP) cuya función es la de transmitir las señales externas que llegan a la célula a nivel de membrana activando los sistemas efectores. La transducina, al igual que el resto de las proteínas G, es un heterotrímero formado por una subunidad α, una β y una γ. La activación de la transducina, provocada por su interacción con la rodopsina catalíticamente activada, comienza con el intercambio de guanosín difosfato (GDP) a GTP, seguida de la liberación de la subunidad α (Tα-GTP) y el dímero de las subunidades βγ (Tβγ). La subunidad α (Tα-GTP) queda libre para activar otras proteínas como la fosfodiesterasa.

La fosfodiesterasa que se encuentra en el fotorreceptor se denomina PDE6. La enzima está formada por las subunidades α y β, cada una de las cuales se unen a la subunidad inhibidora γ. Cuando las subunidades α de la transducina activa interaccionan con las subunidades γ inhibidoras de la PDE, se produce un cambio conformacional que activa el complejo catalítico de la fosfodiesterasa. Estas formas activas de la PDE6 se encargan de hidrolizar el guanosín monofosfato cíclico (GMPc) a 5´-guanosín

monofosfato (5´-GMP) [Beavo., 1995]. Esta interacción desencadena el cierre de los canales catiónicos dependientes de GMPc de la membrana plasmática del fotorreceptor.

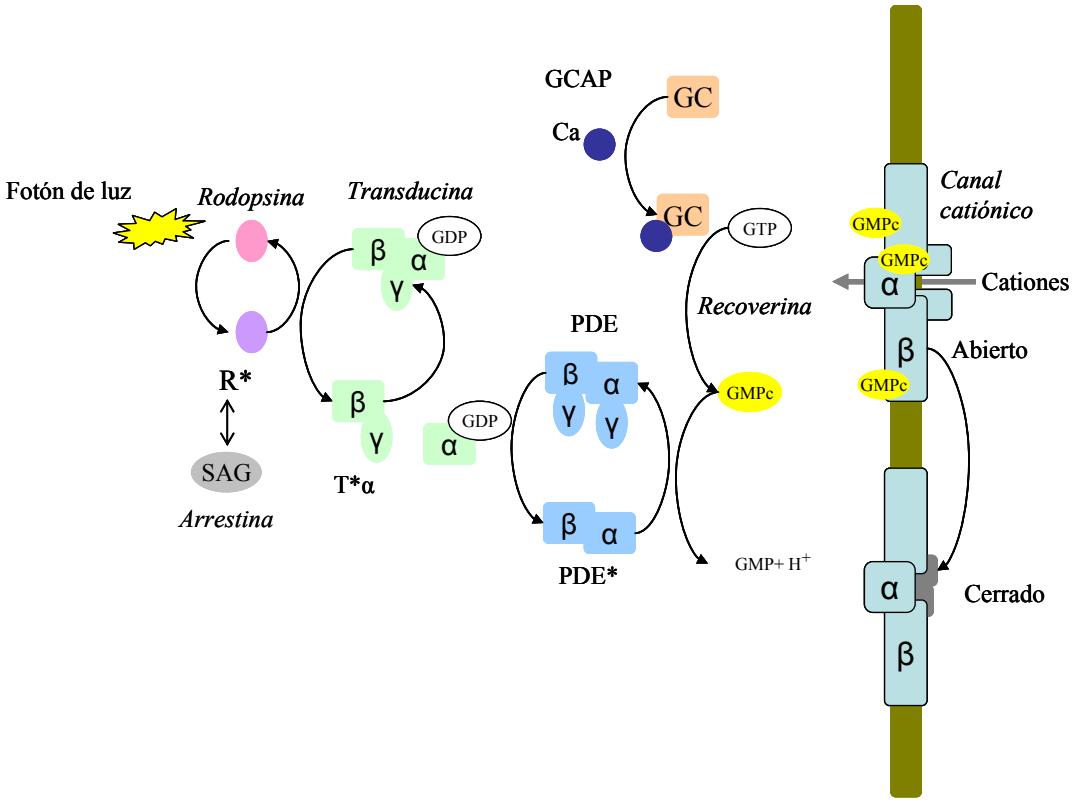


Figura 1.4. Representación simplificada de la cascada de la fototransducción. R* *rodopsina activada*, T*α *transducina activada*, GDP *guanosín difosfato*, PDE *fosfodiesterasa*, PDE* *fosfodiesterasa activada*, GCAP *enzima activadora de la guanilato ciclasa*, GC *guanilato ciclasa*, GTP *guanosín trifosfato*, GMPc *guanosín monofosfato cíclico*, GMP *guanosín monofosfato*, H^+ molécula de *hidrógeno*.

El canal catiónico dependiente de GMPc está formado por dos subunidades homólogas α y β. La subunidad α posee un extremo N-terminal citoplasmático, seis segmentos transmembrana, un poro iónico y un dominio próximo al extremo C-terminal el cual se fija a GMPc. La subunidad β presenta dos sitios de unión a la calmodulina en los extremos citoplasmáticos C y N-terminal implicados en la respuesta en la adaptación a la luz [Grunwald *et al*., 1998; Weitz *et al*., 1998].

El cierre de los canales dependientes de GMPc hace disminuya la conductancia al Na^+ lo que produce una negativización del espacio intracelular del bastón. Así se inicia

la hiperpolarización de los fotorreceptores y la transducción de la señal. Este cierre provoca además una disminución de la concentración de Ca^{2+} intracelular que es esencial para la adaptación a la luz y para la recuperación tras una estimulación luminosa [Yau., 1994].

Para impedir que la transducina siga activándose, las moléculas de rodopsina se inactivan. Este proceso de inactivación de la rodopsina se lleva a cabo por la acción de la enzima rodopsina quinasa, enzima implicada en la desestabilización de receptores acoplados a proteína G [Palczewski *et al*., 2000]. La fosforilación de la rodopsina incrementa en gran mediada su afinidad por la arrestina o S-antigen, que por lo tanto compite con la transducina. La arrestina forma parte de un grupo de proteínas cuya función consiste en mediar la inactivación de receptores acoplados a proteína G. Mientras que la fosforilación es obligatoria para una recuperación completa, la unión a la arrestina acelera la fase de recuperación.

Este proceso se encuentra regulado por una proteína denominada recoverina que suprime la actividad de la rodopsina quinasa en presencia de Ca^{2+}, ya que en concentraciones elevadas de Ca^{2+}, la rodopsina quinasa soluble se asocia con la recoverina que está anclada en la membrana y pierde su actividad. De modo que la recoverina prolonga el tiempo de vida de la rodopsina activa al impedir su fosforilación.

1.1.3. EL CICLO VISUAL

El ciclo visual es el proceso (Figura 1.5) por el cual se produce la regeneración del cromóforo retinal Tras la inactivación de la rodopsina, el todo-*trans* retinal se libera y es transportado a través de la membrana del disco, desde la cara luminar a la citoplasmática, por la proteína ABCR (*Atp-Binding Cassette transporter, Retina-specific*). A continuación, el todo-*trans* retinal se reduce a todo-*trans* retinol por la acción de la enzima RDH12 (*all-trans-retinol dehidrogenase 12*) y es transportado al EPR por una proteína denominada IRBP (*Intersticial Retinol BindingPprotein*). Ya en el EPR, primero es esterificado. En el proceso de esterificación intervienen la enzima LRAT (*Lecithin Retinol acyltransferase*) y la proteína CRBP (*Cellular Retinol-Binding Protein*), que favorece la interacción entre el todo trans-retinal y la enzima LRAT. La forma esterificada se transforma en 11-*cis* retinol por la acción de la proteína RPE65

(*Retinal Pigment Epithelium-specific protein* 65kDa). Por último, es oxidado a 11-*cis* retinal por la proteína RLBP1 (*Retinalaldehyde-Binding Protein*) antes de volver al segmento externo de los bastones, donde se une a una opsina para dar lugar a una nueva rodopsina funcional.

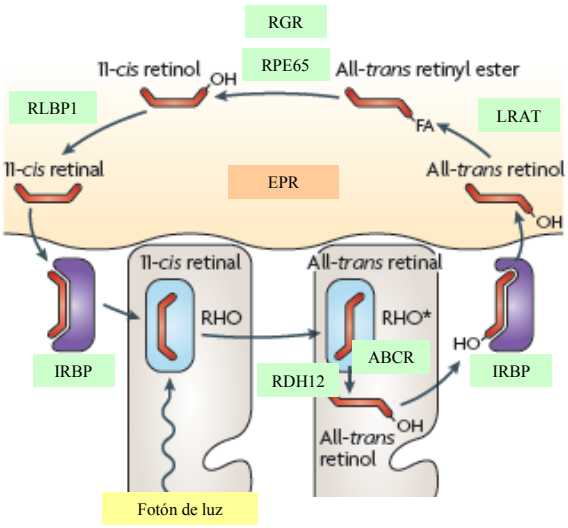


Figura 1.5. Representación simplificada del ciclo visual. RDH12 enzima *All-trans Retinol Dehidrogenase*, ABCR proteína transportadora *Atp-Binding Cassette transporter, Retina-specific,* IRBP *proteína Intersticial Retinol Binding Protein,* LRAT enzima *Lecithin Retinol acyltransferas,* RPE65 proteína *Retinal Pigment Epithelium-specific, RGR* proteína *G protein-coupled receptor, retinal,* RLBP1 proteína *Retinalaldehyde-Binding*. EPR epitelio pigmentario de la retina. Modificada de Wright *et al*., 2010.

1.1.4. ADAPTACIÓN A LA OSCURIDAD

La adaptación a la oscuridad es la capacidad del sistema visual de obtener visión cuando se produce un cambio brusco de un lugar iluminado a un lugar donde la intensidad de luz es pequeña. Existen dos tipos de mecanismos moleculares identificados como responsables de la adaptación luz/oscuridad: los mecanismos dependientes de Ca^{2+} y los mecanismos de adaptación independientes de Ca^{2+} [Pugh *et al*., 1999].

Mecanismos de adaptación dependientes de Ca^{2+}

- Como se ha descrito en el apartado 1.1.2, la absorción del fotón de luz desencadena una serie de pasos cuyo efecto final es una hiperpolarización del fotorreceptor y la disminución de la concentración intracelular de Ca^{2+}. La disminución de los niveles de Ca^{2+} produce la activación de la enzima Guanilato Ciclasa (GC). La activación de esta enzima está mediada por las proteínas activadoras de la GC (GCAPs). Cuando la concentración de Ca^{2+} disminuye, las

proteínas GCAPs pierden dos iones Ca^{2+}, y se unen al dominio citoplasmático de la GC y favorecen el intercambio de GTP a GMPc, lo que reestablece los niveles de GMPc intracelular en el segmento externo del fotorreceptores, y favoreciendo los canales GMPc dependientes.

- La calmodulina se une a los canales GMPc dependientes. La disminución de la concentración de Ca^{2+} intracelular hace que la calmodulina se separe del canal favoreciendo así su apertura ante concentraciones bajas de GMPc.

- En oscuridad, la recoverina (rec) con dos iones Ca^{2+} se une a la enzima rodopsina quinasa, impidiendo que ésta fosforile a la rodopsina. Cuando la concentración de Ca^{2+} intracelular disminuye, la recoverina libera a la rodopsina quinasa, la cual fosforila la rodopsina. Posteriormente, la arrestina se une a esta rodopsina fosforilada quedando inactivada.

Mecanismos de adaptación independientes de Ca^{2+}

- La terminación de la fotorrespuesta requiere la inactivación de la PDE, lo cual ocurre cuando la molécula de GTP unida a la subunidad α de la transducina es hidrolizada a GDP gracias a la actividad GPTasa intrínseca de la transducina. Este mecanismo está basado en la acción conjunta de dos proteínas, complejo RGAS9-Gβ5 (*Regulators of G protein Signaling family with the long splice variant of type 5G protein β subunit*) y la subunidad γ de la PDE. RGAS9 se encarga de estimular la actividad GTPasa intrínseca de la transducina [Makino *et al*., 1999].

La complejidad de los fotorreceptores, sus regiones altamente especializadas, el gran número de proteínas que intervienen en su correcto funcionamiento y su alto consumo de energía predisponen a estas células a padecer patologías, provocadas por causas ambientales o por mutaciones genéticas, que desembocan en disfunciones visuales o en ceguera.

1.2. DISTROFIAS DE RETINA

Las distrofias hereditarias de la retina (DR) son un conjunto de enfermedades degenerativas y generalmente progresivas, causadas por la afectación primaria de los fotorreceptores, que ocurren aproximadamente en 1 de cada 3000 personas [Wright *et al*., 2010]. Sus tres características más sobresalientes son su carácter hereditario, la evolución progresiva y no tener, en el momento actual, un tratamiento ni paliativo ni curativo, con lo que conducen a la pérdida parcial o total de la visión [Rivolta *et al.*, 2002]. Las DR se dividen clínicamente en formas periféricas, en las en las que se afectan inicial y predominantemente los bastones de la retina, tal y como ocurre en la Retinosis Pigmentaria (RP), patología en la que se centra este trabajo, y formas centrales, con degeneración de los conos al inicio pudiendo afectarse o no los bastones de forma secundaria (distrofias de conos-bastones). Entre las distrofias de retina centrales se encuentran la enfermedad de Stargardt, las distrofias maculares y las distrofias de conos, entre otras.

1.2.1. RETINOSIS PIGMENTARIA

La Retinosis Pigmentaria es la distrofia de retina más común, constituyendo del 85 al 90% de todos los casos. Se caracteriza por una afectación primaria de los bastones y presenta una prevalencia aproximada de 1 en 4000 [Hartong *et al*., 2006], por lo que pertenece al grupo de las enfermedades raras.

La RP es una enfermedad que presenta una gran heterogeneidad clínica; tanto la edad de inico como la progresión de la enfermedad varían de forma significativa de unos pacientes a otros incluso dentro de la misma familia. Según la edad de inicio, la RP se puede clasificar en RP juvenil o RP típica. El primer síntoma que presentan los pacientes afectados de RP es ceguera nocturna, seguida de una pérdida progresiva del campo visual periférico que puede llevar a la ceguera legal después de varias décadas [Hamel *et al*., 2006]. Los aspectos clínicos se muestran en la tabla 1.1.

La RP puede presentarse como única patología (forma no sindrómica), que constituyen del 70 al 80% de las RP, o asociada a otras alteraciones sistémicas dando lugar a formas sindrómicas. Se han descrito más de 30 síndromes asociados a RP. El

más frecuente es el Síndrome de Usher (USH) que supone aproximadamente el 15-20% de todos los casos de RP. En este caso la RP se encuentra asociada a una hipoacusia neurosensorial y, en ocasiones, a una disfunción vestibular.

Aspectos clínicos	
Función visual	Ceguera nocturna (CN), miopía (frecuente), pérdida progresiva de la agudeza visual
Campo visual (CV)	Pérdida de la visión periférica en estadíos tempranos, pérdida de visión central en estadíos avanzados con visión en túnel y escotoma central
Fondo de ojo (FO)	Depósito de pigmento en forma de espículas en la periferia de la retina, estrechamiento de los vasos de la retina, palidez de la papila óptica (Figura 1.6)
Movimiento de ojos	Nistagmo (frecuente)
Electrorretinograma	Disminución o abolición de las ondas a y b

Tabla 1.1. Aspectos clínicos de retinosis pigmentaria. Modificada Ayuso *et al*., 2010.

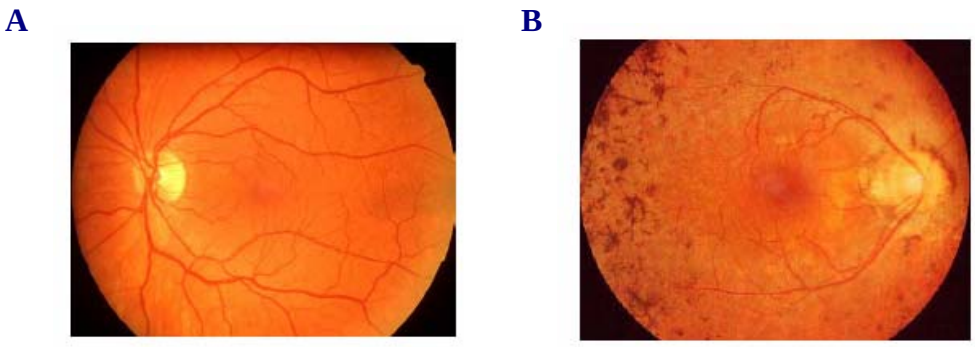


Figura 1.6. Foto de un fondo de ojo. **A.** Fondo de ojo de un individuo sano. **B.** Fondo de ojo de un paciente afectado de RP. En la imagen del fondo afectado se observa palidez de la papila óptica, disminución del calibre de los vasos sanguíneos y depósito de pigmento en la periferia.

1.2.2. ASPECTOS GENÉTICOS DE LA RP

La RP, al igual que el resto de las DR, presenta además de una gran heterogeneidad clínica, una enorme heterogeneidad genética; es una enfermedad monogénica que puede ser heredada como autosómica recesiva (ar), autosómica dominante (ad) o ligada al cromosoma X (xl). También se han descrito otros tipos de herencia no mendeliana como herencia mitocondrial, digenismo, trialelismo y disomía uniparental [Hartong *et al*., 2006].

El estudio llevado a cabo por Ayuso *et al*., 1995 muestra que en población española afectada de RP no sindrómica, la forma recesiva (arRP) está presente en 39% de las familias, siendo el 12% para el caso de las formas dominantes (adRP) y el 4% para las ligadas al cromosoma X (xlRP). La RP puede presentarse además de forma esporádica (sRP), es decir, aquellos casos que se presentan sin antecedentes familiares y resulta difícil, *a priori,* conocer su patrón de herencia, lo cuales constituyen el 41% de todos los casos. El 4% restante corresponde a las familias afectadas de RP las cuales no pueden ser clasificadas en ninguno de los grupos anteriores. Estos porcentajes difieren para algunas formas con otras poblaciones estudiadas, donde se observa que, la arRP está presente aproximadamente en un 25% de los casos, la adRP en un 30%, la xlRP en 15% de los casos y en el 30% restante se encuentran las formas esporádicas y no clasificadas [Daiger *et al*., 2007].

En 1990 Dryja *et al* identificaron la primera mutación asociada a RP en el gen de la rodopsina; desde entonces se ha establecido que mutaciones en muchos genes diferentes pueden causar RP. A día de hoy, alrededor de 50 genes se han descrito como causa de RP no sindrómica, 33 de ellos han sido asociados a arRP (Tabla 1.2), sin embargo, este número de genes sólo es capaz de explicar poco más del 50% de todos los casos [Wright *et al*., 2010]. A pesar de que las funciones de algunos de estos genes han sido estudiadas de forma exhaustiva, es difícil establecer una precisa correlación genotipo-fenotipo, ya que, mutaciones en el mismo gen pueden dar lugar a fenotipos diferentes, y mutaciones en distintos genes pueden producir fenotipos similares (Figura 1.7). Además, la mayoría de los genes y mutaciones que causan RP son responsables de pocos individuos o familias, por lo que no es fácil encontrar mutaciones comunes o puntos calientes en los genes asociados. Cada uno de los genes descritos están presentes

en un porcentaje muy bajo de familias, a excepción de el gen de la rodopsina (*RHO*) que representa el 25% de los casos de adRP, el gen *USH2A* que causa el 20% de las formas recesivas, incluyendo formas sindrómicas, y el gen *RPGR* que está presente en el 70% de las formas xlRP [Hartong *et al*., 2006].

La mayoría de los genes y proteínas asociados a RP están implicados en funciones de la retina como la fototransducción, el ciclo visual, la fagocitosis de los discos de los fotorreceptores, el desarrollo de la retina, la estructura de los fotorreceptores, la función y estructura ciliar, el *splicing*, y, en otras funciones como pueden ser en la degradación de proteínas en el EPR, en el intercambio iónico, el tráfico de moléculas en el botón sináptico de los fotorreceptores y muchas otras. Además, no se conoce la función de algunos genes y proteínas asociados a RP. La tabla 1.2 muestra los genes involucrados en arRP, su localización, proteína que codifican, función y otros fenotipos a los que han sido asociados.

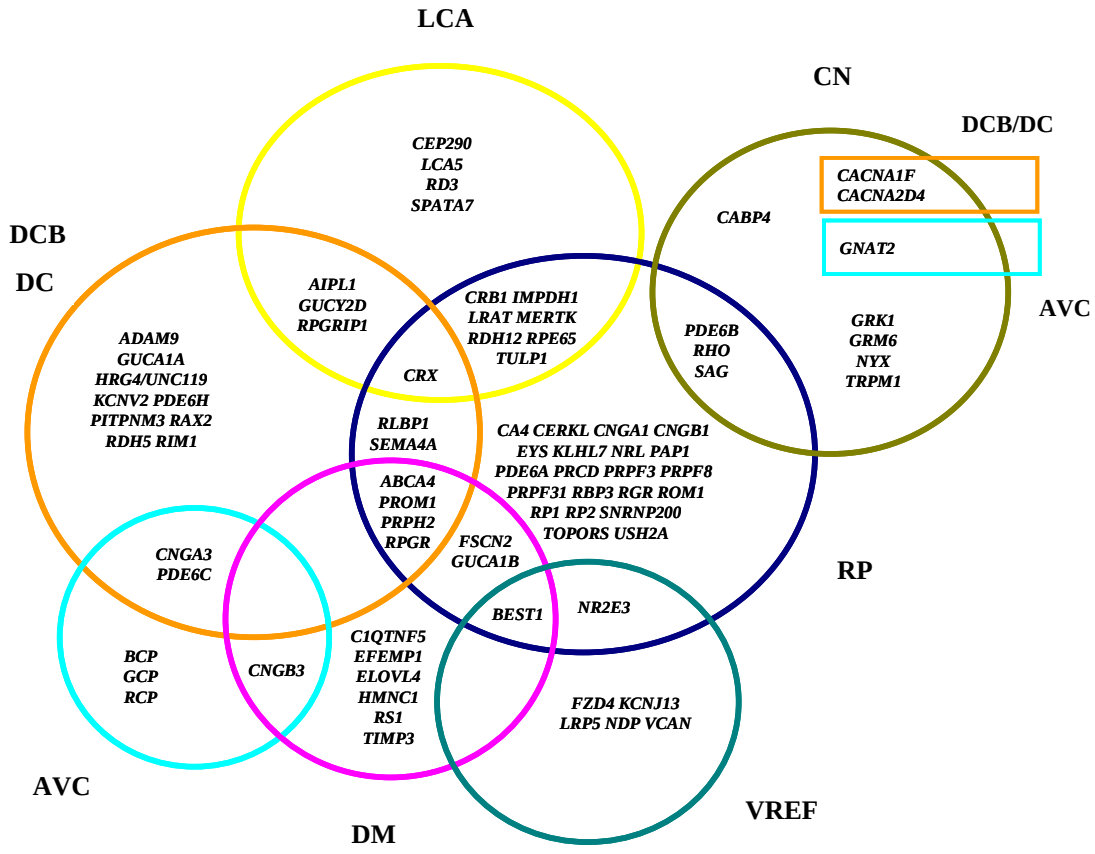


Figura 1.7. Representación de la heterogeneidad genética de las DR. Las zonas solapantes indican como un mismo gen puede dar lugar a diferentes fenotipos. RP retinosis pigmentaria, CN ceguera nocturna, LCA amaurosis congénita de Leber, DCB distrofia de conos-bastones, DC distrofia de conos, AVC alteración de la visión cromática, DM distrofia macular, VREF vitreorretinopatía exudativa familiar. Modificada de Berger *et al*., 2010.

Gen	Localización	Proteína	MIN	Función	Otros fenotipos asociados
ABCA4	1p22.1	*Retinal ATP-binding cassette transporter*	601691	Ciclo visual	Enfermedad de Stargardt, distrofia de conos-bastones, degeneración macular asociada a la edad, fundus falvimaculatus; todas (ar)
BEST1	11q12.3	*Bestrophin-1*	607854	Ciclo visual	Vitroretinocoroidepatía (ad), distrofia macular de Best (ad) y bestrofinopatía (ar)
C2ORF71	2p24.1	*Chromosome 2 open reading frame 71*	613425	---	---
CERKL	2q31.3	*Ceramide kinase-like*	608381	---	Distrofia de conos-bastones
CNGA1	4p12	*Cyclic nucleotide gated channel alpha 1*	123825	Fototransducción	---
CNGB1	16q13	*Cyclic nucleotide gated channel beta 1*	600724	Fototransducción	---
CRB1	1q31.3	*Crumbs homolog 1*	604210	Estructural Matriz extracelular	Amaurosis congénita de Leber (ar), atrofia coriorretiniana (ad), Retinosis pigmentaria (ar) con epitelio pararteriolar preservado, vasculopatía exudativa Coats-like y retina con laminación anormal
EYS	6p12	*Eyes shut homolog*	612424	---	---
FAM161A	2p15	*Family with sequence similarity 161, member a*	613596	---	---
IDH3B	20p13	*Isocitrate dehydrogenase 3, beta subunit*	604526	Ciclo visual	---
IMPG2	3q11.2	Interphotoreceptor matrix proteoglycan 2	607056	---	---
LRAT	4q32.1	*Lecithin retinol acyltransferase*	604863	Ciclo visual	Amaurosis congénita de Leber (ar)

Tabla 1.2. Genes asociados a arRP. “ar” herencia autosómica recesiva y “ad” herencia autosómica dominante.

Gene	Localización	Proteína	MIN	Función	Otros fenotipos asociados
MERTK	2q14.1	*C-mer proto-oncogene tyrosine kinase*	604705	Fagocitosis segmento externo de los bastones	Amaurosis congénita de Leber (ar)
NR2E3	15q22.32	*Nuclear receptor subfamily 2, group E,member 3*	604485	Desarrollo y mantenimiento de la retina. Factor de transcripción	Síndrome de conos aumentados (ar), Síndrome de *Goldmann- Favre*
NRL	14q11.2	*Neural retina leucine zipper*	162080	Desarrollo y mantenimiento de la retina. Factor de transcripción	Degeneración con pigmento agrupado Función de los conos azules preservada
PDE6A	5q33.1	*Phosphodiesterase 6A*	180071	Fototransducción	---
PDE6B	4p16.3	*Phosphodiesterase 6B*	180072	Fototransducción	Ceguera nocturna congénita estacionaria (ad)
PDE6G	17q25	*Phosphodiesterase 6G*	180073	Fototransducción	---
PRCD	17q25.1	*Progressive rod-cone degeneration*	610598	---	---
PROM1	4p15.32	*Prominin 1*	604365	Desarrollo de la retina	Retinosis pigmentaria con degeneración macular (ar), distrofia macular Stargardt-like (ad), distrofia macular (ad), ojo de buey, distrofia de conos-bastones (ad)
RBP3	10q11.22	*Retinol binding protein 3*	180290	Ciclo visual	---
RDH12	14q24.1	*Retinol dehydrogenase 12*	608830	Ciclo visual	Amaurosis congénita de Leber (ar), retinosis pigmentaria (ad)
RGR	10q23.1	*Retinal G protein coupled receptor*	600342	Ciclo visual	Esclerosis coroidea (ad)
RHO	3q22.1	*Rhodopsin*	180380	Fototransducción. Estructura del fotorreceptor	Ceguera nocturna congénita estacionaria (ad)

Tabla 1.2. Genes asociados a arRP. “ar” herencia autosómica recesiva y “ad” herencia autosómica dominante.

Gen	Localización	Localización	MIN	Función	Otros fenotipos asociados
RLBP1	15q26.1	*Retinaldehyde binding protein 1*	180090	Ciclo visual	----
RP1	8q12.1	*Retinitis pigmentosa 1*	603937	Estructura ciliar	Retinosis pigmentaria (ad)
RPE65	1p31.2	*Retinal pigment epithelium-specific protein 65kDa*	180069	Ciclo visual	Amaurosis congénita de Leber (ar)
SAG	2q37.1	*Arrestin, s-antigen*	181031	Fototransducción	Enfermedad de Oguchi (ar)
SPATA7	14q31.3	*Spermatogenesis associated 7*	609868	---	Amaurosis congénita de Leber (ar)
TTC8	14.31.3	*Tetratricopeptide repeat domain 8*	608132	Función ciliar	Síndrome de Bardet-Biedl
TULP1	6p21.31	*Tubby like protein 1*	602280	Desarrollo de la retina	Amaurosis congénita de Leber (ar)
USH2A	1q41	*Usher syndrome 2A*	608400	Estructural: tráfico fotorreceptores	Síndrome de Usher tipo2a (ar)
ZNF513	2p24.1	*Zinc finger protein 513*	613598	Factor de transcripción	---

Tabla 1.2. Genes asociados a arRP. “ar” autosómica recesiva y “ad” autosómica dominante.

1.3. GENES ANALIZADOS EN ESTE ESTUDIO

1.3.1. GEN *CERKL* (*Ceramide kinase-like*)

El gen *CERKL* [OMIN 608381] fue mapeado por Tuson *et al*., [2004] en la localización 2q31.2. La proteína CERKL comparte el 29% de identidad con las ceramidas quinasas (CERK) debido a la presencia de su dominio diacilglicerol quinasa.

El gen *CERKL* sufre un proceso de *splicing* alternativo dando lugar a cuatro isoformas distintas; *CERKL*a, que presenta 13 exones y codifica para una proteína de 532 aminoácidos, *CERKL*b (14 exones y 558 aminoácidos), *CERKL*c (10 exones y 419 aminoácidos) y *CERKL*d (11 exones y 463 aminoácidos); sólo dos de ellas (*CERKL*a y *CERKL*b) contienen el dominio diacilglicerol quinasa. Tal y como muestra la figura 1.8, las cuatro variantes se expresan en retina y presentan similares modelos de localización subcelular, localizándose principalmente en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi, aunque los estudios realizados apuntan a una localización altamente dinámica según los estímulos que actúen sobre la célula [Tuson *et al*., 2009].

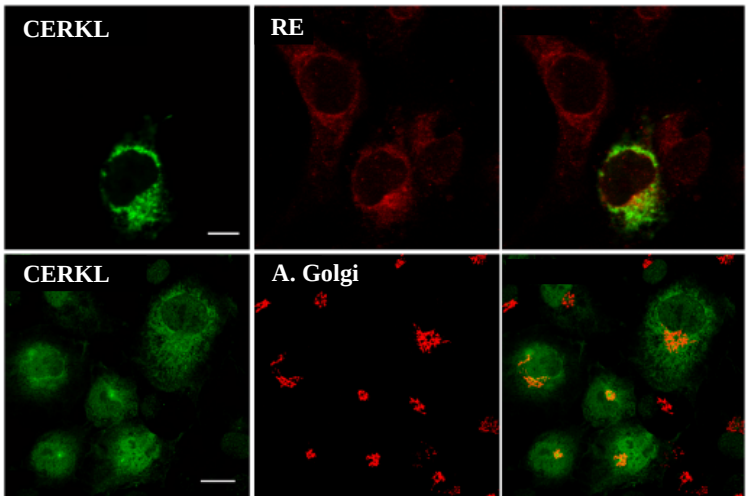


Figura 1.8. Localización subcelular de la isoforma *CERKL*a. CERKL se localiza en compartimentos subcelulares membranosos, principalmente en el retículo endoplasmatico (RE) y en el aparato de Golgi (A. Golgi). Se obtuvieron los mismos resultados para todas las isoformas. Modificada de Tuson *et al*., 2009.

Las ceramidas son una de las llaves principales en el mecanismo de la regulación de la apoptosis celular producida por el estrés. La fosforilación de estos enzimas por la acción de la ceramida quinasa juega un papel fundamental en la protección de la célula frente a la apoptosis.

A pesar de que no hay evidencias de que CERKL actúe como una ceramida quinasa, según los estudios realizados por Bornancin *et al*., [2005] e Inagaki *et al*., [2006] no se descarta la posibilidad, habiéndose demostrado posteriormente [Tuson *et al*., 2009] que, la sobreexpresión de las distintas isoformas del gen *CERKL* protegen a la célula de la apoptosis inducida por el estrés oxidativo.

Las mutaciones en este gen se han asociado a retinosis pigmentaria autosómica recesiva [Tuson *et al*., 2004] y a distrofia de conos bastones (DCB) [Aleman *et al*., 2009] sin embargo, a día de hoy, se desconoce el mecanismo por el cual mutaciones en el gen *CERKL* producen estas patologías.

Actualmente, hay descritas 7 mutaciones en este gen [Tuson *et al*., 2004; Auslender *et al*., 2007; Tang *et al*., 2008; Aleman *et al*., 2009; Littink *et al*., 2010]. Sólo una de ellas [Tuson *et al*., 2004] ha sido detectada en pacientes afectados de RP en población española.

1.3.2. GEN *CNGA1* (*Cyclic nucleotide gated channel alpha 1*)

El gen *CNGA1* [OMIN 123825] fue asignado al cromosoma 4 por Dhallan *et al*., [1991], su secuencia fue clonada por homología a partir de retina bovina, ya que comparten un 91% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos [Kaupp *et al*., 1989].

Los canales catiónicos dependientes de GMPc de los bastones de la retina están formados por dos subunidades homólogas, α (CNGA1) y *β* (CNGB1) (Figura 1.9). La estructura y secuencia genómica de gen *CNGA1* fue descrita por Pittler *et al*., [1992] y Dhallan *et al*., [1992] y está formada por 10 exones. Codifica para una proteína formada por 690 aminoácidos que se expresa de forma específica en la membrana plasmática de los bastones de la retina.

Como se ha descrito en el apartado 1.1, los canales catiónicos dependientes de GMPc participan de la última etapa de la fototransducción [Stryer, 1986; Yau & Baylor, 1989].

Mutaciones en el gen *CNGA1* han sido asociadas a retinosis pigmentaria autonómica recesiva [Dryja *et al*., 1995]. Estudios posteriores han asociado mutaciones en este gen a arRP juvenil [Paloma *et al*., 2002; Zhang *et al*., 2004]. Actualmente, hay descritas siete mutaciones en el gen *CNGA1* [HGMD Professional 2010.3]. Las mutaciones en *CNGA1* son responsables del 2% de los casos en población española [Paloma *et al*., 2002]. Datos similares se han descrito para otras poblaciones [Zhang *et al*., 2004].

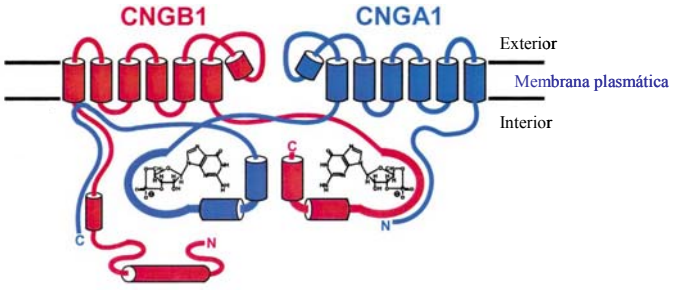


Figura 1.9. Representación simplificada de la membrana plasmática de los bastones de la retina donde se observa, en azul, la estructura de la subunidad α (CNGA1) y, en rojo, la *β* (CNGB1) que componen los canales catiónicos dependientes de GMPc. Ambas formadas por seis dominios transmembrana, un poro y dos regiones citoplasmáticas (N y C terminal).Modificada de Tradeau & Zagotta., 2002.

1.3.3. GEN *CNGB1* (*Cyclic nucleotide gated channel beta 1*)

El gen *CNGB1* [OMIN 600724] fue localizado en el cromosoma 16 por Ardell *et al*., [1995], quienes un año más tarde mediante hibridación *in situ* fluorescente delimitaron la localización a 16q13. El gen *CNGB1* está formado por 12 exones y tiene un tamaño aproximado de 11kb [Ardell *et al*., 1995]; codifica para una proteína formada por 1251 aminoácidos, y a nivel de la retina se expresa en la membrana plasmática de los bastones.

Tal y como se describe en al apartado anterior 1.3.2, los canales catiónicos son un complejo heteroligomérico formado por las subunidades homologas α (CNGA1) y *β*

(CNGB1); presentan una estructura que se detalla en la figura 1.9, y participan el la última etapa de la fototransducción.

La proteína CNGB1 presenta un dominio de unión a iones y un dominio de unión a GMPc [Simpson *et al*., 2010].

Barril *et al*., 2001 describieron por primera vez que mutaciones en el gen *CNGB1* estaban asociadas a retinosis pigmentaria autonómica recesiva tras llevar a cabo un estudio mediante mapeo de homocigosidad. Las mutaciones en el gen *CNGB1* parecen ser la causa de la arRP en un 4% de los casos [Hartong *et al*., 2006]. Actualmente, solo hay descritas tres mutaciones en *CNGB1* [Barril *et al*., 2001; Kondo *et al*., 2004; Simpson *et al*., 2010]. Distintos fenotipos (RP juvenil Y RP típica) se han asociado a mutaciones en este gen, sin embargo, el mecanismo por el cual las distintas mutaciones contribuyen a la aparición de la RP está por determinar [Barril *et al*., 2001; Kondo *et al*., 2004; Becirovic *et al*., 2010].

1.3.4. GEN *CRB1* (*Crumbs homolog 1*)

El gen *CRB1* [OMIN 604210] se localiza en 1q31. Fue clonado por den Hollander *et al*., en 1999. El gen está formado por 11 exones y tiene un tamaño de 40kb.

Codifica para una proteína transmembrana que presenta un largo dominio extracelular formado por 19 dominios *epidermal grow factor* (EGF-*like*), 3 dominios de lámina G, así como un dominio lecitina tipo C. Esta compuesta por 1406 aminoácidos y presenta un 35% de identidad con la proteína *crumbs* de *Drosophila melanogaster* [den Holander *et al*., 1999].

El gen presenta *splicing* alternativo dando lugar a 4 isoformas distintas, de las cuales sólo la 1 y la 2 se expresan en retina. La isoforma 1 se localiza en la membrana apical de las células epiteliales de la retina y en la zona apical de las uniones adherentes de la membrana limitante externa de la retina, mientras que la isoforma 2 es secretada [Kantardzhieva *et al*., 2005].

Estudios realizados por Pellikka *et al*., [2002] han demostrado que debido a la similitud del gen con la proteína *crumbs* de *Drosophila, CRB1* tiene un papel fundamental en la interacción célula-célula y posiblemente en el mantenimiento de la polaridad celular de la retina. Está implicado en la morfogénesis de los fotorreceptores y es un componente central que controla el ensamblaje de la *zonula adherens*.

Las mutaciones en el gen *CRB1* se han asociado a distintos fenotipos como RP [den Hollander *et al*., 1999], RP con vasculopatía exudativa tipo *Coats* [den Hollander *et al*., 2001], amaurosis congénita de Leber [den Hollander *et al*., 2001; Lotery *et al*., 2001; Gerber *et al*., 2002; Khaliq *et al*., 2003] y RP con preservación del epitelio pararteriolar [McKay *et al*., 2005].

Actualmente hay descritas 124 mutaciones en el gen *CRB1* [HGMD Professional 2010.3]. Mientras que las mutaciones en este gen son responsables de un 20% de los casos de amaurosis congénita de Leber en población española [Vallespín *et al*., 2007], en otras poblaciones el porcentaje de pacientes LCA con mutaciones en CRB1 varía de 0% hasta un 15% [Zernant *et al*., 2005; Yzer *et al*., 2006; Henderson *et al*., 2010]. La contribución del gen *CRB1* es mucho menor, aproximadamente del 1%, cuando nos referimos a pacientes afectados de arRP [Hartong *et al*., 2006].

1.3.5. GEN *EYS* (*Eyes shut drosophila homolog*)

El gen *EYS* [OMIN 612424], también llamado *SPAM,* se localiza en el cromosoma 6 (6q12), está formado por 43 exones y presenta un tamaño de 2Mb, siendo el gen más grande identificado en la retina humana y el quinto más grande a lo largo del genoma humano [Abd El.Aziz *et al*., 2008].

Ruíz et al., determinaron en 1998 tras un estudio de mapeo de homocigosidad en familias consanguíneas españolas afectadas de arRP, el *locus* RP25, el cual parecía ser el responsable del 10 al 20% de los casos. Posteriormente, estudios de ligamiento realizados en distintas poblaciones apoyaban la idea de la enorme contribución de dicho *locus* a arRP [Khaliq *et al*., 1999; Barragán *et al*., 2005; Abd El-Aziz *et al*., 2007]. Finalmente, el gen *EYS* fue identificado y caracterizado por Abd El-Aziz *et al*., [2008]

tras la detección de seis mutaciones en este gen en familias independientes españolas afectadas de arRP.

La proteína que codifica el gen se expresa en las células fotorreceptoras de la retina y está formada por al menos 28 dominios *epidermal growth factor* (EGF) en su extremo N-terminal, seguido de 5 dominios laminina G en el extremo C-terminal. Este dominio fue también detectado en *Drosophila* en el gen *eys* (*eys shu*) que codifica para la proteína *spacemarker* (spam) (Figura 1.10). *Drosophila spam* se expresa en los ojos de insectos, con un sistema abierto de rabdómeros, en el cual los rabdómeros o fotorreceptores de cada omatidio están separados unos de otros, como es el caso de *Drosophila melanogaster*. Se ha demostrado que la pérdida completa del gen *eys* hace que se pase de un sistema abierto a un sistema cerrado debido a la reorganización de la arquitectura de los ojos compuestos. Todos estos conocimientos evidencian la posible implicación de *EYS* en el mantenimiento e integridad de las células fotorreceptoras de la retina humana.

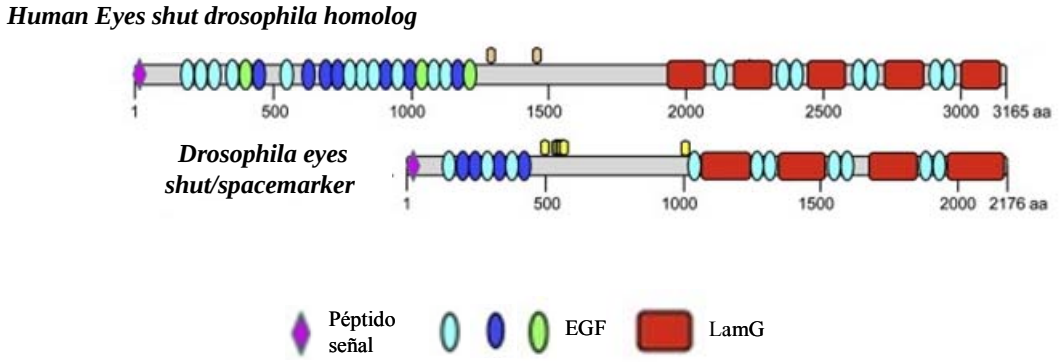


Figura 1.10. Representación esquemática de la estructura de los dominios de la proteína codificada por el gen *EYS* en humanos y por el gen *eys* en *drosophila*. EGF dominio *epidermal growth factor,* LamG dominio laminina G. Modificada de Collin *et al*., 2008.

A pesar de que el gen *EYS* fue identificado en familias españolas [Abd El-Aziz *et al*., 2008], mutaciones en este gen se han asociado a retinosis pigmentaria autosómica recesiva en distintas poblaciones [Collin *et al*., 2008; Abd El-Aziz *et al*., 2010; Audo *et al*., 2010; Bandah-Rozenfeld *et al*., 2010; Huang *et al*., 2010; Littink *et al*., 2010].

Mientras que mutaciones en este gen son responsables aproximadamente del 15% de las familias afectadas de arRP en población española [Barragán *et al*., 2010], para otras poblaciones europeas se encuentra entre un 5 y un 12% de los casos [Littink *et al*., 2010; Audo *et al*., 2010].

1.3.6. GEN *LCA5* (*Libercilin*)

El gen *LCA5* [OMIN 611408] se localiza en el cromosoma 6q14.1. Fue clonado por den Hollander *et al*., (2007) tras un estudio de mapeo de homocigosidad. El gen está formado por 9 exones.

Codifica para una proteína de 697 aminoácidos y que está formada por cuatro dominios *coiled-coil.* Estudios en ratón muestran como la expresión de *LCA5* es ubicua en los primeros días del desarrollo embrionario, mientras que en la edad adulta, la expresión es limitada a las células fotorreceptoras de la retina. En células ciliadas, la libercilina está localizada en el axonema. En retina de rata y ratón, se localiza entre el segmento interno y el segmento externo de los fotorreceptores. La sobreexpresión de libercilina en células de la retina mostró la presencia de la misma en el cuerpo basal, en la zona de transición del cilio y en los microtúbulos.

Den Hollander *et al*., [2007] mostraron como la sobreexpresión de libercilina en células humanas del EPR producía distorsión en la dinámica de los microtúbulos. En células humanas de riñón, la libercilina interacciona con 24 proteínas, muchas de las cuales están asociadas con funciones centrosomales o ciliares, como la proteína codificada por el gen *USH2A* [van Wijk *et al*., 2009].

Mutaciones en el gen *LCA5* se han asociado a LCA [den Hollander *et al*., 2007].

1.3.7. GEN *LRAT* (*Lecithin retinol acyltransferase)*

El gen *LRAT* [OMIN 604863], se localiza en el cromosoma 4q31.2. Fue clonado por Ruíz *et al*., [1999]. Está formado por tres exones y codifica para una proteína de 230 aminoácidos.

La proteína codificada por este gen, es un enzima que cataliza la esterificación de todo-*trans*-retinol a ésteres todo-*trans*-retinal. Una reacción esencial en el ciclo visual. Presenta un amplio espectro de expresión, sobre todo en aquellos tejidos en los cuales hay un elevado procesamiento de la vitamina A. A nivel de la retina se expresa en el epitelio pigmentario (EPR).

Mutaciones en el gen *LRAT* se han asociado a RP de inicio precoz [Thompson *et al*., 2001], y a LCA [Senechal *et al*., 2006].

1.3.8. GEN *MERTK* (*Mer tyrosine kinase protooncogene)*

El gen *MERTK* [OMIN 604705], localizado en 2q14.1 [Weier *et al*., 1999], fue clonado por Graham *et al*., en 1994. Está formado por 19 exones y codifica para una proteína que contiene 999 aminoácidos.

La proteína presenta una estructura de proteinquinasa (Figura 1.11) con una región extracelular formada por dos dominios inmunoglobulina-*like* (Ig-*like*) y dos dominios fibronectina tipo III (FNIII), una región transmembrana y una región intracelular que corresponde al dominio tirosina kinasa [Gal *et al*., 2000].

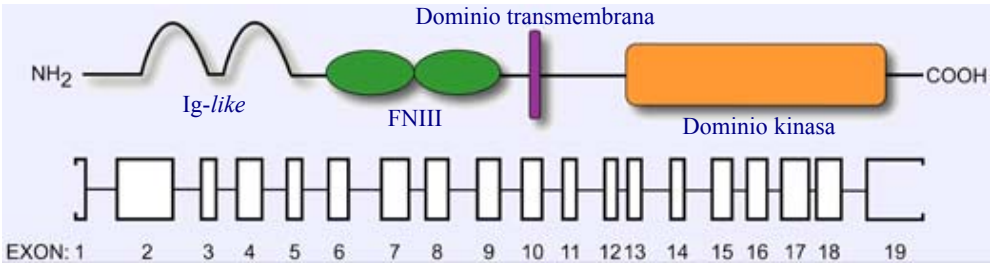


Figura 1.11. Representación esquemática de la estructura de los dominios de la proteína codificada por el gen *MERTK*. Ig-*like* dominio inmunoglobulina-*like*, FNIII dominio fibronectina tipo III.

El *splicing* alternativo del gen *MERTK* da lugar a diferentes isoformas que presentan un amplio espectro de expresión en diferentes tejidos. A nivel de la retina, se detectan niveles elevados de la proteína MERTK en el epitelio pigmentario de la retina (EPR).

El gen *Mertk* fue asociado a distrofias de retina con patrón autosómico recesivo en un modelo de rata por D´Cruz *et al*., [2000]. Mutaciones en este gen producían defectos en el proceso de fagocitosis de los fotorreceptores por el epitelio pigmentario de la retina (EPR).

Fueron Gal *et al*., [2000] quiénes tras el estudio de los 19 exones y regiones adyacentes del gen *MERTK* detectaron cambios en la secuencia de ADN en pacientes afectados de RP. Estudios predictivos sugieren la reducción o pérdida de la función de *MERTK*, evidenciando así la implicación del proceso de fagocitosis del EPR en distrofias de retina en humanos.

Las mutaciones en el gen *MERTK* se han asociado a arRP y a LCA [Gal *et al*., 2000]. Distintos estudios apuntan a que mutaciones en este gen en pacientes afectados de arRP se asocian a un fenotipo de inicio precoz [Gal *et al*., 2000; McHenry *et al*., 2004; Tschernutter *et al*., 2006; Mackay *et al*., 2010]. Actualmente hay descritas 15 mutaciones en este gen como causa de arRP [HGMD Professional 2010.3], las cuales cuentan con aproximadamente el 1% de las familias afectadas [Hartong *et al*., 2006].

1.3.9. GEN *NR2E3* (*Nuclear receptor subfamily 2, group e, member 3*)

El gen *NR2E3* [OMIN 604485], también llamado *PNR* (*Photoreceptor-specific nuclear receptor*), está localizado en 15q22.3 [Haider *et al*., 2000]. El gen *NR2E3* fue identificado por Kobayashi *et al*., [1999], la región codificante está formada por 8 exones y tiene un tamaño de 7kb.

La proteína presenta un dominio de unión (*P box*) a ADN, característico de receptores nucleares. Esta región se encuentra evolutivamente conservada desde nematodos lo que hace pensar que este dominio es esencial en la regulación transcripcional mediada por estos receptores nucleares en una gran variedad de especies animales [Kobayashi *et al*., 1999]. Estudio de expresión en humanos [Haider *et al*., 2000] muestran una expresión restringida a la retina neurosensorial, zona donde residen los fotorreceptores. En el 2004 Cheng *et al*., vieron que la expresión de Nr2e3 en retina de roedores se reducía a los núcleos de los bastones, no detectándose en los conos.

El gen *NR2E3* interacciona con el gen *CRX* y presenta un papel clave en la red de transcripción de la retina con un doble papel regulador, participando en la diferenciación terminal y mantenimiento de la función de los bastones de la retina [Cheng *et al*., 2004; Peng *et al*., 2005].

Mutaciones en el gen *NR2E3* se han asociado a distintos fenotipos: síndrome de aumento de conos [Haider *et al*., 2000], adRP [Coppieters *et al*., 2007], síndrome de *Goldmann-Favre* [Bernal *et al*., 2008] y arRP [Bernal *et al*., 2008]. Hasta el momento se han identificado 32 mutaciones distintas. Un alto porcentaje de estas mutaciones están localizadas en el dominio evolutivamente conservado de unión a ADN y en el dominio de unión a ligandos [Schorderet *et al*., 2010]. La gran variabilidad fenotípica en los pacientes afectados con mutaciones en este gen puede ser debido a distintos mecanismos como pueden ser la ausencia de unión de ADN, alteraciones en la interacción con reguladores transcripcionales y alteraciones en la actividad de genes modificadores [Schorderet *et al*., 2010].

1.3.10. GEN *PCDH21* (*Protocadherin 21*)

El gen *PCDH21* [OMIN 609502] se localiza en el cromosoma 10q23.1. En el año 2001, Rattner *et al*., clonaron el gen *Pcdh21* desde retina bovina, de ratón y de pollo, identificando el gen humano *PCDH21* tras el análisis de bases de datos genómicas. El gen está formado por 17 exones.

El gen codifica para una proteína que tiene un péptido señal en el extremo N-terminal, seis dominios cadherina extracelulares, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático C-terminal formado por 150 aminoácidos. Estudios en tejidos de ratón y/o bovinos detectaron expresión únicamente en el segmento externo de los fotorreceptores de la retina [Rattner *et al*., 2001].

Estudios animales muestran como ratones deficientes de la proteína Pcdh21 presentan una pérdida progresiva de los fotorreceptores por apoptosis y una morfología anormal de las regiones de los segmentos externos. El electrorretinograma muestra una alteración muy pequeña en la amplitud de las ondas principales y sugiere una función normal de la cascada de la fototransducción en bastones [Rattner *et al*., 2001].

Recientemente, mutaciones en el gen *PCDH21* se han asociado a DCB [Ostergaard *et al*., 2010].

1.3.11. GEN *PDE6A* (*Phosphodiesterase 6a)*

El gen *PDE6A* [OMIN 180071] se localiza en 5q31.2 [Pittler *et al*., 1990] y está estructurado en 22 exones todos ellos codificantes. Fue clonado por primera vez por Ovchinnikov *et al*., [1987] para el enzima bovino. Años más tarde, Pittler *et al*., [1990] clonaron el ADNc para humanos. Ambas proteína están formadas por 860 aminoácidos y presentan un 94% de identidad.

La proteína PDE6A forma parte de la fosfodiesterasa dependiente de GMPc. La enzima es una proteína heterotetramérica que está formada por una subunidad α (PDE6A), una subunidad β (PDE6B) y dos subunidades γ (PDE6G). Como se ha descrito en el apartado 1.1.2, la fosfodiesterasa (PDE6) está implicada en el proceso de fototransducción de las células fotorreceptoras de la retina.

Tanto la subunidad α, como la β, presentan tres dominios. El dominio más largo, que se encuentra en el extremo C-terminal corresponde al dominio catalítico. Los otros dos dominios más cortos, son los dominios reguladores GAF (dominios conservados de unión a GMPc): GAFa y GAFb [Cote., 2004].

Mutaciones en el gen *PDE6A* se han asociado distintos fenotipos: a arRP de inicio precoz [Huang *et al*., 1995; Riazuddi *et al*., 2006; Cortón *et al*., 2010] y a un fenotipo no asociado a deficiencias en las enzimas específicas de fotorreceptores caracterizado por presentar, además de los alteraciones típicas de la arRP, una tracción vitreomacular, edema macular quístico, atrofia macular y un presencia de un anillo hiperfluorescente. Uno de los mecanismos para explicar esto puede ser que la pérdida de los fotorreceptores provoca migración de las células de *Müller* [Tsang *et al*., 2008].

Actualmente hay descritas 13 mutaciones en el gen *PDE6A* asociadas a arRP [HGMD Professional 2010.3]. Las mutaciones en este gen contribuyen en entre un 3 y un 4% de todos los casos de arRP [Hartong *et al*., 2006].

1.3.12. GEN *PDE6B* (*Phosphodiesterase 6b*)

El gen *PDE6B* [OMIN 180072] se localiza en 4p16.3 y está formado por 22 exones. Fue clonado por Khramtsov *et al*. [1993]. El gen *PDE6B*, da lugar a una proteína de 854 aminoácidos que comparte un 91.1% y 92.4% de identidad con la subunidad β bovina y de ratón respectivamente [Khramtsov *et al*., 1993].

Al igual que la subunidad *α* tal y como se describe en el apartado 1.1.2, forma parte de la fosfodiesterasa dependiente de GMPc y está implicada en el proceso de la fototransducción de los fotorreceptores. Su estructura a nivel de dominios coincide con la de la subunidad *α*.

Mutaciones en el gen *PDE6B* han sido asociadas a arRP juvenil [McLaughlin *et al*., 1993; Bayes *et al*., 1995; Hmani-Aifa *et al*., 2009], a ceguera nocturna congénita estacionaria autosómica dominante [Gal *et al*., 1994; Tsang *et al*., 2007] y, al igual que en el caso de la *PDE6A* tal y como se ha descrito en el apartado 1.3.8., a un fenotipo característico que presenta las alteraciones típicas de la RP junto con otras alteraciones maculares y vítreas [Tsang *et al*., 2008].

Actualmente hay descritas 27 mutaciones en el gen *PDE6B* asociadas a arRP [HGMD Professional 2010.3]. Las mutaciones en el gen *PDE6B* son la causa del 5% de las familias afectadas de arRP en población española [Bayes *et al*., 1995]. Cifras similares se han descrito para otras poblaciones [McLaughlin *et al*., 1995].

1.3.13. GEN *PDE6C* (*Phosphodiesterase 6c*)

El gen *PDE6C* [OMIN 600827] se localiza en el cromosoma 10q24, está formado por 22 exones, y su tamaño es aproximadamente de 48kb. Codifica para una proteína de 858 aminoácidos que contiene dos dominios de unión a GMPc y un dominio catalítico en su región C-terminal [Piriev *et al*., 1995].

El gen *PDE6C* codifica para la subunidad α de la fosfodiesterasa dependiente de GMPc de los conos, una enzima que está formada por dos subunidades α y dos subunidades γ, y que es esencial para la cascada de fototransducción de los conos. Esta

enzima convierte el GMPc a 5´GMPc durante la exposición a la luz. Esto conlleva al cierre de los canales iónicos dependientes de GMPc en la membrana del segmento externo de los conos, produciéndose así la hiperpolarización de la célula [Burns *et al*., 2001].

Mutaciones en el gen *PDE6C* se han asociado a afectación de conos de inicio precoz como distrofia de conos y acromatopsia [Thiadens *et al*., 2009]. Hasta el momento hay seis mutaciones descritas, las cuales se encuentran distribuidas a lo largo del todo el gen, por lo que la variabilidad de los fenotipos asociados puede deberse a los distintos efectos funcionales de cada una de los mutaciones encontradas [Thiadens *et al*., 2009].

1.3.14. GEN *RDH12* (*Retinol Dehidrogenase 12*)

El gen *RDH12* [OMIN 608830] fue localizado en el cromosoma 14q23.3 por Haeseleer *et al*., [2002] Está formado por 7 exones, y su tamaño es aproximadamente de 13kb. Buscando secuencias similares a *RDH11*, Haeseleer *et al*., clonaron el gen *RDH12* en al año 2002.

El gen codifica para una proteína formada por 316 aminoácidos y que comparte un 79% en similitud con *RDH11*. *RDH12* se expresa de forma predominante en ojo y riñón, también se expresa en cerebro, esqueleto, músculo y estómago. Estudios en mono y ratón indican que Rdh12 se expresa en la base del segmento interno de los fotorreceptores [Haeseleer *et al*., 2002].

Los retinoides son elementos sensibles a la luz e indispensables para la visión, además, sirven de moduladores de la diferenciación y proliferación de distintos tipos de células. *RDH12* pertenece a la familia de las retinol-dehidrogenasas las cuales metabolizan todo, *trans* y *cis* retinol [Haeseleer *et al*., 2002]. Tal y como se describe en el apartado 1.1.3, y se muestra en la figura 1.5, el gen *RDH12* está implicado en el ciclo visual.

Las mutaciones en el gen *RDH12* se has asociado a LCA [Janecke *et al*., 2004], a arRP de inico precoz [Janecke *et al*., 2004] y a adRP [Finger *et al*., 2008]. Actualmente

hay descritas 41 mutaciones en este gen [HGMD Professional 2010.3]. Las mutaciones en el gen *RDH12* son la causa de aproximadamente el 3% de las familias afectadas de distrofias de retina de inicio precoz en población española [Valverde *et al*., 2009], siendo del 2% aproximadamente para otras poblaciones [Thompson *et al*., 2005].

1.3.15. GEN *RGR* (*G protein-coupled receptor, retinal*)

El gen *RGR* [OMIN 600342] se localiza en el cromosoma 10q23 [Chen *et al*., 1996], está compuesto de siete exones y tiene una longitud de 14.8kb.

Jiang *et al*., [1993] identificaron un gen que codifica para una proteína relacionada con la opsina que se encuentra preferencialmente expresada en altos niveles en el epitelio pigmentario de la retina (EPR) y en las células de Müller, células adyacentes a los fotorreceptores [Morimura *et al*., 1999]. La función de *RGR* es esencial para el proceso visual, permitiendo la síntesis y regeneración del pigmento visual.

Durante el proceso de excitación visual, la rodopsina sufre una fotoactivación dando lugar a la formación de de todo-*trans retinal*. Para generar rodopsina y mantener la sensibilidad visual, el todo-*trans* tiene ser metabolizado e isomerizado para producir el cromóforo 11-*cis*-*retinal*. Wenzel *et al*., [2005] demostraron que *RGR*, acelera la conversión de los esteres todo-*trans* retinal a 11-*cis* retinal modulando de forma positiva la actividad isomerohidrolasa en el ciclo visual (Figura 1.5).

Mutaciones en el gen *RGR* se han sido asociadas a arRP [Morimura *et al*., 1999]. Actualmente hay descritas siete mutaciones en este gen [HGMD Professional 2010.3]. Las mutaciones en el gen *RGR* contribuyen aproximadamente al 0,5% de los casos de arRP [Hartong *et al*., 2006].

1.3.16. GEN *RLBP1* (*Retinaldehyde-binding protein 1*)

El gen *RLBP1* [OMIN 180090] está localizado en el cromosoma 15q26. Está formado por ocho exones y siete intrones. El primer exón es no codificante, así como parte de los exones dos y ocho [Intres *et al*., 1994]. En 1988 fue clonado por Crabb *et*

al., y demostraron un 92% de identidad para la secuencia de aminoácidos entre la proteína bovina y la humana. Ambas están formadas por 360 residuos.

El gen *RLBP1* se expresa a nivel de la retina en el EPR y en las células de Müller [Bunt-Milam *et al*., 1983]. La proteína RLBP1 tiene como ligando endógeno al 11-*cis* retinal y/o el 11-*cis*-retinol, por lo que sus propiedades sugieren, tal y como se describe en el apartado 1.1.3, y se muestra en la figura 1.5, que está involucrada en el metabolismo de los retinoides y en la regeneración del pigmento visual, y por lo tanto, asociada a las enfermedades de retina [Crabb *et al*., 1998].

Las mutaciones en el gen *RLBP1* se han asociado a arRP [Maw *et al*., 1997], a retinosis puntata albescens (RPA) [Morimura *et al*., 1999], a distrofia *Bothnia* [Burstedt *et al*., 1997] y a DCB [Eichers *et al*., 2002]. Actualmente, hay descritas 12 mutaciones en este gen, sólo una de ellas se ha asociado a arRP [HGMD Professional 2010.3]. Las mutaciones en el gen *RLBP1* son responsables del 1% de los casos de arRP [Hartong *et al*., 2006].

1.3.17. GEN *RP1* (*RP1 Gene*)

El gen *RP1* [OMIN 603937] se localiza en el cromosoma 8q11 y está formado por 4 exones [Pierce *et al*., 1999]. Fui identificado por primera vez en ratones y debido a su homología Pierce *et al*., [1999] identificaron un nuevo gen en humanos específico de fotorreceptores cuya expresión estaba modulada por lo niveles de oxígeno *in vivo* de la retina.

La proteína codificada por el gen *RP1* está formada por 2156 aminoácidos y se expresa de forma exclusiva en las células fotorreceptoras de la retina [Sullivan *et al*., 1999]. RP1 está localizada en el cilio conector y en el axonema. Se ha visto que el axonema estabiliza a los discos de membrana. Por lo tanto, RP1 parece estar involucrada tanto en la estabilización de la arquitectura de los discos de los segmentos externos, como en el ensamblaje y función del cilio conector [Gao *et al*., 2002; Liu *et al*., 2002; Liu *et al*., 2004; Pierce *et al*., 2004].

Las mutaciones en el gen *RP1* se han asociado a adRP [Pierce *et al*., 1999] y a arRP [Khaliq *et al*., 2005]. Actualmente hay descritas 56 mutaciones en este gen

[HGMD Professional 2010.3]. El gen *RP1* es la causa de menos del 1% de los casos de arRP [Hartong *et al*., 2006].

1.3.18. GEN *RPE65* (*Retinal pigment epithelium-specific protein, 65-kd*)

El gen *RPE65* [OMIN 180069] fue localizado en el cromosoma 1q31 por Hamel *et al*., en 1994; está formado por 14 exones y tiene un tamaño de 20kb [Nicoletti *et al*., 1995].

Como se ha descrito en apartados anteriores, el EPR es una monocapa de células que están involucradas en muchos aspectos del metabolismo de la retina externa que son esenciales para el mantenimiento de los fotorreceptores. Hamel *et al*., [1993] caracterizaron y clonaron una proteína única microsomal específica del EPR, RPE65, altamente conservada a través de los vertebrados. Fueron Nicoletti *et al*., [1995] quiénes caracterizaron el gen *RPE65*, siendo así el primer gen específico del EPR. Además vieron que la secuencia de la proteína estaba compuesta por 533 aminoácidos y tenía un 98,7% de similitud con la proteína bovina.

La proteína RPE65 presenta dos formas, una forma asociada a la membrana que permite la entrada de todo-*trans*-retinol en el ciclo visual para su transformación en 11-*cis*-retinal, y la forma soluble que acompaña a la vitamina A. La proteína va pasando de de una forma a otra por la acción de LRAT, así cuando la síntesis de cromóforo no es necesaria la forma RPE65 de membrana se convierte en soluble y viceversa. Por lo tanto, tal y como se describe en el apartado 1.1.3, y se muestra en la figura 1.5, RPE65 es la responsable de la isomerización e hidrólisis del todo-*trans*-retinol al 11-*cis*-retinal. Los estudios llevados a cavo por Moiseyev *et al*., [2005] concluyen que RPE65 es una enzima necesaria para el proceso visual de la retina.

Mutaciones en el gen *RPE65* se han asociado a LCA [Marlhens *et al*., 1997], a arRP de inicio precoz [Gu *et al*., 1997] y recientemente, a *Fundus Albipunctatus* [Schatz *et al*., 2011]. A día de hoy, hay descritas más de 100 mutaciones en este gen [HGMD Professional 2010.3]. El gen *RPE65* es responsable de aproximadamente el 2% de los casos de arRP [Hartong *et al*., 2006].

Actualmente, distintos ensayos de terapia génica subretinal se están llevando a cabo para pacientes que presentan mutaciones en el gen *RPE65*. Los estudios consisten en la administración del gen *RPE65* mediante inyección intraocular justo debajo de la retina. Los resultados obtenidos hasta el momento muestran seguridad y corrección de la disfunción del ciclo visual para estos pacientes [Bramall *et al*., 2010; Busskamp *et al*., 2010; Cideciyan *et al*., 2010].

1.3.19. GEN *SAG* (*S-antigen*)

El gen *SAG* [OMIN 181031] se localiza en el cromosoma 2q37 [Calabrese *et al*., 1994]. Está formado por 16 exones y 15 intrones y presenta una longitud aproximada de 50kb [Yamaki *et al*., 1990].

S-antigen es una proteína soluble de 405 aminoácidos implicada, tal y como se describe en el apartado 1.1.2 y 1.1.4, en la recuperación del estado de oscuridad mediante su actividad inhibitoria en la cascada de la fototransducción. A nivel de la retina se expresa en los fotorreceptores. Es una de las proteínas más abundante en los bastones. Se expresa además en la glándula pineal [Ngo *et al*., 1990; Yamaki *et al*., 1990].

Mutaciones en el gen *SAG* se han asociado a la enfermedad de Oguchi [Fuchs *et al*., 1995] y a arRP [Nakazawa *et al*., 1998]. Actualmente hay descritas 9 mutaciones en este gen [HGMD Professional 2010.3]. El gen *SAG* es responsable de menos del 1% de los casos de arRP [Hartong *et al*., 2006].

1.3.20. GEN *SPATA7* (*Spermatogenesis-associated protein*)

El gen *SPATA7* [OMIN 609868] se localiza en el cromosoma 14q31.3. Está formado por al menos 12 exones y su longitud es de aproximadamente 52.8kb [Zhang *et al*., 2003].

Fue identificado por Zhang *et al*., [2003] en rata. La proteína humana se identificó mediante el cribado de una librería de ADN procedente de testículo humano. *SPATA7* codifica para una proteína de 599 aminoácidos y presenta varios sitios de unión a ADN

y tres sitios de fosforilación. La proteína humana comparte un 77% de identidad con la proteína de rata.

Se han descrito dos isoformas para el gen *SPATA7* [Strausberg *et al*., 2002]. Estudios posteriores [Perrault *et al*., 2010] mostraron que la variante 1 se expresa de forma predominante en retina y cerebro, mientras que la variante 2 se expresa preferentemente en los testículos.

Actualmente, la función del gen *SPATA7* se desconoce, aunque algunos estudios apuntan a su implicación en el transporte vesicular [Wang *et al*., 2009].

Mutaciones en el gen *SPATA7* se ha asociado a LCA [Wang *et al*., 2009] y a arRP de inicio precoz [Wang *et al*., 2009]. Se ha descrito una correlación genotipo-fenotipo donde los fenotipos más graves, LCA, se han asociado con mutaciones que provocan la pérdida de la mitad de la proteína, mientras que fenotipos más leves, RP precoz, se asocian a mutaciones donde sólo se afecta el último tercio de la proteína [Wang *et al*., 2009; Perrault *et al*., 2010].

1.3.21. GEN *TULP1* (*Tubby-like protein 1*)

El gen *TULP1* [OMIN 602280] está localizado en el cromosoma 6p21.3 [North *et al*., 1997]. Pertenece a la familia de los genes *tubby-like* (*TUB*, *TULP1* y *TULP2*), todos ellos codifican para proteínas con conservación de la región C-terminal que está formada aproximadamente por 200 aminoácidos, presentando diferencias en la región N-terminal. También se diferencia en su patrón de expresión. *TULP1* se expresa de forma exclusiva en la retina. Estudios en ratones, demuestran que está localizado en el segmento interno del fotorreceptor [Grossman *et al*., 2010]

A pesar de que el mecanismo de estos genes no se conoce de forma exacta, parecen tener un papel importante en el desarrollo y función neuronal [Carroll *et al*., 2004]. Estudios recientes demuestran que, *TULP1* no sólo está implicado en el funcionamiento y supervivencia de los fotorreceptores de la reina, si no que es indispensable para el desarrollo del fotorreceptor sináptico [Grossman *et al*., 2010] y que además, está

implicado en el proceso de fagocitosis del EPR y de los macrófagos, ya que parece ser un ligando para *MERTK* [Caberoy *et al*., 2010].

Mutaciones en el gen *TULP1* han sido asociadas a LCA y a arRP de inicio precoz [Hagstrom *et al*., 1998]. Actualmente hay descritas 26 mutaciones en este gen [HGMD *Professional* 2010.3]. El gen *TULP1* contribuye al 1% de los casos de arRP [Hartong *et al*., 2006].

1.3.22. GEN *USH2A* (*Usherin*)

El gen *USH2A* [OMIN 608400] se localiza en el cromosoma 1q41 [Huang *et al*., 2002]; está formado por un total de 72 exones [Van Wijk *et al*., 2004].

Fueron Eudy *et al*., [1998] quiénes identificaron el gen *USH2A* que codificaba para una proteína formada por 1551 aminoácidos. La proteína contiene un dominio laminina tipo IV, diez dominios laminina tipo factor de crecimiento epidermal y cuatro dominios fibronectina tipo III. Estos dominios son típicos componentes de la lámina basal, matriz extracelular y moléculas de adhesión celular [Eudy *et al*., 1998; Weston *et al*., 2000]. En el ojo, la membrana de Bruch y la matriz de las fotorreceptores son ricas en este tipo de proteínas. *USH2A* se expresa membrana basal de retina y oído interno entre otros tejido [Bhattacharya *et al*., 2002].

En el año 2004 Van Wijk *et al*., identificaron nuevos exones en el gen *USH2A* y obtuvieron así la evidencia de la existencia de un *splicing* alternativo. La nueva isoforma codifica para una proteína de 5202 aminoácidos, y en adición a los dominios ya conocidos presenta dos dominios laminina G, 28 dominios FN3 y un dominio transmembrana seguido de una región intracelular con un motivo de unión a PDZ clase I en su extremo terminal.

El gen *USH2A* forma parte de una red de interacciones proteicas (Figura 1.12), tanto en la retina como en el oído interno, denominada "*interactoma Usher*".

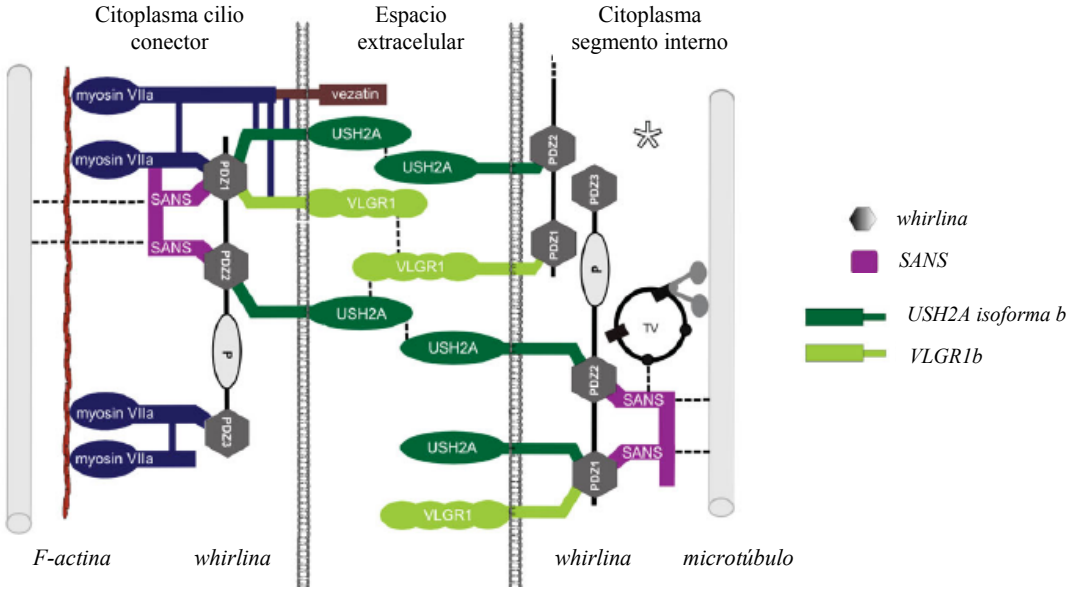


Figura 1.12. Representación esquemática de la red de interacciones proteicas en el cilio de las células fotorreceptoras. Modificada de Maerker *et al*., 2008.

En la retina, la red proteica se localiza en la región periciliar del segmento interno apical y en el cilio conector de las células fotorreceptoras.

Tal y como se muestra en la figura 1.13, esta red se encuentra organizada por las proteínas de andamiaje SANS y whirlina, las cuales interaccionan entre ellas directamente y a través de sus dominios proteicos PDZ con las restantes proteínas Usher integrantes. Los dominios extracitoplásmicos de USH2A y VLGR1 conectan las membranas del cilio conector y del cuello del segmento interno de los fotorreceptores y a su vez, ambas proteínas se encuentran ancladas a través de la whirlina a la red proteica USH ubicada en el citoplasma de estos dominios adyacentes. Además de la función de soporte estructural, el "interactoma Usher" probablemente participa en el marcaje y guía de vesículas así como en la liberación y fusión de dichas vesículas en las áreas designadas de la membrana [Maerker *et al*., 2008].

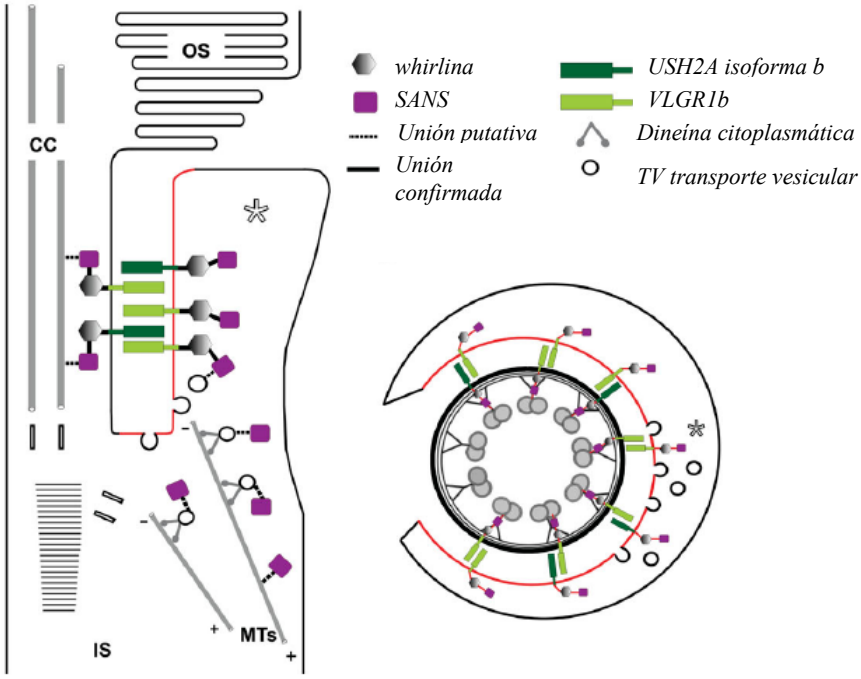


Figura 1.13. Representación esquemática de la red de interacciones proteicas en el cilio de las células fotorreceptoras y su relación con el transporte vesicular. Sección longitudinal y transversal. OS segmento externo, CC cilio conector, IS segmento interno, MTs microtúbulos. Modificada de Maerker *et al*., 2008.

Mutaciones el gen *USH2A* se han asociado a síndrome de Usher tipo II [Eudy *et al*., 1998] y a arRP [Rivolta *et al*., 2002]. Actualmente, hay descritas 127 mutaciones en este gen [HGMD *Professional* 2010.3]. El gen *USH2A* explica aproximadamente el 8% de los casos de arRP [Hartong *et al*., 2006].

1.3.23. GEN *USH3A* (*USH3A*)

El gen *USH3A* [OMIN 606397], también llamado *CLRN1* (*Clarin* 1) se localiza en 3q21. Está formado por 4 exones y tiene una longitud aproximada de 18kb. Presenta una variante, isoforma b, que tiene un exón adicional [Joensuu *et al*., 2001].

El gen *USH3A* fue identificado por Joensuu *et al*., [2001] mediante la secuenciación de una región crítica para el síndrome de Usher tipo III en el cromosoma tres. La proteína tiene un dominio citosólico N-terminal, dos dominios helicoidales transmembrana y en el extremo C-terminal presenta una región.

Mutaciones en el gen *USH3A* se han asociado a síndrome de Usher tipo III [Joensuu *et al*., 2001], y a formas clínicas similares a Usher tipo I y II [Pennings *et al*., 2003; Aller *et al*., 2004].

1.4. VENTAJAS DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR. TÉCNICAS ACTUALES

El diagnóstico molecular de los pacientes afectados de DR permite proporcionar un pronóstico preciso de la evolución clínica de la enfermedad y un adecuado consejo genético a las familias. Además, la caracterización molecular de los pacientes hace que sea posible su futura inclusión de los mismos en ensayos clínicos basados en terapia génica con el fin de rescatar el daño producido en los fotorreceptores. Sin embargo, debido a la gran heterogeneidad clínica y genética de las distrofias de retina, el diagnóstico molecular es complejo y supone un elevado gasto de tiempo y dinero.

El primer paso para el diagnóstico de las DR es el genotipado. Actualmente se están usando diferentes técnicas como alternativa al análisis de secuenciación estándar para el diagnóstico.

Una de las técnicas empleadas es el uso de *microarrays* de genotipado. Se han diseñado distintos *microarrays* para DR sindrómicas y no sindrómicas (LCA [Zernant *et al*., 2005], enfermedad de Stargardt [Jaakson *et al*., 2003], síndrome de Usher [Cremers *et al*., 2007], etc…) con el fin de identificar la causa genética. Estos *microarrays* están basados en la técnica *APEX* (*Arrayed Primer Extensión*), cuya descripción se detalla en el apartado 3.2.2.3., los cuales contienes mutaciones previamente identificadas en genes conocidos. Diferentes estudios muestran como la capacidad de detección de al menos un alelo mutado mediante el uso del *microarray* depende del tipo de DR a estudiar así como del origen geográfico y etnia de los pacientes; siendo del 47 al 78% para la enfermedad de Stargardt [Jaakson *et al*., 2003; Stenirri *et al*., 2008; Aguirre-Lamban *et al*., 2009], del 28 al 40% para la DCB [Maia Lopes *et al*., 2009; Ernest *et al*., 2009; Kleverin *et al*., 2004; Valverde *et al*., 2007], del 28 al 46% para LCA [Zernant *et al*., 2005; Yzer *et al*., 2006; Vallespín *et al*., 2007; Henderson *et al*., 2007; Simonelli *et al*., 2007], del 45% para USH1 y 26% para USH2 [Cremers *et al*., 2007; Jaijo *et al*., 2010]. Por lo tanto, según los estudio realizados, esta herramienta parece ser una buena elección como primer paso en el diagnóstico de las DR, ya que proporciona rapidez y abarata el estudio.

Otros *microarrays* basados en el análisis de cosegregación han sido diseñados para el estudio de familias afectadas de arRP y LCA [Pomares *et al*., 2010; Pomares *et al*., 2010].

Actualmente se han desarrollado distintas plataformas de secuenciación masiva de ADN. En el caso de las DR estas plataformas se han utilizado para el estudio los exones de los genes previamente descritos [Mandal *et al*., 2005] o bien para el estudio de los genes completos incluyendo las zonas intrónicas y/o promotores [Daiger *et al*., 2010].

Por último cabe destacar como estrategia para la identificación de nuevos genes para las DR el mapeo de homocigosidad. Esta estrategia fue descrita en el año 1987 por Lander y Botstein como método de elección de búsqueda de nuevos genes en enfermedades recesivas a partir de familias consanguíneas. Se partía de la idea de que las regiones adyacentes al *locus* asociado a la enfermedad serían preferencialmente homocigotas por descendencia. Se observó que se obtenía la misma información de ligamiento con un individuo cuyos progenitores eran primos hermanos que, estudiando regiones por ligamiento para una familia no consanguínea formada por tres individuos afectos [Lander & Boststein., 1987].

Las enfermedades recesivas pueden estar causadas por mutaciones en homocigosis o por dos mutaciones en heterocigosis. Las mutaciones en homocigosis se detectan de forma más frecuente en los pacientes cuyos padres son consanguíneos o en aquellos cuyos padres provienen de regiones geográficas aisladas. Sin embargo, la homocigosidad puede presentarse también en pacientes procedentes de familias no consanguíneas. Estudios realizados en distintas poblaciones de pacientes procedentes de la Europa occidental muestran que aproximadamente el 35% del total las familias afectadas de enfermedades con herencia autosómica recesivas presentan mutaciones en homocigosis [Yzer *et al*., 2006; Wissinger *et al*., 2001; Krone *et al*., 2000; Sandoval *et al*., 1999; Roux *et al*., 2006; Littink *et al*., 2010].

En lo últimos años este método ha permitido la identificación de nuevas mutaciones [den Hollander *et al*., 2007; Singh *et al*., 2009; Littink *et al*., 2010] y nuevos *loci* en el campo de las DR [den Hollander *et al*., 2006; Thiadens *et al*., 2009; Bandah-Rozenfeld *et al*., 2010; Li *et al*., 2010], gracias al empleo de nuevas herramientas de análisis de genoma completo como los *microarrays* de SNPs de alto rendimiento.

1.5. POSIBILIDADES TERAPÉUTICAS

Una de las principales características que presentan las DR es que actualmente para la mayoría de los casos no existe tratamiento efectivo. Se han desarrollado distintas estrategias terapéuticas, sin embargo, antes de poder ser aplicadas a humanos es necesario que sean testadas en modelos animales, estudios preclínicos y en humanos mediante ensayos clínicos para poder comprobar la eficacia y seguridad de las mismas.

La aplicación de las distintas estrategias depende del estado de evolución de la enfermedad. La terapia génica y la administración oral de retinoides resulta una buena aproximación para corregir los defectos bioquímicos en aquellos casos en los que algunos fotorreceptores se mantienen intactos estructuralmente.

En los últimos años la terapia génica se ha desarrollado de una forma notable dando lugar al inicio de distintos ensayos clínicos. Para alguna de las formas autosómicas recesivas sería viable el reemplazamiento del gen afectado mediante la introducción de copias sanas mediante la replicación de vectores virales [Bainbridge *et al*., 2008; Smith *et al*., 2009]. Varios estudios realizados para LCA muestran eficacia y seguridad para el tratamiento por terapia génica en pacientes con mutaciones en el gen *RPE65* [Bainbridge *et al*., 2008; Cideciyan *et al*., 2008; Maguirre *at el*., 2008; Cideciyan *et al*., 2010]. Para las formas dominantes en las cuales el alelo mutado puede producir o bien una ganancia de función o bien ejerce un efecto negativo o ambos; la terapia génica va dirigida a obtener el silenciamiento del alelo mutado [Georgiadis *et al*., 2010].

La administración oral de retinoides surge a partir de las evidencias de distintos estudios que [Li *et al*., 1998; Berson *et al*., 1993], sugieren que la administración de la vitamina A es un beneficio para aquellos pacientes afectados de RP. Sin embargo, se ha visto que el suplemento de este compuesto es perjudicial en otras formas genéticas asociadas a mutaciones en el gen *ABCR*. Otros estudios proponen como estrategia terapéutica la degradación de la proteína anómala mediante la administración de chaperonas [Mendes *et al*., 2008] para las formas autonómicas dominantes.

En estadíos más avanzados, el objetivo de la estrategia terapéutica consiste en retrasar o enlentecer la degeneración de los fotorreceptores. Para ello se está trabajando

en distintas estrategias como neuroprotección de los fotorreceptores con distintos factores preservando así su estructura, y en la inhibición de procesos pre- apoptóticos o en la activación de sistemas anti-apoptóticos [Delyfer *et al*., 2004]. El factor de neuroprotección (RdCVF) es una proteína que incrementa la supervivencia de los conos. Estudios animales demuestran que su administración no sólo rescata a los conos sino que además es capaz de preservar su función [Yang *et al*., 2009]. El tratamiento con el factor neurotrófico ciliar, ha mostrado eficacia de neuroprotección en diferentes modelos animales, por lo que ha progresado a ensayos clínicos para estadíos tempranos y avanzados de la enfermedad utilizando células encapsuladas para su administración [MacDonald *et al*., 2007].

Cuando el estado de la RP es muy avanzado quedando pocos o prácticamente ningún fotorreceptor funcional se han descrito dos posibles aproximaciones terapéuticas. Una de ellas tiene el objetivo de regenerar los fotorreceptores perdidos mediante el transplante usando células madre o células precursoras. Las células madre adultas aisladas del EPR pueden diferenciarse en todos los tipos de células retinianas. Estudios en animales han demostrado que estas células pueden repoblar la retina dañada y responder al estímulo luminoso [Mooney *et al*., 2008]. Diferentes ensayos clínicos se están llevando a cabo mediante el uso de tejido procedente retina fetal humana, EPR y células madre. Los resultados preeliminares muestran mejora en la visión. Además se está desarrollando una terapia celular no invasiva para rescatar la visión mediante el uso de células madre pluripotentes mesenquimales de hueso en animales donde se observa preservación de los fotorreceptores y de la función visual [Wang *et al*., 2010]. La otra aproximación consiste en la creación de señales eléctricas que sustituyan la entrada de las mismas a través de los fotorreceptores. Esta idea se está desarrollando mediante los implantes eléctricos en al retina. Actualmente se están desarrollando distintos ensayos clínicos.

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Profundizar en las bases genéticas y moleculares, de los casos familiares y esporádicos, de RP juvenil y RP típica, identificando y caracterizando las mutaciones y genes responsables, utilizando un abordaje metodológico múltiple que incluya la aplicación de distintas técnicas con el fin de agilizar y optimizar el diagnóstico genético en las DR en población española.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar una metodología específica para el diagnóstico molecular de rutina en RP típica y RP juvenil en población española.

2. Estudiar el papel etiológico de las mutaciones en los genes responsables en los casos de RP típica y RP juvenil en España para conocer las similitudes y diferencias entre los grupos de pacientes.

3. Realizar un análisis epidemiológico molecular en pacientes españoles afectados de RP típica y RP juvenil.

4. Identificar nuevas mutaciones, regiones y/o genes implicados en retinosis pigmentaria mediante localización de regiones de homocigosidad.

5. Establecer la correlación genotipo-fenotipo.

PACIENTES Y MÉTODOS

3.1. PACIENTES

3.1.1. FAMILIAS EN ESTUDIO

Se incluyeron en el estudio aquellas familias que cumplían los criterios que se describen a continuación. Todos los miembros de cada una de las familias que formaron parte del estudio comprendieron y firmaron el Consentimiento Informado adjunto en el Anexo I.

Criterio Clínico

Se incluyeron todas las familias en las que algún miembro presentaba los signos clínicos de RP establecidos internacionalmente en 1982 [Marmor *et al.,* 1983]: bilateralidad y simetría, ceguera nocturna, pérdida de visión periférica, electrorretinograma escotópico alterado y alteración de los conos en estadíos avanzados. Se clasificaron en base a la edad de inicio en dos grupos:

- Retinosis Pigmentaria juvenil: familias con pacientes cuyos primeros síntomas aparecieron antes de los 10 años de edad.
- Retinosis Pigmentaria típica: familias con pacientes cuyos primeros síntomas aparecieron después de los 10 años de edad.

Criterio genético

Se incluyeron las familias que presentaron un modelo de herencia autosómico recesivo o esporádico:

- Retinosis Pigmentaria autosómica recesiva (arRP): aquellas familias con más de un afecto en una misma fratría cuyos progenitores no presentaron la enfermedad.
- Retinosis Pigmentaria esporádica (sRP): aquellas familias con un solo individuo afectado sin antecedentes familiares.

Las familias también se clasificaron en consanguíneas y no consanguíneas, considerándose familias consanguíneas aquellas en las que los progenitores del paciente(s) presentaban un parentesco de hasta tercer grado.

Se han estudiado un total de 281 familias españolas no emparentadas. Las familias se clasificaron en base a criterio clínico y genético teniendo en cuenta la consanguinidad en cada caso (Tabla 3.1).

Clasificación Clínica	Nº familias	Total	Clasificación genética	Nº familias	Total
RP juvenil	29*	89	arRP	37*	115
	60			78	
RP típica	38*	192	sRP	30*	166
	154			136	
Total		281			281

Tabla 3.1. Clasificación de las familias estudiadas. * Familias consanguíneas.

La estructura de cada una de las familias estudiadas agrupadas según clasificación clínica se detalla en el Anexo II.

3.1.2. INDIVIDUOS CONTROL

Con el fin de determinar la frecuencia de las mutaciones encontradas en población control en este trabajo, se utilizó ADN obtenido de sangre periférica de 50 donantes españoles del Banco de Sangre de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid. Todos los individuos comprendieron y firmaron el Consentimiento Informado adjunto en el Anexo I.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN de los pacientes, sus familiares y los controles fue extraído a partir de una muestra de sangre periférica recogida en tubos con EDTA y células de la mucosa bucal, mediante el uso de un extractor automático de ADN (*Model BioRobot EZ1*; *QIAGEN*, Hilden, Germany), siguiendo las recomendaciones y los protocolos de la casa comercial.

3.2.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DIRECTO

En este apartado se detallan las técnicas empleadas para el estudio directo. El estudio directo es aquél que nos permite detectar cambios concretos en la secuencia de ADN, es decir, nos permite genotipar la muestra problema.

3.2.2.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular que fue desarrollada por Kary Mullis en 1985 [Mullis *et al.,* 1986]. Esta técnica permite producir en el laboratorio millones de copias de un fragmento de ADN específico. Está basada en la actividad de la enzima ADN polimerasa (*Taq* polimerasa) que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a partir de otra ya existente (ADN molde), por lo que sus requerimientos son: el ADN molde, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), dos cebadores (pequeñas cadenas de ADN) complementarios a la molécula que queremos copiar, un tampón de reacción que mantiene el pH adecuado, iones de magnesio (Mg^{2+}) en forma de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) necesarios para la actuación del enzima y la ADN polimerasa.

La PCR se desarrolla en tres pasos. El primero es la separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar, para lo cual se somete al ADN a altas temperaturas. Cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su complementaria. A continuación, se disminuye la temperatura para que cada cebador se una a su región específica dentro de la cadena de ADN. El último paso consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la *Taq* polimerasa.

Una variante de la PCR convencional es la PCR *touchdown*. Su finalidad es reducir el fondo no específico bajando gradualmente la temperatura de hibridación a lo largo del progreso de la PCR.

Las condiciones generales y los cebadores para la amplificación por PCR empleadas en este estudio se muestran en la tabla 3.2. Las condiciones específicas de temperatura de "anillamiento" y los cebadores utilizados para la amplificación de los genes se detallan en las tablas 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20 y 3.21.

Agua	Buffer 10x	dNTPs	Cebadores	ADN	Enzima
15,25µl	2.5µl	3µl	3µl	1µl	0,25µl
	2mM MgCl2	1,25mM	5pmol/µl	100ng/µl	
Braun	*Roche*	Invitrogen	Pacisa-Giralt	---	*FastStart Taq Roche*

95º 5'
95º 30''
An 20''
74º 50''
35 ciclos
74º 5'
4º ∞

Tabla 3.2. Condiciones de la PCR. Volumen final 25 µl. Cebadores 1,5 µl F: *Forward* y 1,5 µl R: *Reverse*. An: Temperatura de "anillamiento".

Diseño de los cebadores

El diseño de los cebadores se llevó a cabo mediante la utilización del programa *Primer3* (v.0.4.0) siguiendo las recomendaciones siguientes: tamaño del producto resultante menor de 500 pb, tamaño del cebador inferior a 22pb, máxima temperatura de "anillamiento" aceptada 60ºC, mínima 58ºC y óptima 59ºC, con una diferencia de temperaturas entre ambos cebadores de 1ºC. Porcentaje de GC en la secuencia del cebador un mínimo del 40%, máximo del 60%, siendo óptimo el 50%. Presencia de bases C o G en el extremo 3':1.

Gen *CERKL*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
5	GAAGAATGCTGGGATGGAAACAGAC	GTTGTGCTGTCTAGATTGC	55

Tabla 3.3. Cebadores exón 5 del gen *CERKL* [Tuson *et al.*, 2004]. Ta Temperatura de "anillamiento".

Gen *CLRN1*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
0	CAGAAAAGGAGAAAAGCCAAG	CTGGGAAGAGTCTGCCTAAA	62
2	TCAGAAGGATTTTAGTGATGTTTGA	TCTTTTTGACATATTGAAAAGCACA	58
3a	ATGTCAATGGGGATGATGGT	GGAGCCCATTCAGAAAATGA	58
3b	TTCCCCTGAATTACCCATCA	AGCATCTGGAAACTCGGTGT	60

Tabla 3.4. Cebadores del gen *CLRN1* [Adato *et al.*, 2002]. Ta Temperatura de "anillamiento".

Gen *CNGA1*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
1	AGTGCGGCTCCCATAATCCC	ATACATTACAAAGTTCAAGGTTAC	55
2	CATCAACCAATGCATCAAACAATAGGA	AGCAGAGGCATTTGCCGAGC	55
3	CATGCTTCATGGAGGCTCAGG	CATTGGCTCAAACTGGAAAGGAGT	55
4-5	CCTCCAGTAAGAGACCAGATGGGTT	AGACATTTAGTCTTTACACAGGG	55
4-5-6	CCTCCAGTAAGAGACCAGATGGGTT	GCATCCCAGTACTGCAGACCCA	55
6	CATTTCATTAATTGTGGTTGATGGG	GCATCCCAGTACTGCAGACCCA	55
7	TCGAAATCCAACCACTCAGGGA	TTCCTCTCGCCTGGCACAAA	55
8a	GCAGCCTCAAACTCCCAGGC	TCTCAGAGAGGGTGTGGGCCT	55
8b	TCGTCATCATTATCCACTGGAATGC	TCTCAGAGAGGGTGTGGGCCT	55

Tabla 3.5. Cebadores del gen *CNGA1*. Ta Temperatura de "anillamiento".

Gen *CNGB1*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta ºC)
2	TAAGAGTGGCCCATAAGTGG	AGAAAGTCCCTGGAGAGCAG	58
3-4	ATCCCTTGAGGGAGAATCAG	AATGACAGCAGAGCTAAGGG	52
5-6	CTCAGGGACAGAGACTCACC	GGGTCAGTCAGGTGAGAAG	58
7	CTTTGAACCTGGGGTTGAG	ACACCCTGAGGTGGTAACAG	58
8-9	CGAGGTGGGCTGTTAGTG	CCAGTTGATCCCTGAGCC	60
10	TGTTAGCGACTCGAATCTGG	GGAGGTTGGGTGTTAGGC	58
11	AGGCTTGTTTTCTGCCTTG	CTCCTCCTTACCCAAGTTCC	58
12	TAGAAGGTGTGGCTGAAACG	ACAGTCAGACCCAAGGACAC	59
13	GACTAAGCACTGAGGCACTG	CTGCTCTGTGCCTTTTCATC	58
14	TTGGTTGGAAAGTCCAGGTC	CAAAGCCCAGCCTTACACAG	52
15	CTTGGGCATCTCTGTACCC	TCTTACCAGCCAAAACTCCC	58
16	ATGTGGACTTCTGAAGGCAG	GAGATGGAGGGAGAGGAGG	58
17	AAGCTATCAGAGTCCCCTCC	TTTAGTCCAGCTGCTTCTCC	58
18	CCTCCAGGCAAATGAGGAC	AGTCTGCCTTGCGGTAGAAG	52
19	GTCAGAAGGTGGGACACAG	GAGTTGACAGGGAACTTTGG	58
20	AGTTGGGACCCTTCTCTCTG	TCTTGAATCCCCTGACCC	58
21	TGCCACATGTAGTAGTTGAAGG	ATCTATGACAGCATCAGGGG	58
22	GGAAGTTTCACAATTGCTCC	ACATCTCATGAACGCCCC	58
23	AGAGACTCCGCCTCTCACTC	AGACACGAAGATGCCAGTG	58
24	GCAGGAAGAGCCCTGAGTC	TGTATTGCGTGTGTTGTGTG	58
25	GCTCTCACTGTCCAGGTGTC	TCCTTCCTGGAGTCTCTGTG	58
26	TGCACAACATGCATCTATCAG	ACATTTCTGGCAACAGTGG	58
27	AAGTGACACATCCCAAATCC	CCTCAGAGACACAGAGGACG	58
28-29	TGGTGAGCCAGTAGGTGG	CAGCTCAGTTCCTTGAAAGC	58
30	AGTGCCTAGGTTCCTCCTTG	GCATCTACCAAGCCGTAGAC	58
31	GTCTACGGCTTGGTAGATGC	TGAACCTAGGAGGTTGAGACTG	58
32	AATCACCAGCCAAAATCACC	GAGGGGGAAGACCCTAAAAC	58
33	GTCCAAAAAGGCTGGAACAG	ATCTTCTCTTGAGCCGTGG	58

Tabla 3.6. Cebadores del gen *CNGB1*. Fragmentos 3-4, 14, 18 y 32: 3mM de $MgCl_2$. Fragmentos 3-4, 14 y 32 añadir 10% W1 (*Roche*). Ta Temperatura de "anillamiento".

Gen *CRB1*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
1	CAGCAACACACCAGAGGATG	ATAATACGCCAGAACTAAACCAG	55
2a	GGTTGAGGCAGCACAAAGGTC	CAGGAGTTCTTGCCAACGG	60
2b	GTACAGTGGGACAATCTGTG	CCAAGTCGCAGTGTCTGCC	60
2c	GATGGAATTGATGGTTACTCC	TCACCTCTGCCTCTGCCAC	60
3a	GCTCTGGTAAACAAAGCATTG	GAATCCAGGGGCACAGTCG	60
3b	GACGAATGTTGGTCCCAGC	CAGAGTGGTAAAAATAGTTCATG	60
4	GAAACAGTATAAAGATATCTGATC	GCTATAAGCGATATGTGTATTC	55
5	CAACGTGATAGATCGATGCC	CACAGCTCTTCCTGCTAATAC	55
6a	ACAAGTAAATTACGTGAAACTTC	AGTGAGGGATGCATGTTCC	60
6b	ATTCTCCTGGGCTGTACC	GCTATGTTACAAACTGAGCC	60
6c	GCGATGGCTTCCTGTGGG	TGCCACTCTCCATCGCTGG	60
6d	CAGGTCAATAATCAGTCAAAGG	CAAACGAAGGTGTGGATGGC	60
6e	ACCAGTGGGAATGACCAGC	CTGTGGCAGTCACACTGG	60
6f	CAACCTTGTCAAAGCAGAGG	CTCTGAGGCATGGCACTCC	60
7a	TTCTCCTCCTCCTCTATTTTG	ACACGGATATATTGATAAGTGC	60
7b	CTCCATGTTTGTCCGAACGC	TCTTGCTTGTCAGGTAGGC	60
7c	TCAGTCTTCACAAAACCTAGG	ATAAAGTAAAAGTTTAGCATACAG	60
8	CAACATTTTTCTATTTAGTTGCC	CTCAAATGTCGCAACTTAACTG	60
9a	AATGATCATTACTATTAATAACGG	GTGCCATCATTCACTGACTG	55
9b	GTGGCAACAGCTTTTATATGC	CATGAACATTTTCAAAGTAAGAG	60
9c	ATATAAAGGGCCTGCAAGGG	GCTGCAACTCTGTCAGAGC	60
9d	GAACTCAACATCGATGAATGC	CAGTGATGCAGAGTATAGCTTC	60
10	CTTGAATGAGATGAACAAGATG	GAGGAGAAGATGAACTTTGAG	60
11a	ACCAATGTATTCAACAGGGACC	TTACGTCCACCTCGCAGC	60
11b	TCTGTGCCAGGACTTACTC	CAGAGATCTAAAATGAATCAAG	60
12	GCCTTTGCTATAGAATTCGC	AGTACAGTCATCACATTCACA	60

Tabla 3.7. Cebadores del gen *CRB1* [Hanein *et al*., 2004]. Ta Temperatura de "anillamiento".

Gen *EYS*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
1	TTATGTCAGCCTGCACATGG	GTAGTTGTGTTCAGCTAGGC	*
2	AGCTAAAGGCAGGATACTGG	ATGGAAAGCAGGGAATGAGG	TD62
3	GAAGACTCATTCTAGGTTAGTC	CACTGCAAAGATAGTGTCACC	55
4a	CTTAAAACACCATTTTGCAGC	ATGTGTCCCAACACTCAGCC	TD54
4b	ACTTCTACAGAGATTGCTGG	AGATTCCTGGCAGAACTGC	59
4c	GTGGTCCATCACCTTGTCC	TAGAGACGGGGTTTCACCG	*
5	AGAATTGAGGGAAAACTGATGG	CATAAAAGAGTTCAGTATATATACC	59
6	TCTATGCTCATTTCTTCTTTCCTTC	AAAATAAGTAGACCGTTCTTGTTCG	TD54
7	TTCTCCAGGTAAGAACCCATTC	TTAAGTAAAAGTTAGGGTTAAAACCAG	TD54
8	TTGGAATAATGTTAATAGGCTTTTC	TGGCTAAGATTAATAAGAGCATTTG	TD54
9	GGCTTTTGAACATGGATATGAC	AGATTTCCTAGGATGTAGTTGGTG	TD54
10	GGAACTTATTTTGTGGCAGATG	GACTGTTGAGAATTTGTTTACGAAG	TD54
11	GGTTTCATCTTAGTAGACAGAGAGGC	CATTGTTACCATGAAACAGTTCG	TD54
12	TGCACCCCACAACTATCTTC	AATTGCCCAAAGAAGCAATC	59
13	TTCAGATGTCATCCTAAGTGG	CAGACAAGAGACAGAAGTGC	59
14	GGATATTTTCATTGTTGCTTTGC	TGAATCCAATAAGTGAACAGTTTG	59
15	GAGATATCAAAATGGCCAGGAG	ATCCCAAGGACACTGAGCAC	59
16	CACCACATACTATTAGTTCAAG	ATTTTAGGAGGCCATCATCC	58
17-18	ATTCTTTAGACTACCACTGATTC	ACATAATGAGCACATGTGTGC	*
19	AGCAGAACAAAATTTTGCAAGG	CATCTGGCAGATTATTTCAGG	58
20	AGAGAGGTCTTCATTTCTTGG	AGCTCTTGTTTTATGAAAGAGC	59
21	AAACCCAGGAATAAACTCTGC	GGAAGAAATGACTCTGAAACC	59
22	GTCAAACAAGTTTGCACATCAG	GAAAGCAAAACATGGGAGTG	59
23	AACTCATTGTCACCCCAAGG	TCCTGATGAAAGCCTAAGTGC	59
24	AATGGCACCACGGATAAGAG	GAGGAATGCCGAGAAAAGTG	59
25	GAGCTATCCAATATGTCTATGG	GCAGAAAATATGCTTTTACCAC	59
26a	TTATCCCAGTGCCAAAGTGG	AGTAATGACTGCCTGTTTAGC	59
26b	ACTGTTGCTTTATCTGCTACC	GAACATGTTGCACATGTTTGG	59
26c	TACTGAGGCTTCAAGCAACC	CCCATAGTTATGCCATATTGTC	59
26d	ATCCATTGTCCCTTCACAAAC	TACAGACATGGAGGAAGACG	59
26e	GATTTTTCAGAAGTCACCACC	CTGATTACAATGAGGCTGTTC	59
27	AAAGAGGCAGGAAAGAGACG	AGGAAGAGACATCCTGGTGG	59
28	ACTTCATGTCTCTCCAAAGTG	ATTGTTAGGGATAGCCTTTGC	59
29	TGCTTCTGGCTTTGTTTTATTG	TGGAAAAACAGACTGACATTGG	59
30	TGCATACCCTGACCAGTTTG	CGTAGGAATGTGAAGCAAAAAC	59
31	GTTAAACCTTGATCAGTATTGG	ACAGCTGTTTCTTGTTTGTGC	59

Gen *EYS*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
32	TGCTTCATGCACTGGTCTGG	GTGTTACCTTTTCAAATGAATGC	59
33	CTAATAGCACTCCTACCAACC	TCTGTAGTCCCAACTACTTGG	59
34	CTTGAAAATGTCCACACTTGG	TTTCTGGTGCTTTGTTGAGAG	*
35	AACTAGCCAACAATAGCAACC	CTCTCAGAGGACAATACTGC	59
36	AGTGGAAAGCACACAGCTAC	TTGATCAGTCAAGTGCTATCC	59
37	TTAGTTGCTCAATGCTGAAGG	CAATTAGAGTGTCCCTGAGG	59
38	CAGCCAGTTGCACATATACC	GTGAACTTCGTGGATGTAGG	59
39	AGCAGAGAATTGAGTGGTATC	GAAAGCAATCCATATAGCTGG	59
40	TCTCTGCGCATTTCTGTATTC	ATGTGCATCTGTTTGTGTTCC	59
41	AAATTGACAAGTTAGCATCAGG	AAGTACTAGTCTATCTGTGAAG	59
42	GAACTGCAGGACAGATGTAC	CCTAATTCTAAGCTCCAATCC	59
43	TTGATGTACTCACCTACAAGC	ACGCATACACTTGCAGTGAC	59
44a-b	CACAATTGTGCTCAAGATCTG	TACATTTGAGCCACCTTTTGC	59
44c-d	TGAACCTGTAGGTTTTCAAGG	TGAACTGGAGGTTTCTCATTC	59

Tabla 3.8. Cebadores del gen *EYS* [Collin *et al.*, 2008]. Ta Temperatura de "anillamiento" Todos los fragmentos: 3mM de $MgCl_2$, a excepción de fragmentos 16 y 19: 2mM $MgCl_2$. Fragmentos 1, 3 y 18 añadir 10% W1 (*Roche*). TD: PCR Touchdown. * Programa modificado.

95º 5'
95º 20''
68º 45''
Disminuir cada ciclo 0,5º — 28 ciclos
72º 45''
95º 20''
54º 45'' — 14 ciclos
72º 2' 45''
72º 5'
4º ∞

Gen *LCA5*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
1	CAATGGGAGCTCGGGTAG	TCCCTGCTTTAAGAACCACC	58
2	TCCTAGGAGTGGTCTCATTTCC	TCTGTTCTCGCATTACTGAGG	58
3	TGTGGAGAAAATAGATTGCACAG	CCTATAAAACGTAAATCAGCCCAC	58
4a	ACGGACCCACTTGTGTTAGG	GTTGCCCGTTCTTTCTCTTG	58
4b	AGGTCAAGTTAGCTGAGCTGC	TCCAAGCAAATACCAAACTGC	TD58
5	TTGGTAAATCTGTTTCCCAGC	TTATACCAACAAACCTTTTCTAAGTG	58
6	TGACAAAGTGAGGGGTTTTG	TCAATGAGGTTCTTTTCCTTCC	58
7	CCAAGCTGAGCAAAACATGC	TTAGGTATATCTCCTAAAAGCCAAAG	58
8	TCTGTGTTGCTTAGTTCCCC	TTTCTTTCTCAAGGGATGCTG	TD58
9a	AAATATGGTGGTTTTATGAAAGTTG	TTTTGACTAAATGGATTTGACCTC	58
9b	GAAGCCCCAAAACATACAGG	TTGGCAAACTATCTATGTGGTG	58

Tabla 3.9. Cebadores del gen *LCA5* [Den Hollander *et al.*, 2007]. Ta Temperatura de "anillamiento". Todos los fragmentos: 3mM de $MgCl_2$. TD: PCR Touchdown.

Gen *LRAT*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
1	CTTATCCGTCTCAATCCCCA	ACCCTTGCCTGGCTTCCTCTCTGC	56
2a	ACCTCTCCAAGACGCCCT	AGATGCCATAGTGGGTCAGG	60
2b	ACCAGCTCTTTCCACCGAG	GTAGGCGAAGTCCTCCACTG	54
2c	TATTGTCAAAGTGGCCAGCA	GAAGTGCTCGCAGTTGTTCC	54
2d	AAAAGCTGCTGGGCTTTACC	GGGAAGAGAAAAGGTCAGGG	60
3	TCTTCTTGGGTTTAGCCACC	TTTACATACAGAATACACACACTGACA	60

Tabla 3.10. Cebadores del gen *LRAT*. Ta Temperatura de "anillamiento".

Gen *MERTK*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
1	GCCACTCGGCACTCACTG	GTCAGTGGACGGTAGGTTCG	62
2	TTATCTTTTCCTGGGGCACA	TGAACTCAGGAGGTGGAGGT	57
3	GGTTTGACCAAACAACTGCG	TGCAAGGTTTGCATACAGAGTT	60
4	CAGAGCAAGACTCCATCCCC	GGTCCCATAACTTTGCTGCC	60
5	TACCTTGCTCTTGGTGCCTT	TTTCAGAGGGGAACCCTGAC	56
6	AGACTTCTTTGGCCCATCCA	CATGCTGGACACTGAAGCAG	60
7	GTCCGAGGGCATGAGTAACA	CGCCTCAATAATTTTCTCCTCCA	60
8	GCTTCAGTAACCTAAAAGGGCT	AAGGTGCCTTGCCTAACTCA	60
9	TGGCCTGAGTGACAAAGGAA	CTATGTTGCCCATTGCCCAG	60
10	TCTTCGCATGGTCTCAGCTT	AGCCCAGGGTATGCATAAGG	60
11	GCCACTGGGAGCTTATCTGT	GCATGGCAATGTCTGGCTAT	60
12	AAGGTTGCACCATTGCACTC	AGGACCTGTATGTGCTAGGC	60
13	ATGAGCAAAGGTAGGCCCAA	GACCAGTGTTCCACATTGCC	60
14	ACCACTCATCTGTTTCCTGTCTC	TGAGCCTATCAGCGTCCAG	62
15	AACTTGGTAACACACGGCTTC	TCCTCTCCTTCCTGGCTTC	62
16	GCAATGCGTGTGCTCTGTC	CTGCAGCTTCCTTGCCTATCT	60
17	TCCTCACTTGCTCTGCCATT	GCTGCCAACCCTCAGTTTATC	60
18	CTCCAACCCCACGTTATTGC	CCACATCAGGAATGGCTCCT	62
19a	CGCCGCCATATAAAGAAAG	AATGCCAAGAATGGTCAGAG	60
19b	CGCCGCCATATAAAGAAAG	GGGCCATGGAGTTCACTT	60

Tabla 3.11. Cebadores del gen *MERTK*. Ta Temperatura de "anillamiento". Fragmentos 14, 15 y 18 añadir 1M Betaína (*Sigma*). Fragmentos 1, 2, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 se aumenta a 40 ciclos.

Gen *PCDH21*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
1	GGCAGGAGCAGATCCGAGCCGTG	GTCCCACTCTGGAAGTGGTCCAGG	68
2	GCTGGTGCGAAGCTCCCTCCTGG	GCCAGACTTAAGTCGCCATGGCAG	68
3	GCCAGCAATGAGCACCAAGTTCAGG	CCAATGTGCTCCAGGGGAACTTCAG	68
4	GCATGCTGTCACCACCACTTACCC	GGGAGGAATCGTGCCAGCCTCACC	68
5	GGCAGAGACGTGTACATTGGAGTG	GGTTCTCCACAGGGCAGTGAGCC	68
6	CCTTGAGCACATCCCCCAGCC	GAATCATAGAGGCACCGACCTAAGG	64
7	GCTGAGTGCTCTGAAGTAGGAAC	CCCTGTAGAACCTAACTTGGTTC	64
8	GCTGGCCTCACAGCCATAGGTGGC	CTGAGGCTGGGTGAGTCCAGAGC	68
9	CCTACTGGTGAGAAAGAAGCAGGG	GCTCTGGTCACCTAGAGAGTC	64
10	GAAGACTTCCCTAGGCAATGCAGG	CATGTCTGGTGCAGGTGCTC	64
11	GCCAGGACACACTCAAACGGAGG	GCAGACCCACTTAGCTTTGGGACC	68
12	CCAGGGTTAAGGGCACGTGAAGAC	GGCTGGATCTGTGAGCAATCTGC	64
13	GGCAGCTGCGAGGAAGATCG	CTGCCACTCAAACTGCAATGACC	64
14	CACCTCACAGGACAGTAATGAGG	CCACAGACCTCCTCCACCCTCAGC	64
15	GGACACTTTGGAGGAGCTGCATGAC	GCCTCAGTATCTCTTGGAGCTGC	64
16	GTAAGACCTACGTAAACCCTGGC	GGCACAGGCTGCCTTTGATAACG	64
17a	* GTGCCTATCAGATTCTCAAAGGGAC	*CGCCACGCTGGGTGGTGG	64
17b	*GACAGTGGGGATTATACCATTGTGC	*ATGGCGACCCTGGAAAAGCTGA	64

Tabla 3.12. Cebadores del gen *PCDH21* [Bolz *et al*., 2008]. * Modificados.

Gen *PDE6A*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
1a	CCCACAGCATCTGGAACAC	CCTGCAGGAGGAAGCACA	60
1b	CTACAACCTCCACTACCGGG	ACCTGTACCCCAGAACTCCA	60
2	TCATCTCTGATTTCCCTGCC	CTGACTCCAAAGCCCAATGT	60
3	CTAGGATCCATCTGCCCAAA	TAGGCACCTTCATTCCCATC	60
4	AAACTGTCAACCAAAGCAAAAA	GCAATTGAATGTGTGCCAAG	60
5	GACAGGCCCAGTTCATCAAT	GGGTTTACTGTGCCTTGCAT	60
6	GTTGGAACCCTGACTCTGCT	CCAATTCCAGAATCACCGAT	60
7	CCAACATTTTGGGTTTGGTC	GAGATCCACACTTGCCATCA	60
8	CCTTGGACAAGAACATGGTG	CCCAGTTAACTCTGTCCCCA	60
9	CTCTTGCCACCTCCTCTCAG	GCCACCATGCTCAGCTTAAT	60
10	GGCAGCACACAGCTTATCAA	ATGGAGTTGCAAGTTTTGCC	60
11	TTGAGCTGGTGGTTCTGTTG	GCTCCGCTTGCTGTATAAGG	60
12	TCTGATCCTTCCAGCAGACC	ACCCACTGCAAGAAACCAAC	60
13	CAAGCTCTCACCTCCTGGTC	CAACGCTGTTGCTACCATGT	60
14	GGGACTTTCCCCATTCTAGC	CCACAAGACTTCCCTGTTGG	60
15	GCCCAGTGCTAATGTCCCTA	GAGAAGCGAGATGGGAGAGA	60
16	TTACTGCCAGCATCAATTCT	TTAGAATGAGAAGATATACC	60
17	TCCATCTGAATCAGCCAATG	TGCAATTGGAATTTGGCATA	60
18	TGATCACTGACAGAGGCAGG	CACCCTCACTTTTGCTGTCA	60
19	TGACAGCAAAAGTGAGGGTG	GGGTAGACCTAGGGTGAGGC	58
20	TGCAAAATGCTCATCAGGTC	CACTGGTCACCTGCTAGGGT	60
21	TTCCAGTGTTGGACGTTTCC	CACACACAGAATGGGGACAG	60
22	CCTCTTGTCACCTGGTGTGTT	GCCACTGGATAAGGTATAAGCC	60

Tabla 3.13. Cebadores del gen *PDE6A.* Ta Temperatura de "anillamiento". Fragmento 2: 0,2µl GC-RICH (*Roche*), fragmento 16: 45" de desnaturalización y 0,4µl de enzima y fragmento 19: 10% GC-RICH (*Roche*).

Gen *PDE6B*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
4	CCCTGCTGCTGTGGTCAGACCGGCG	AGAGAAGAGGTGAGGGTGGGGCGGT	68

Tabla 3.14. Cebadores exón 4 del gen *PDE6B*. Ta Temperatura de "anillamiento".

Gen *PDE6C*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
1	CAGGTAGTGCTCTGAAGGTCG	CTTTCCCATTTGTTCCTCCC	58
2-3	GAGCCCTGGTTATCTGTTGG	GGAGGAATAGGAGGGGTCTG	60
4	TGTGGTGAATGCTCTATCTCTCC	TCACATTTCCTGTGGTGTGTG	60
5	TGGGAATTGTAGATCTTTCAGC	AGTGCTCTATGCACTGTGGC	60
6-7	CCCCACCCCAAAAGCTG	TTGGATGCATTCTTGCTTTC	58
8	GGATCAAGAGGGCTCCACTAC	AGCATCCACTCCTCTACCCC	58
9	CCATCATTACCATTGTGTGAAAC	TGACTCATGTCTTAATGGCCC	58
10	CAGATTGTTGCCTCCAAACC	ATTTGCATTTGTCAGACCCC	58
11	ATCTTCCAACTCCTGGGCTC	AAGAAAAGCAGGGAATCAAAAG	58
12-13	TTGGCTATGGGAGTGGAAAG	TTCTCATCATGCTCAAATGG	60
14	GCAGGCTGCACTTGGTATAGAG	CTCACCCTAAGTACTTTCCAATG	58
15	CACAGATAATTGAGTGAGGAGGG	TGTGGGTTAGTGCTTTGATCC	58
16	GCATAGTTTCATTTGTTCAGAGG	TATGGAAGGTAAAACCACACAGAG	60
17-18	TCACAATGCAAAGTGGGAAC	GGTTGCCTGAGATCTTTAGGTG	58
19	ACTCGATCCTTAAATGTCACTTG	CCGGCCTGTCCTGATAAC	58
20	GGATTTATTTCTCTTTCTAGCC	CCTCAAACTGCTTTGGAGAAAC	58
21	TTCCTTACAGCTCACTCTCTGC	GCTCAGCCTAGCTTCTGGC	58
22	CAGGAGCCACTGCACCTAAC	GAACTTTATTTTGCCCCTGG	60

Tabla 3.15. Cebadores exón 4 del gen *PDE6C* [Thiadens *et al.*, 2009]. Ta Temperatura de "anillamiento".

Gen *RDH12*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
1	CAGGAACCTGAGCCAGAGC	TTTCTCCTCTGTCAGCCTCC	60
2	CGTATCTTAGTGTGAGCTCG	GAATTTCTAGTCAGAGCCCC	60
3	CCAGTCCCAAGCTCACTTAC	AGGGTGGAGCAGCCACTC	60
4	ATTATGCAGGTCTGTTACAG	CTCCACATTTACACAGTGTC	60
5	TCCTCTTGGCTCCCACATGC	CCCAAGTTGCTGTGGACCTC	60
6	TGTGTATTTTGCTGCAGGAG	GATGAACAGCCCAGCGAG	60
7	GGGACCATAAAGATTTCCAG	GATCAGAGCAGGCAGGATTC	60

Tabla 3.16. Cebadores del gen *RDH12* [Hanein *et al*., 2004]. Ta Temperatura de "anillamiento".

Gen *RGR*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
1	TGCTCCCCTCCCCTGGTTATGCAAC	ACCCTTGCCTGGCTTCCTCTCTGC	68
2	TGCCTGGTGTGTGCTAAGTGCCTGG	CCTGTCTTCCAGAAATCAGCTGTCGTTC	68
3	GAGAGTGTGCATTGGGCTCCACC	CAAGGTTGCGGTAATGGCAAGAGAGG	68
4	CCTTCTGGCAGGATGTAGTGGCTC	GAGGTGGTGCGGCTTGGTGACTG	68
5	GGGACAAACAGGAAAGCAGGGCTG	GATTGGTCCACCCTCCCCTCTCTG	68
6	TCCAGCCACGTTGGGTATTGTCAG	CATCTGGCTGGCTGTCCCTGTC	68
7	TCCGTGAGCCATGCATCTCCACC	TGACCGACACTCAGGTCCATCTGG	68

Tabla 3.17. Cebadores del gen *RGR*. Ta Temperatura de "anillamiento".

Gen *RP1*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
2_1	TGCATTAGTATTACCATGTATTCGC	TGTCCAGGTCTACAGGCTGC	58
2_2	GGCAGGCACAGCATCAC	CACCATTCATATCCCACACG	55
3	TCAAGCCTAGGAGGTTGTTG	TTTGCCGTCCTTGAGGC	55
4_1	TTTGCTGCCTCTTCCTTTG	ACTGCTTCGCTCCATAGGTG	58
4_2	AAGTTCGATTCAGAATAAAAGAGG	TGTTAGATACTGATGACATTTTACTGC	58
4_3	CTGTGATTGGCAGTGTGACC	TGCATCTGCTGAAATAGGACTG	60
4_4	GATGTAGTTGATTGTGTGGTATTGG	TTCCTCACAAAGTATCCCTCC	58
4_5	CAGCAAGCAATAAATTCCAGG	CACTTCTGCTTGAGATTGCG	58
4_6	GAAATCGGTCAAAGAGATAAAGTG	TGTATGGGGATCATTCCCTG	58
4_7	CAAAATTATATACAGAGTTGGTTGCAG	TCTAGCTAGGTTTATTTCCTGGTAAAC	58
4_8	TTCCCCTGCATGAACACTG	TGCTTTAGAATCTCCAACAATG	58
4_9	TCTAGCTTGGCTCTTGGTGC	TCTGATCCACACCATAACCATC	58
4_10	CCCTGAAGTCTGTGTTTTGG	GCTTAAATTACTGACATTTTGATGTG	58
4_11	ACGTTCCTGTCAATGTCTGC	TGGTGTTGCCAGCCTCTTAC	58
4_12	CATTTCAGAATTGGAATCTTTTG	CTCTTGGGTAAGTTCGCCAC	60
4_13	TGCATCAAAAGTCCAGTGAC	TCCTCTATGTCTGTGAGGATTCTG	58
4_14	CAGGAATTCCAGGAGGAAAG	CAGGTTTCATTGCGAACATC	58
4_15	GGAACTGACTCAACCCCTTG	TTTGTCTGTCTGAAGTAAATATGGG	58
4_16	CAACATTGCCCAATACTAACTG	TGCTTTAAAGATTTCATTTGTCTG	58
4_17	TTGGGGTTAGAGGAAGAAGG	GAAAGTCAAACTGGTTATCCAAGG	58

Tabla 3.18. Cebadores del gen *RP1*. Ta Temperatura de “anillamiento”.

Gen *RPE65*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
1	AGAGCTGAAAGCAACTTCTG	CCCATACTCAAGACTGCTTC	55
2	CTCTATCTCTGCGGACTTTG	AGCGTTTTTCTGCATTAGAG	55
3	GCTGCTGATATACTCTGCC	TTCCATGATAATGTTCCCTC	55
4-5	ATGAGGACACATAGAATGGC	GCTCTCATGTTCTTTTCACC	55
6	GGTGAAAGAGGGTAGAATCC	GAACTTGGACACTTGCTTTC	55
7-8-9	CTGCTATTTGGATTTTCCTG	CACCTCTCAGGTCACAGAAT	55
10	GATACACCTGGCTCAATAGC	ACAAGAACGGCAGATTTAG	55
11-12-13	CTGAAGAGAAAATTGATGGC	CTTCCTTCTCTCCCTCATC	55

Tabla 3.19. Cebadores del gen *RPE65*. Ta Temperatura de “anillamiento.

Gen *SAG*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
2	CATAACTAGGATGTTCTTGAC	AAATCACTCACTTGTGCACC	55º
3	CATGGATGCCTTAGCTTAGC	TAGATTATTAGCAAGGCCAG	60º
4	GGTTTCTTTCATCTTCTCCA	CTCTCCTTCCATGTAAATG	55º
5a	AAGTCCGACCCTGCCTTCAT	TAAGCAGGCTCTCTTGCAGT	60º
5b	ACCTTCCGCAGGGACCTGTA	TGCTGCGGGTGAAGGAAGCA	60º
6	ATATTACTTAATGGAACAGC	ACAGAGTAAAACCCTGTTTC	55º
7a	GAGGGAGTCGCTGATCGCT	GTGCTGTCTGTGGCGAATGC	55º
7b	TGGGGTTGACTTTGAGGTCA	CTCACCTATTCCGCAACCAT	55º
8	GAGAGAACAGAAGCCTCCCT	CTGCGGGTAGTAGCGATGGT	60º
9	TCTTCTGACCTATCTGCTGA	CTCTACTTCTGAGAAGAAGG	55º
10	CCAGTGCTGACCACCGGACT	GACACAGAAGGCTGAGACGC	60º
11	CTCTTGAACCCACCTTCCCA	GTGATGTGAAGGGAAGCAGA	60º
12	GTTCACCAGTCCCTGGAGAA	GAGCAGCCCGAGGGTTGGTG	58º
13	GAGCTGGGCTGTGTCCTGCC	AAGTTTGCTGCCTTTGATAT	58º
14	GCAGCCATAGGTCTTTGCTG	ATGGAATCTCTTACACCTGG	60º
15	CTGCCTCCCTTTTATTCCAT	AAGTAGCGGATGTGCCTCCT	58
16	TCTTGTTTCAGTTTCAGCTT	GCACTGGTAACTACAGGTCA	57º

Tabla 3.20. Cebadores del gen *SAG* (Sippel *et al*., 1998). Ta Temperatura de "anillamiento". Fragmento 11 cebadores modificados. Fragmento 13: 20% GC-RICH (*Roche).*

Gen *USH2A*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
2a	GCCTGGGATGAGCTTCAG	*TGACTCAGTCAAGGATATTG	58
2b	*TGGCTTCTTGTTTCAGGTC	*CCGCTGGGTACAGAACTG	58
2c	*TCACAGCTCTGCTGCTGC	GGTTTGGAATTCAGGCTGA	58
3	CACCACTGTAACTGCACAATACC	CTGCTGCAGATTTTGTGAGTAGA	55
4	GTCTTCCCAGCTGAACAAAGTA	GTCAGGTATTGCTTGGTAAACAG	55
5	GTCAGGTATTGCTTGGTAAACAG	CAGCATTTATCCTTTCGGTTC	57
6	TGACATTCATTTGTAACGACTCC	AAGTTTGTGGGCATTTGTTG	55
7	CCATGGTTTGATATATACTGATGG	CACCAGCCTAGAGAGCTAGC	55
8	CAACATTTTGATTTCTGTTTTGC	TGCTCTGACATCTTAATGTGCT	55
9	CACACAATGCATATAGTCCTAGG	TGTTAGGCCAAGATTAAGTTCAT	55
10	TGATATGTGCTTTACTTCTGGTG	GCATTGTAGATAGAAGCACACAG	55
11	TGGCAGGTAGAGATGAAAGG	GCAAATGCAGTCTTCAATTCATC	55
12	CCCTGTCTTGTACCTAATGAGC	TTCCAGATGGTAATAGAGATGTGA	58
13a	GCAGTAGCATTGTTTGTGTCTC	*AGGCCTTACAATTGG	58
13b	*ACTTCAGTGTGACACCTGC	*TTACAGCGAAGACCTGTTA	58
13c	*CAACAGGACAATGTCCTGC	TAGAAGCCACAAACCAGAAAC	58
14	GGGAATTAGTGCCTTGGTAGAG	GAAGTTATTGCTTTGCAACTGC	62
15	AAGCCGTCTTACTCTACAATGCT	TTCTGATGGGTTCTAAATGGAG	55
16	GCAATCCTGAATCAGAAAGACC	CCACAACAGCATTTATCCTCAA	55
17a	GAGAGGAAAGCAGTTAGCAATG	*TAGGAATGATATAACTTAAAGTC	55
17b	*ACAAGACAAAACCAGGGGTC	*GTACACGCCTGTACAGAAAA	58
17c	*GGTTCCATTTGCCAAGTACG	GATTCTCATTCATGTCTTGACCA	58
18a	*CCTTTGTCTGATGAGT TACG	*GTTGTCATTGTTTGAGGAGG	58
18b	*GAATCGGCCAATGAAAATGC	*GAAACATTTGCATTCAGAGGT	58
19	TCAGAAACTAAATGAATGTGTGA	TGCCCTGTTTAATCAATATAGAG	58
20	TGGTGGTTGGCAATAATTCC	GAGTTAGTGAGGGAGGAGAAGACA	48
21	AGCCATACAGATACTTGAAACC	GCTATCAAAGGGCTGCCTTAG	55
22	CCATGCGAGTATATTGCTGTG	GCTGAGGGCAAGTCACATTAC	60
23	CAGGAAAGCCAGAATGATGC	CCCAAAGGCAAATTCAACAG	60
24	CAGGCAATGAGGAGAGAGGA	CCTAAAGGAAATTTTTGGCACA	62
25	TGAATCATTAAGAGGCTTGCAG	TGTGTGCACCATTGGAATAAC	60
26	GGTCTTTCTGTCACTTCTGTGC	*TTAAGTGTAATGCCAACACATGG	62
27	TGCTTTCAGGGAACTGTTTTG	GGTGCTGCTTTTAGCCTGAG	65
28-29	TGCTGCAGAGGACAAAAATG	GCTTCAGGGTAATAGTCCTTCC	58
30	TGCGGCCATTAAAAGTGAAG	TGCAGGCTTCCACTACTTTAG	58
31	GCAGAAAGGGAGGAAAATGAC	CAAATTAGGTTGGGGTTTGC	58

Gen *USH2A*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
32	TGATTTATTGGTTTGGGTCTG	GCATTCTTGATTAAATTTGCAG	61
33	TGAAGCATCCTATATGTTATTGC	CCTCCCCTGATTGAACTCAC	63
34	ATTTCCTTTTTGCCCCTCAG	AGGATGGGAAGAGAGTTTTCAG	60
35	TTGGGGAAGTAAAGGTAGCAC	CCACAATCTCCCCAACTAGAG	63
36	AAATCACATCAAGAGTGCTTGC	CCTGCTTGAAAGGCTAGCTG	63
37	TGTGCTTTGATCCTGCTGAC	AACCAACATCTGTGGCTAAAAG	61
38	AATTGGCCAGGTCAACTCAG	TGTGAGGTGGATGAAAGCAG	61
39	CAGGAGTTCAGGAATGAAAATG	AAGTTTCAGTGGGAAGAAATCC	58
40	GAGATCTCATTTGATGGCAGAA	GGCTCATTTCTTTGCTTTGG	60
41	GGCAGCATCCTAGAAAATCC	GCAGGTCGTGAGGGTCTTG	62
42	GCAAAATTCTAGGCCTCGTG	AAAGCCTCCTTCATTTCCCTAC	62
43	ATGCCACAGAACAGCCTGAG	AGCCGTGACAAAGGCAATAG	58
44	TTTTGTAGAGGGGTGGAAGG	TGTGTACATGGGGGAGGTTC	65
45	CATTTCCAAAACAAAGGCTCTC	TTAGCCTCCACCCCCTTC	64
46	TCATCATATCCCACTGGTCAC	CCCTTCTCTCTTTTCCCTTCC	62
47	AGGGAAGGTGGGATTCAGAC	TGTCATGGCTGAGAGGATACC	64
48	CCTCACGCCATGTGTTATTC	CCTTTCTTTTCCGTGGAGTC	60
49	TCGAATGATCCTGGAAAATACA	TTGTTGAGAGGGAGGTGTTTG	63
50	ACCTGTAAGTTGCCATGTGTG	TTTGGAGGACATGACCTTTTC	64
51	ATTTCAGCAACTGCCTGAGC	AAAGCTTCCCTGAGAACAGC	60
52	TGGGAAGCTGCAAAACTG	GGCCTCAAAGTATGATGGAATG	60
53	*GTGCAATTCCGTATCCCTGC	*TAGTGGTTAGATGCATAGGGC	62
54	ATTGCATTTCTTCCGAACAC	TCTCTCCTTCCAGCCATAGG	62
55	AAAGGGAAATGCTTCTCCAAG	CCCCCTAACCACAATGACAG	58
56	AGCCTCTTATGAGGTTCAGACC	CAAGCCTGAAGAATGGGAAC	60
57	GGGGATGGTGTGACTTTTG	ATGGCCAATGAATGAGGAAG	58
58	GGCAAAGAGTTTGCAATTTGTC	TTTATCCAGGAGACCGACTATG	65
59	*GATCCTCATCCCCGAAATTCC	*CTTTACTCGATGCCAGACTGTG	60
60	TGCAAAAGGACAGGTTAAAA	GATTCTGCTGTGTTGGAGCA	58
61	TGACACCAGGAAGAAACAGC	TTATCCCCGTGACTACATTGC	62
62	TTGGCCATGAGGTTCAGAG	TGAAGGGAGTTTTCCCACAG	60
63a	GGGGGTGAAGGTTAAAAAGG	*CAATGTCCTCACCACATTCC	60
63b	*AGGTTTGCAACCATGGACGC	*TGATTTCTATTGATTCTGAGCC	58
63c	*GTAGCCTGCACGAATGGAGG	TTTAGGTGGATGGAGGTTGG	60
64	AATCTCGGCTCACTGCAAG	AGTGCCTTTTCAAATTGTGC	62
65	TGCTTTTGGTTGCCAATTTC	ACCGTAGAGCAACTGAGAACAG	61

Gen *USH2A*			
Fragmento	Secuencia Forward (5´-3´)	Secuencia Reverse (5´-3´)	Ta (ºC)
66	TGTAGGAGGTGGGATCTTGG	CTGGGGAGTGCCAGGTAG	66
67	GAGCAGTTTCCTGCAAATGG	TCCCCACAAGAAAATCCTTC	58
68	*ACCTGCACTCCTTCAAAGAGG	CGTAAAGCTGGGGAACAGAG	66
69	CGTCATAACTTGCTTTGGAATC	CAACACTTGGCACAATTTCTTC	62
70	ATCAAATAGCAGGGCCAGAG	CCTCTCTTGGTCCCCACAC	62
71c	GTATGATAATGCTGTCATTGG	ATGGAAGTCATCAATGATCTG	58
71	*GTCAGGAGACAGTCATTCCC	GTGCTCAGAGGCGAGTGCC	62
72	TGAGGCTTCTGAGGCTTAG	CTGCCAAACAGAACCAAGTG	62

Tabla 3.21. Cebadores del gen *USH2A.* [Weston *et al*., 2000; van Wijk *et al.*, 2004]. * modificados o diseñados por E.Aller. Ta Temperatura de "anillamiento". Fragmentos del 2 al 21 PCR de 30ciclos. Fragmentos 24, 27, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 44, 49, 63a, 65, 66, 67 y 68 tiempos de hibridación y extensión de cada ciclo reducidos a 15 seg. Fragmento 58 tiempo de hibridación de cada ciclo reducido a 15 seg, eliminación del paso de extensión de cada ciclo y 7min de extensión final. Fragmentos 61 y 64 disminución de la concentración de MgCl2 en la mezcla de la PCR, utilizando 0.5 µl para un volumen final de 25µl.

3.2.2.2. ENSAYO DE RESTRICCIÓN

Ensayo basado en la actividad de las enzimas de restricción. Las enzimas de restricción son nucleasas que cortan ADN de doble cadena cuando reconocen un patrón de secuencia específico llamado diana de restricción. Esta propiedad de dichas enzimas permite detectar cambios en la secuencia, ya que estas variaciones pueden dar lugar a la creación de una nueva diana de restricción, o por el contrario, a la destrucción de la misma. Una vez digerido nuestro ADN problema con la enzima de restricción, se generan fragmentos de ADN de tamaño conocido, lo que permitirá conocer qué cambio se ha producido en el ADN a estudiar. Los fragmentos se separan mediante electroforesis en gel. Los materiales más comunes para separar estas moléculas son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa. En este trabajo, los resultados obtenidos tras la digestión fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%. Las condiciones del ensayo y las enzimas utilizadas se muestran en las tablas 3.22 y 3.23, respectivamente.

Agua	Buffer	Producto de PCR	Enzima
5µl	2µl	12,5µl	1µl
	10X		10U/µl
Braun	Fermentas/Biolabs		Fermentas/Biolabs

Tabla 3.22 Condiciones del ensayo de restricción. Volumen final 20 µl.

Enzima	Temperatura	Tiempo	Cambio estudiado
BanI	37º	3h	*RDH12* c.278T>C p.Leu93Pro
BccI	37º	2h	*CNGB1* c.2957A>T p.Asn986Ile

Tabla 3.23. Enzima de restricción utilizada para cada ensayo.

3.2.2.3. TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN DE ADN

Secuenciación automática

Los primeros métodos de secuenciación de fragmentos de ADN aparecieron a partir de los años 70. La secuenciación permite determinar la secuencia nucleotídica exacta del fragmento de interés. Existen dos métodos clásicos de secuenciación: el método químico, descrito en 1977 por Maxam y Gilber [1977] y el método enzimático de

Sanger, descrito originalmente por Sanger, Nicklen y Coulson también en 1975 [Sanger *et al.*, 1977].

La secuenciación automática está basada en el método enzimático de Sanger. Se caracteriza por el marcaje fluorescente de los ddNTPs. El marcaje es diferente para cada una de las bases lo que permite al detector la identificación de cada una de ellas según la longitud de onda de la fluorescencia emitida.

Para llevar a cabo esta técnica partimos de una PCR convencional con los cebadores específicos de cada fragmento de ADN que se quiere amplificar. El producto de PCR se purifica mediante el sistema *EZNA* (*Omega Biotek*, EE.UU) según las instrucciones del fabricante. Usando como molde el fragmento de PCR amplificado se lleva a cabo la reacción de secuenciación (Tabla 3.24), donde es necesaria la presencia de los ddNTPs marcados y los dNTPs de la PCR clásica. En este trabajo se utilizó un producto comercial de Applied Biosystems llamado *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*ABI Prism, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). El producto de la reacción de secuenciación se purifica mediante las columnas *Centri-Sep*^{TM} (*Centri-Sep*^{TM} *Columns, Applied Biosystems*) según las instrucciones del fabricante. El producto purificado se analiza en el secuenciador automático *ABI Prism 3130xl genetic analyzer.*

Agua	*BigDye* v3.1	Cebadores	ADN
9µl	4µl	1µl	6µl
		5pmol/µl	100ng/µl
Braun	*Applied Biosystem*	Pacisa-Giralt	

94º 3’
96º 10’’
50 5’’ 25 ciclos
60º 3’
4º ∞

Tabla 3.24. Condiciones de la reacción de secuenciación.

El análisis de las secuencias se llevó a cabo de forma manual o mediante el uso del programa *Vector NTI Advance 10* según las recomendaciones proporcionadas por el fabricante.

SNaPshot o minisecuenciación

La técnica minisecuenciación (*single base primer extension method,* en inglés) es una modificación de la secuenciación automática. Se amplifica el fragmento mediante PCR convencional. Una vez obtenida la región, se hibrida con una sonda donde la siguiente base al extremo 3´ es la posición de interés. A diferencia de la secuenciación

automática, únicamente se añaden ddNTPs produciéndose elongación de una sola base. El producto se resuelve mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático. Cada uno de los ddNTPs va marcado con un fluorocromo distinto, por lo que el color del amplicón en el electroferograma nos indica el genotipo del paciente para esa posición.

Esta técnica se llevó a cabo para analizar el haplotipo asociado a la mutación p.Arg257ter en el gen *CERKL* mediante el protocolo comercial *SNaPshot Multiplex Kit Protocol* (*Applied Biosystems*), según condiciones del fabricante. Las variantes o SNPs (*Single Nucleotide Polimorphisms*) analizados se muestran en la tabla 3.25. Los resultados fueron analizados con el secuenciador automático *ABI Prism 3130xl*.

Gen	SNP	Localización
CERKL (182109650-182229996)	rs720453	chr2:181860076
	rs155107	chr2:182060025
	rs1047307	chr2:182109996int
	rs1449255	chr2:182136280int

Tabla 3.25. Marcadores [Pomares *et al* 2007] analizados mediante SNaPshot.

Microarray de genotipado

El caso índice de 272 de las familias seleccionadas fue estudiado mediante un *microarray* de genotipado específico para arRP.

El *microarray* de genotipado de AsperBio es una herramienta diseñada por la empresa Asper Biotech (Tartu, Estonia), con el fin de detectar mutaciones conocidas. Está basado en la técnica APEX (*Arrayed Primer Extension*), técnica que combina la eficiencia de los *arrays* con la secuenciación de Sanger. Se utilizan *arrays* comerciales, donde quedan inmovilizados los oligos por el extremo 5´ correspondientes a las mutaciones a estudiar, siendo la base de interés, el nucleótido siguiente al extremo 3´ del oligo inmovilizado (Figura 3.1.). Mediante la reacción en cadena de la polimerasa, se amplifica el fragmento de interés en la muestra de ADN del paciente. El producto de PCR se hibrida con los oligos inmovilizados, quedando libre la base a estudiar en el extremo 3´. Se añaden terminadores de cadena (ddNTPs) marcados con fluorocromos,

que se unirán a la base complementaria impidiendo que continúe la elongación. La fluorescencia del ddNTP se detecta mediante un escáner (Figura 3.1).

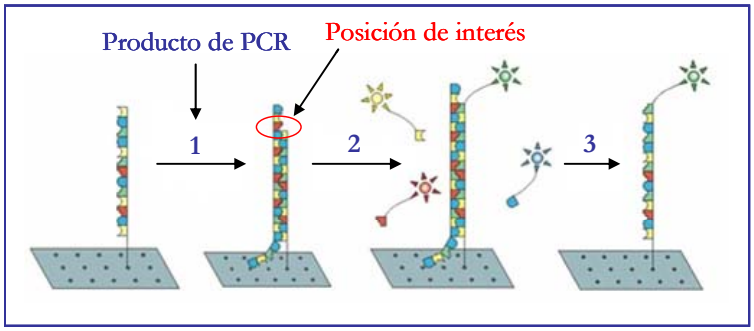


Figura 3.1. Esquema de funcionamiento del *microarray* de genotipado. 1. Hibridación. 2: Elongación. 3. Detección.

Cuando se inició el estudio el *microarray* de genotipado de arRP detectaba 501cambios en 16 genes [año 2006] implicados en arRP (Tabla 3.26). A lo largo del estudio el *microarray* se fue actualizando con la inclusión de un nuevo gen, gen *LRAT (Lecithin Retinol Acyltransferase)* localizado en 4q32.1, y nuevas mutaciones.

Actualmente, el *microarray* detecta 594 cambios en 19 genes, habiéndose incluido los genes: *PROM1 (Prominin 1)* localizado en 4p15.32 y *RBP3 (Retinol Binding Protein 3)* localizado en 10q11.2.

Gen	Nombre del gen	Localización
CERKL	*Ceramide Kinase-Like Protein*	2q31.3
CNGA1	*Rod cGMP-gated Channel Alpha Subunit*	4p12
CNGB1	*Rod cGMP-gated Channel Beta Subunit*	16q13
CRB1	*Crumbs Homolog 1*	1q31
MERTK	*c-Mer Proto-oncogene Tyrosine Kinase*	2q14.1
NR2E3	*Nuclear Receptor Transcription Factors*	15q22.32
PDE6A	*cGMP Phosphodiesterase Alpha Subunit*	5q33.1
PDE6B	*Rod cGMP Phosphodiesterase Beta Subunit*	4p16.3
RDH12	*Retinol Dehydrogenase 12*	14q24.1
RGR	*RPE-retinal G protein-coupled Receptor*	10q23.1
RLBP1	*Retinaldehyde-Binding Protein 1*	15q26.1
RPE65	*Retinal Pigment Epithelium-specific Protein 65kDa*	1p31
SAG	*Arrestin (s-antigen)*	2q37.1
TULP1	*Tubby Like Protein 1*	6p21.3
USH2A	*Usher Syndrome 2A*	1q41
USH3A	*Clarin 1*	3q25

Tabla 3.26. Genes incluidos en el *microarray* de arRP: nombre y localización, en el momento en el que se comenzó el estudio.

Microarray de SNPs

Se analizaron un total de 43 individuos, 42 afectos y uno sano, de 18 familias cconsanguíneas, de las cuales 17 fueron clasificadas como arRP y una como sRP, con un *microarray* de SNPs (*Single Polimorphic Nucleotide*s). Todas las familias fueron previamente analizadas con el *microarray* de genotipado específico de arRP, no detectándose mutaciones. Sin embargo, 9 de estas familias fueron analizadas *a posteriori* por lo que no están incluidas en el análisis derivado del uso del *microarray* de genotipado específico de arRP de las 272 familias llevado a cabo en este trabajo.

Los *microarrays* de SNPs son técnicas de genotipado de alto rendimiento que permiten genotipar un número elevado de SNPs distribuidos a lo largo de todo el genoma. La densidad de variantes analizadas varía en función del *microarray* utilizado. En este trabajo se utilizaron los *arrays Infinium II HumanLinkage-12 Panels* (*Illumina*) que analiza 6.090 marcadores y *HumanCytoSNP-12* que analiza 220.000 marcadores.

Ambos *arrays* están basados en el diseño *Infinium* mediante el uso de una plataforma sólida (*BeadArray)*. Partimos de ADN genómico que sufre un proceso de amplificación de genoma completo. Una vez amplificado se fragmenta al azar. Los fragmentos de ADN se hibridan con el *array*, que está formado por unas bolitas donde se encuentran inmovilizadas las sondas u oligonucleótidos que van a hibridar de forma selectiva, parando justo una base antes de la posición de interés. Una vez hibridado se produce la elongación enzimática de una única base (Figura 3.2). El nucleótido incorporado está marcado con un fluorocromo por lo que es detectado mediante un escáner (*iScan Illumina*). En los ensayos de genotipado los alelos son identificados con señales de color rojo y verde, así cuando la señal sea roja o verde estaremos ante un genotipo homocigoto, mientras que cuando la señal sea amarilla el genotipo será heterocigoto.

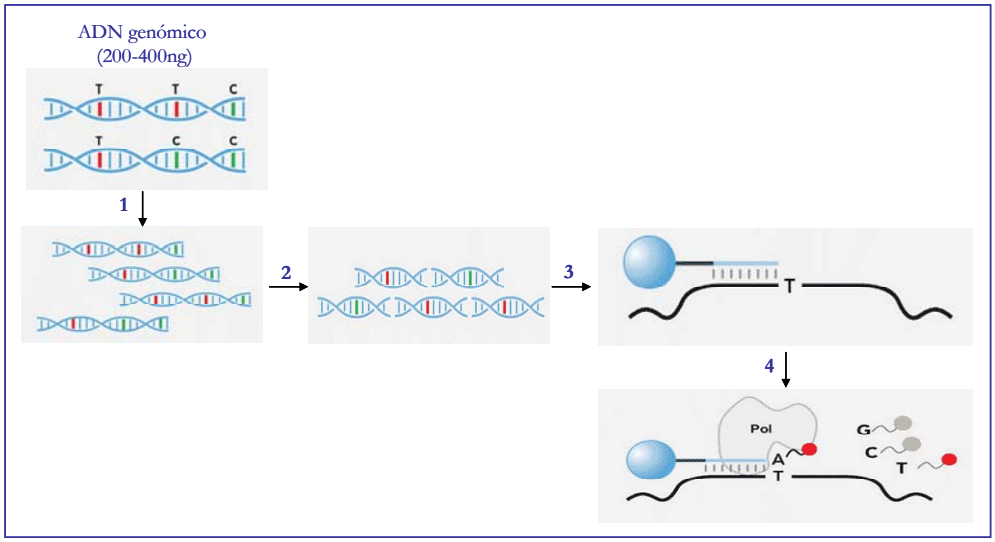


Figura 3.2. Esquema de funcionamiento del microarray de SNPs. 1. Amplificación del genoma completo. 2. Fragmentación. 3. Hibridación. 4. Elongación enzimática.

La hibridación, normalización y genotipado de las muestras se llevó a cabo en colaboración con el Instituto de Genética Humana, Centro Helmholtz, Munich (Alemania) según protocolos y condiciones del fabricante.

3.2.2.4. *HIGH RESOLUTION MELTING* (HRM)

La técnica del HRM (*High Resolution Melting*) es una PCR a tiempo real "*LightCycler* 480" (*Roche Molecular Systems*) caracterizada por la utilización de un fluorocromo de tercera generación (R27 en el caso de *Roche Diagnostics*) que presenta

una gran afinidad por la doble hebra de ADN y tiene la característica de que a la concentración de saturación no inhibe la reacción de PCR. Esta nueva química permite, además de realizar estudios de cuantificación, el genotipado de las muestras a estudiar (Figura 3.3). La base del análisis del HRM es la caracterización de muestras de ADN por el perfil de disociación de sus hebras (*melting*), acontecido durante una gradiente ascendente de temperatura.

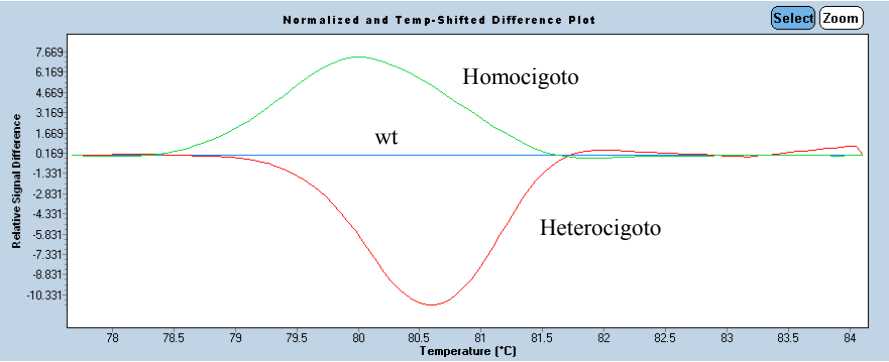


Figura 3.3. Imagen obtenida de la aplicación de la técnica HRM. Genotipado de los productos de PCR basado en la comparación de los patrones de *melting*. "wt" *wildtype* "Homocigoto" homocigoto para la mutación. "Heterocigoto" heterocigoto para la mutación.

La técnica de HRM ha sido utilizada con el fin de determinar la frecuencia en población control española de una nueva variante en el gen *RPE65* (c.560G>A; p.Gly187Glu) descrita en este estudio y siguiendo el protocolo comercial (*Roche Molecular Systems*), según condiciones del fabricante. Para este estudio se utilizaron los mismos cebadores y temperatura de "anillamiento" que para la PCR convencional (Tabla 3.19).

3.2.3. TÉCNICAS DE ANÁLISIS INDIRECTO

El estudio indirecto es aquel que nos permite establecer si un gen concreto o región del genoma está implicado en la patología en la familia a estudiar. El análisis indirecto se lleva a cabo mediante el estudio de marcadores polimórficos. A continuación se detallan los tipos de marcadores utilizados en este trabajo así como la aplicación de cada uno de ellos.

3.2.3.1. MARCADORES MICROSATÉLITES O STRs

Los **marcadores microsatélites o STRs,** del inglés *Short Tandem Repeats,* son secuencias de ADN en las que un fragmento se repite de forma consecutiva. Están distribuidos a lo largo de todo el genoma. La variación de la longitud de la secuencia y la elevada tasa de mutación que poseen hacen que sean muy polimórficos.

El análisis de microsatélites está basado en la amplificación de estas regiones polimórficas en el interior del gen o adyacentes a éste, y que permite establecer la herencia concreta en la familia. Estableciendo de esta forma, si dicho gen está implicado en la patología en cada familia.

Los marcadores, que se muestran en las tablas 3.27, 3.28, 3.29, 3.30 y 3.31, se seleccionaron de la literatura [Chavanás *et al.,* 2000; Kondo *et al*., 2004; Zhang *et al.,* 2004 y Vallespín *et al.,* 2007] y fueron adaptados al sistema de análisis.

CNGA1			
Marcador	Fluorocromo	Tamaño (pb)	Distancia (cM)
D4S3045	Vic	118-134	6,5cM (anterior)
CNGA1_p01	Ned	110-118	Intragénico
D4S428	Pet	188-204	7,6 cM (posterior)
CNGA1_p02	Ned	144-162	0,29cM (posterior)

Tabla 3.27. Microsatélites *CNGA1* [Kondo *et al*., 2004 ; Zhang *et al.,* 2004].

CRB1			
Marcador	Fluorocromo	Tamaño (pb)	Distancia (cM)
D1S408	Ned	170-186	3,29cM (anterior)
D1S2757	6Fam	223-271	2,49cM (anterior)
D1S2816	Ned	210-252	0,58cM (anterior)
D1S1669	Pet	226-250	1,2cM (posterior)

Tabla 3.28. Microsatélites *CRB1* [Vallespín *et al.,* 2007].

PDE6A			
Marcador	Fluorocromo	Tamaño (pb)	Distancia (cM)
D5S434	Pet	246-258	1,9cM (anterior)
D5S413	6Fam	264-278	0,87cM (anterior)
D5S2013	Vic	136-162	0,3cM (posterior)
D5S636	Ned	130-152	0,6cM (posterior)

Tabla 3.29. Microsatélites *PDE6A* [Chavanás *et al.,* 2000].

SAG			
Marcador	Fluorocromo	Tamaño (pb)	Distancia (cM)
SAG_p05	Ned	292-320	0,49cM (anterior)
SAG_p04	Ned	230-234	0,44cM (anterior)
SAG_p02	Ned	150-154	0,14cM (anterior)
SAG_p01	Ned	110-120	0,13cM (anterior)
SAG_p03	Ned	168-180	0,09 (anterior)

Tabla 3.30. Microsatélites *SAG* [Kondo *et al*., 2004].

USH2A			
Marcador	Fluorocromo	Tamaño (pb)	Distancia (cM)
USH2A_p03	Vic	226-238	0,14cM (anterior)
USH2A_p01	Vic	182-206	0,18 cM (anterior)
USH2A_p02	Vic	284-294	0,21cM (anterior)
USH2A_p04	Vic	320-332	0,39cM (anterior)

Tabla 3.31. Microsatélites *USH2A* [Kondo *et al*., 2004].

El estudio se realizó mediante una PCR *multiplex*, reacción donde se amplifican varios fragmentos simultáneamente, según las condiciones descritas en la tabla 3.32. El producto resultante es analizado en el secuenciador automático *ABI Prism 3130xl genetic analyzer*.

Agua	Buffer 10x	dNTPs	Cebadores	ADN	Enzima
1,25µl	2.5µl	4µl	6µl	1µl	0,25µl
	2mM MgCl2	1,25mM	5pmol/µl	100ng/µl	
Braun	*Roche*	Invitrogen	Applied Biosystem		*FastStart Taq*

94º 12’
94º 15’’
55 15’’
72º 30’’
89º 15’’
55º 15’’ 20 ciclos
72º 30’’
72º 30’
4º ∞

Tabla 3.32. Condiciones de la PCR de microsatélites. Volumen final 15 µl. La cantidad de cada uno de los cebadores varía de unos genes a otros.

3.2.3.2. POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA O SNPs

Los **polimorfismos de base única o SNPs**, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism,* son variaciones en la secuencia de ADN que afectan a una sola base. A diferencia de los marcadores microsatélites la tasa de mutación es mucho menor

cambiando muy poco de unas generaciones a otras, es por esto por lo que es sencillo seguir su evolución en estudios poblacionales.

El genotipado de los SNPs mediante el uso del *microarray (Illumina)*, descrito en el apartado 3.2.2.3., se utilizó para el análisis de ligamiento, con el fin de identificar nuevas mutaciones y/o nuevos genes en aquellas familias consanguíneas en las que no se detectó ninguna mutación tras el estudio previo. El análisis de ligamiento se realizó con el programa *easyLinkage Plus v5.08* con el módulo *GeneHunter* v2.1r5. Los parámetros específicos de ejecución del programa que se utilizaron se muestran en la figura 3.4.

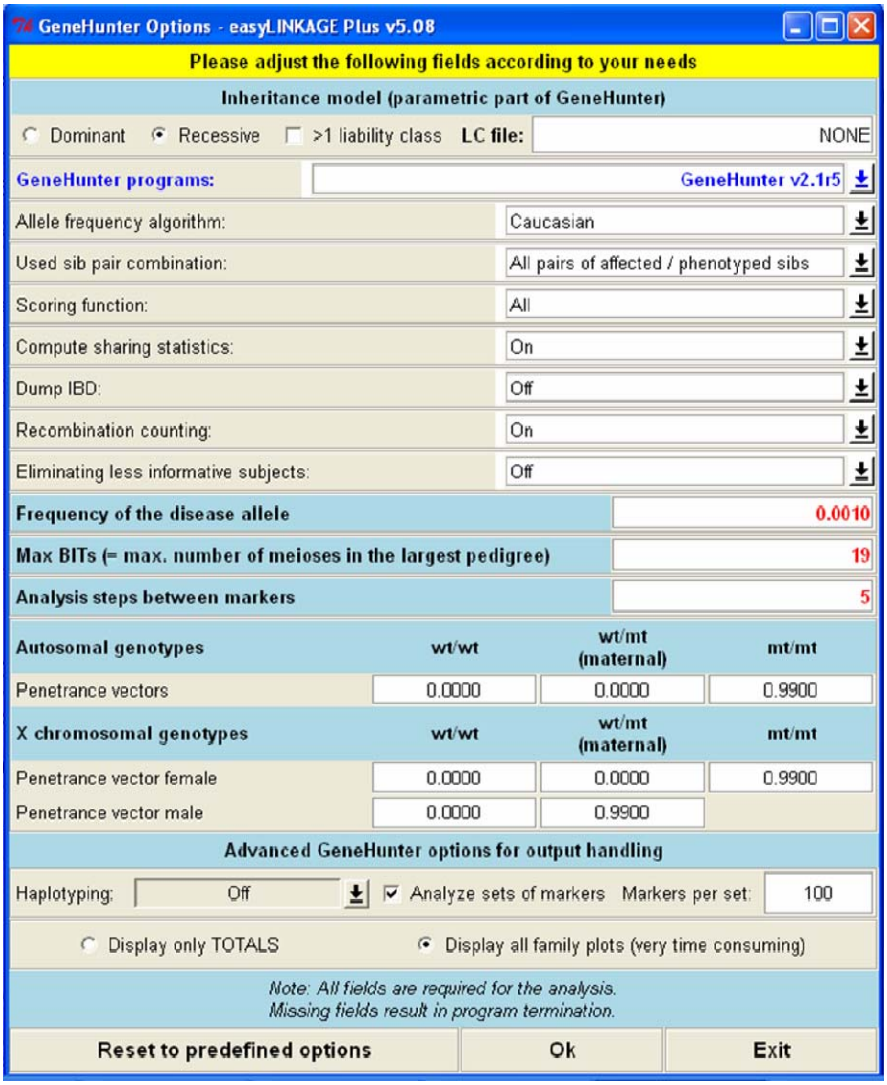


Figura 3.4. Parámetros específicos de ejecución del programa *GeneHunter* utilizados para llevar a cabo el análisis de ligamiento.

3.2.4. MAPEO DE HOMOCIGOSIDAD

Una vez establecidas las regiones de ligamiento para cada una de las familias, se analizaron de forma manual con el fin de detectar regiones candidatas mediante la observación de pérdidas de heterocigosidad (LOH, del inglés *Loss of Heterozygosity*). Los criterios de priorización para el estudio de las regiones de homocigosidad fueron los siguientes:

Se consideraron las regiones homocigotas con una longitud mínima de 2Mb. Una vez determinadas, se analizaron con el programa *UCSC Genome Browser* viendo si incluían genes previamente descritos como causa de Distrofias de Retina. En primer lugar se analizaron mediante secuenciación automática los genes asociados a arRP comenzando por los que se encontraban en las regiones de mayor tamaño. En el caso en el que fueron descartados se analizaron los genes asociados a otras DR empezando de nuevo por las regiones más grandes.

3.2.5. ESTUDIO DE PATOGENICIDAD DE LAS VARIANTES

En este apartado se detalla el protocolo seguido en este trabajo una vez detectada una nueva variante con el fin de establecer la patogenicidad de la misma:

- Segregación de la nueva variante en la familia en todos los casos
- Análisis *in silico* del cambio detectado. Los programas utilizados son *SIFT* (*Sorting Intolerant From Tolerant*), considerándose cambio patogénico con un *score* <= 0.05, y *Polyphen* para las variaciones que producen un cambio de aminoácido, y "*Human Splicing Finder"* para las variaciones que pueden alterar el proceso de *splicing*.
- Frecuencia del cambio en población control (100 cromosomas).
- Imagen y visualización mediante el *Jalview (Java alignment editor)* del alineamiento de la secuencia de la proteína a lo largo de la evolución cuando la variante produce cambio de aminoácido.

3.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el fin de determinar si existen diferencias en el porcenatje de familias con mutación entre los grupos de pacientes, así como en los genes implicados en la patología en cada caso, se llevó a cabo un análisis estadístico mediante el test de *Chi*-cuadrado (χ^2) o test de *Fisher*.

3.2.7. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

Herramientas bioinformáticas adicionales utilizadas a lo largo del estudio:

Ensembl: www.ensembl.org
EsRetNet: http: www.esretnet.org
HapMap: http: www.hapmap.org
HGMD: http: www.hgmd.cf.ac.uk/
NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov
Pfam: pfam.sanger.ac.uk/
Retina International: www.retina-international.org
RetNet: http: www.sph.uth.tmc.edu/Retnet
UniProt (Universal Protein Resource): www.uniprot.org

3.2.8. DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO DE ACTUACIÓN

A continuación se describe el protocolo de actuación llevado a cabo en este trabajo.

El caso índice de todas las familias recogidas se analizó mediante el *microarray* de genotipado. Las familias en las que se detectaron dos mutaciones quedaron caracterizadas tras confirmar la segregación de las mutaciones. En los casos en los que se detectó un único alelo mutado, se llevó a cabo el estudio familiar o de ligamiento del gen, en el que se encontraba la mutación, con el fin de establecer si dicho gen era el posible responsable de la patología en esa familia. Si cosegregaba, se llevaba a cabo el cribado del gen mediante secuenciación automática. Cuando el cribado daba lugar a nueva variante se llevaba a cabo el estudio de patogenicidad descrito en el apartado 3.2.5. Si se consideraba patogénica, la familia quedaba caracterizada. Aquellas familias

consanguíneas en las que no se detectó ningún cambio, fueron analizadas con el *microarray* de SNPs (*Illumina*) y se llevó a cabo el mapeo de homocigosidad, seguido de la secuenciación automática de los genes previamente descritos que se encontraban en las regiones homocigotas para cada una de las familias. En las familias en las que se detectó una mutación en homocigosis se realizó el estudio de patogenicidad. Las familias no consanguíneas y aquellas en las que se detectó un único alelo tras el estudio de los exones y regiones flanqueantes mediante secuenciación automática se han seleccionado para estudios posteriores (Figura 3.5).

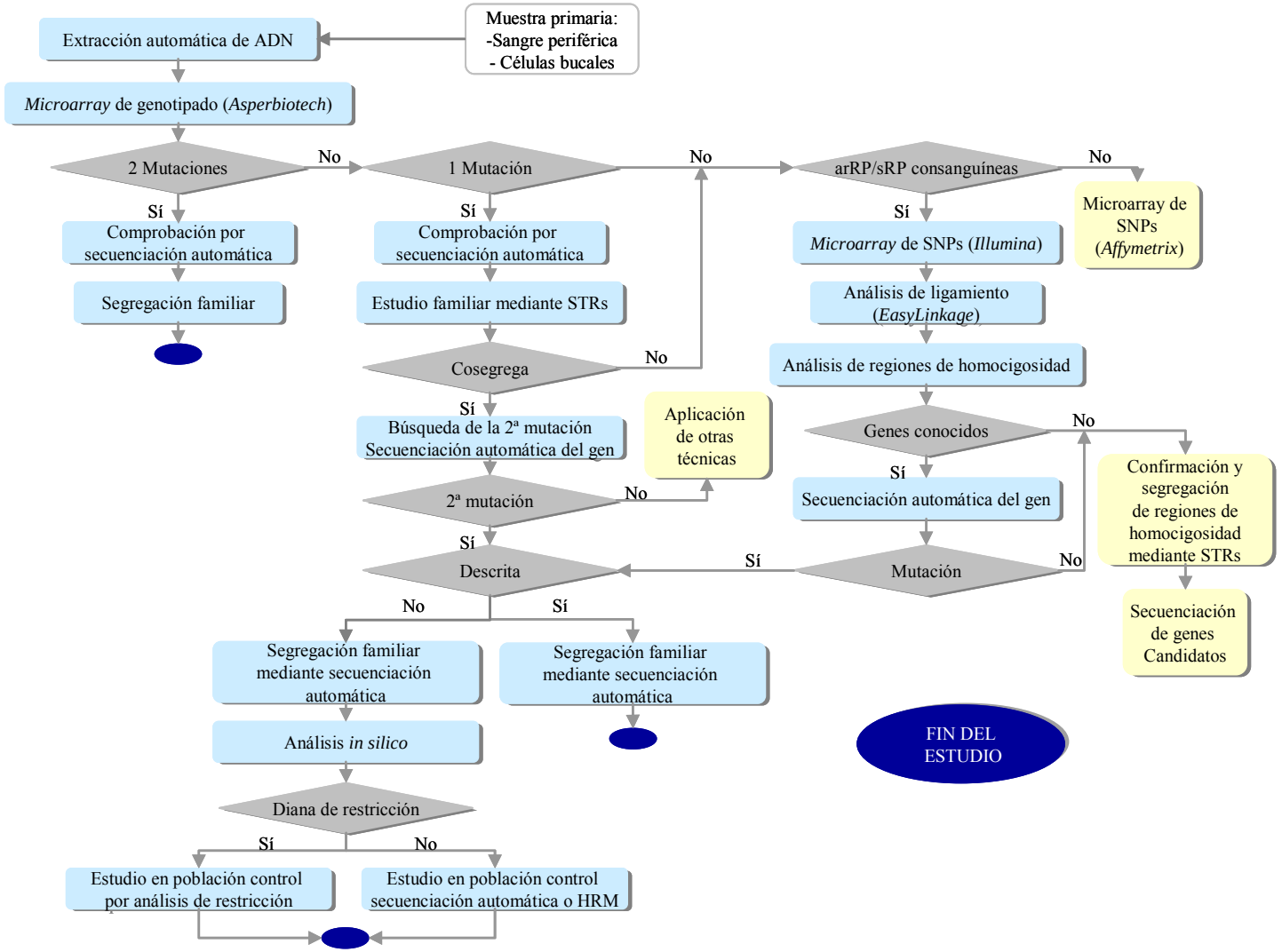


Figura 3.5. Protocolo de actuación a seguir en este trabajo.

RESULTADOS

En este capítulo se exponen los resultados derivados de este trabajo divididos en dos apartados. En **primer lugar**, se detallan los resultados obtenidos de la caracterización molecular de los pacientes tras el uso del *microarray* de genotipado, que permite la detección de mutaciones conocidas, tal y como se ha descrito en el protocolo de actuación para cada una de las familias, y el uso del microarray de SNPs o mapeo de homocigosidad. En **segundo lugar**, una vez caracterizadas molecularmente las familias, se describen los resultados obtenidos para la correlación genotipo- fenotipo.

4.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS PACIENTES

4.1.1. RESULTADOS OBTENIDOS CON EL *MICROARRAY* DE GENOTIPADO

Los resultados obtenidos con el *microarray* de genotipado se exponen por grupos según las distintas clasificaciones. Los polimorfismos detectados con este método no se tuvieron en cuenta para dicho análisis. Todas las mutaciones detectadas se confirmaron mediante secuenciación automática (utilizada como método de referencia), excepto en dos casos (falsos positivos) en las familias RP-0337 y RP-1015 para las que el *microarray* detectaba las mutaciones p.Met1731fs en *USH2A* y p.Ser175Pro en *RDH12* respectivamente.

Tal y como se muestra en la tabla 4.1, teniendo en cuenta la **clasificación genética** de las familias estudiadas con el *microarray* de genotipado, se ha detectado al menos una mutación en el 18,7% de las familias arRP, siendo el 13,3% para el grupo de las familias sRP. El porcentaje de alelos mutados obtenidos tras el análisis fue del 14,3% para arRP y del 10,3% para sRP.

		A		B	
		Familias con mutación/es	Total familias	Alelos mutados	Total Alelos
RP	arRP	20 (18,7%)	107	30 (14,3%)	214
	sRP	22 (13,3%)	165	34 (10,3%)	330
	Total	42 (15,4%)	272	64 (11,8%)	544

Tabla 4.1. Resultados obtenidos tras el análisis con el *microarray* de genotipado según clasificación genética. **A.** Porcentaje de familias con al menos una mutación. **B.** Porcentaje de alelos mutados. El análisis *chi*-cuadrado mostró χ^2=1,43 p=0,2322, por lo que no hay diferencias significativas entre ambos grupos para la detección de mutaciones con la técnica empleada.

Según la **clasificación clínica**, con el *microarray* de genotipado se detectó al menos una mutación en el 13,9% de las familias que presentaban RP juvenil, siendo el 16,1% de las familias para el grupo de con RP típica. El porcentaje de alelos mutados obtenidos tras el análisis fue del 14,3% para RP juvenil y 10,3% para RP típica (Tabla 4.2).

		A		B	
		Familias con mutación/es	Total familias	Alelos mutados	Total Alelos
RP	RP Juvenil	12 (13,9%)	86	18 (10,5%)	172
	RP Típica	30 (16,1%)	186	46 (12,4%)	372
	Total	42 (15,4%)	272	64 (11,8%)	544

Tabla 4.2. Resultados obtenidos tras el análisis con el *microarray* de genotipado según clasificación clínica. **A.** Porcentaje de familias con al menos una mutación. **B.** Porcentaje de alelos mutados. El análisis *chi*-cuadrado mostró χ^2=0,21p=0,6443, por lo que no hay diferencias significativas entre ambos grupos para la detección de mutaciones con la técnica empleada.

En ambos casos, se realizó un análisis *chi*-cuadrado para determinar si el número de familias en las que se detectaba mutación con el *microarray* dependía de la clasificación genética o clínica de las familias. El análisis mostró χ^2=1,43 p=0,2322; χ^2=0,21 p=0,6443 respectivamente, por lo que no hay diferencias significativas entre los datos obtenidos con la técnica empleada cuando hablamos de detección de mutaciones entre los dos grupos de familias según clasificación genética o clínica.

4.1.2. DISTRIBUCIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LAS FAMILIAS CON MUTACIÓN

Se han identificado mutaciones en 10 de los 16 genes estudiados (*CERKL*, *CNGA1*, *CNGB1*, *CRB1*, *MERTK*, *NR2E3*, *PDE6A*, *PDE6B*, *RDH12*, *RGR*, *RLBP1*, *RPE65*, *SAG*, *TULP1*, *USH2A* y *USH3A*), mediante el *microarray* de genotipado. La tabla 4.3 muestra el número de familias con uno o dos alelos mutados para cada uno de los genes tras el estudio.

	Nº Familias		
Gen	1 alelo mutado	2 alelos mutados	Total
CERKL	0	9	9
CNGA1	2	2	4
CRB1	3	0	3
PDE6A	2	1	3
PDE6B	0	1	1
RDH12	1	2	3
RLBP1	0	1	1
RPE65	0	1	1
SAG	2	1	3
USH2A	9	5	14
Total	19	23	42

Tabla 4.3. Número de familias con uno o dos alelos mutados mediante el *microarray* de genotipado.

A continuación se exponen los resultados obtenidos tras el análisis molecular para las familias con mutación según el gen mutado y el fenotipo que presentan.

4.1.2.1. FAMILIAS CON MUTACIÓN EN EL GEN *CERKL*

En nueve de las 272 (3,3%) familias estudiadas con RP típica, cinco de las cuales eran consanguíneas, se detectó la mutación c.769C>T; p.Arg257ter en homocigosis. En la figura 4.1 se muestra que la mutación cosegrega con la patología en cinco de las familias tras llevar a cabo la segregación por secuenciación automática. Este estudio no se pudo llevar a cabo en las cuatro familias restantes (RP-0211, RP-0218, RP-0325 y RP-0657) ya que no se disponía de muestra de otros miembros de la familia.

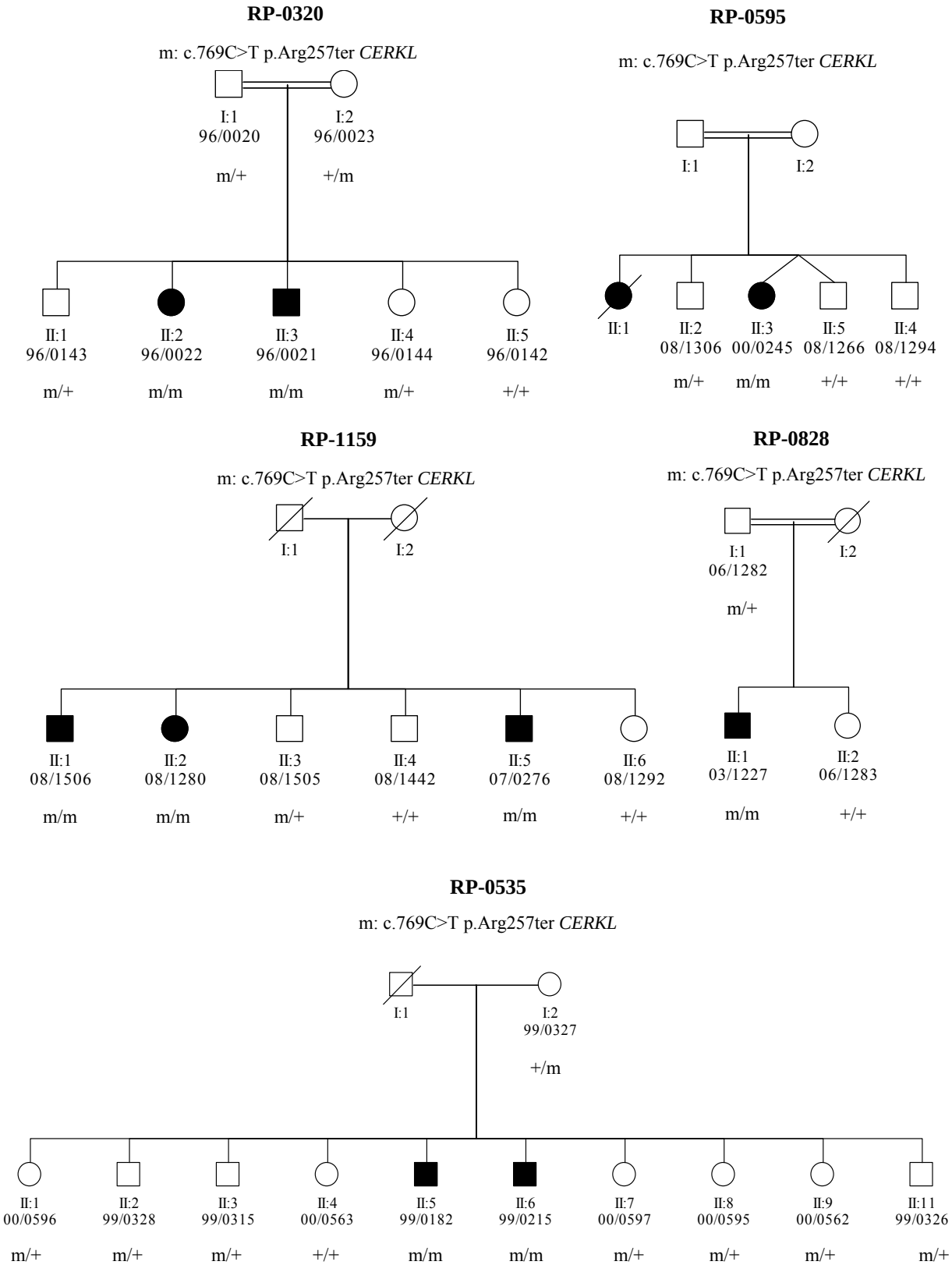


Figura 4.1. Segregación de la mutación c.769C>T p.Arg257ter en el gen *CERKL* en las familias RP-0320, RP-0595, RP-1159, RP-0828 y RP-0535. "+" alelo normal "m" alelo mutado.

4.1.2.2. FAMILIAS CON MUTACIÓN EN EL GEN *CNGA1*

Cuatro de las 272 (1,4%) familias estudiadas, una de las cuales era consanguínea, presentaron la mutación c.82C>T; p.Arg32ter en el gen *CNGA1* detectada mediante el *microarray* de genotipado (Tabla 4.4).

		Mutación 1		Mutación 2		
Familia	Fenotipo	Nucleótido	Proteína	Nucleótido	Proteína	Estudio familiar
RP-0531	RP Juvenil	c.82 C>T	p.Arg32ter	c.82 C>T	p.Arg32ter	C
RP-0159	RP Típica	c.82 C>T	p.Arg32ter	----	----	NC
RP-1080	RP Típica	c.82 C>T	p.Arg32ter	c.82 C>T	p.Arg32ter	C
RP-1147	RP Típica	c.82 C>T	p.Arg32ter	----	----	C

Tabla 4.4. Familias con mutaciones en el gen *CNGA1*. C cosegrega, NC no cosegrega con la patología en la familia.

En las familias RP-0531 (forma juvenil) y RP-1080 (forma típica) se detectó esta mutación en homocigosis. La figura 4.2.B muestra la segregación de la mutación en la familia, donde se observa que cosegrega con la patología en ambos casos.

En las familias RP-0159 y RP-1147, que presentaron RP típica, se detectó dicha mutación en heterocigosis.

En RP-0159, tras el estudio en la familia mediante secuenciación automática se observa (Figura 4.2.B) que la mutación no cosegrega con la enfermedad.

El estudio familiar para RP-1147 mediante marcadores microsatélites mostró (Figura 4.2.A) la posible implicación de *CNGA1* en la patología por lo que se llevó a cabo el cribado del gen mediante secuenciación automática, sin que se pudiera detectar el segundo alelo mutado.

4.1.2.3. FAMILIAS CON MUTACIÓN EN EL GEN *CRB1*

En tres de las 272 (1,1%) familias estudiadas, una de ellas consanguínea, se detectó una mutación en heterocigosis en el gen *CRB1* mediante el *microarray* de genotipado (Tabla 4.5).

		Mutación 1		Mutación 2		
Familia	Fenotipo	Nucleótido	Proteína	Nucleótido	Proteína	Estudio familiar
RP-0561	RP Juvenil	c.2234 C>T	p.Thr745Met	c.3988G>T	p.Glu1330ter	C
RP-1311	RP Juvenil	c.611_617del	p.Ile205_Gly206delfs	----	----	NF
RP-1106	RP Típica	c.2681 A>G	p.Asn894Ser	----	----	NF

Tabla 4.5. Familias con mutaciones en el gen *CRB1*. C cosegrega, NF no hay familiares para realizar el estudio.

En la familia RP-0561 (forma juvenil) se detectó la mutación c. 2234C>T; p.Thr745Met en heterocigosis. El estudio familiar con marcadores microsatélites confirmó la posible implicación de *CRB1* en la patología (Figura 4.2.A) por lo que se llevó a cabo el cribado del gen mediante secuenciación automática, que mostró la presencia de la mutación c.3988G>T; p.Glu1330ter en heterocigosis descrita previamente en pacientes de RP, pero no incluida en el *microarray* en el momento del estudio. En la figura 4.2 se puede observar la segregación de ambos alelos mutados en la familia.

En las familias RP-1311 (forma juvenil) y RP-1106 (forma típica) se detectaron las mutaciones c.611_617del; p.Ile205_Gly206delfs y c.2681A>G; p.Asn894Ser respectivamente en heterocigosis. El cribado del gen *CRB1* mediante secuenciación automática no mostró ninguna otra variante patogénica en ninguno de los casos.

4.1.2.4. FAMILIAS CON MUTACIÓN EN EL GEN *PDE6A*

En tres de las 272 (1,1%) familias estudiadas se detectó mutación mediante el *microarray* de genotipado en el gen *PDE6A* (Tabla 4.6).

		Mutación 1		Mutación 2		
Familia	Fenotipo	Nucleótido	Proteína	Nucleótido	Proteína	Estudio familiar
RP-0235	RP Juvenil	c.304 C>A	p.Arg102Ser	---	---	NC
RP-0341	RP Juvenil	c.998+1 G>A	c.998+1G>A	c.1705C>A	p.Gly569Lys	C
RP-0881	RP Típica	c.305 G>A	p.Arg102His	c.305 G>A	p.Arg102His	NF

Tabla 4.6. Familias con mutaciones en el gen *PDE6A*. NC no cosegrega, C cosegrega, NF no hay familiares para realizar el estudio.

En la familia RP-0235 (forma juvenil) se detectó la mutación c. 304C>A; p.Arg102Ser en heterocigosis. La figura 4.2.A muestra el estudio familiar mediante marcadores microsatélites donde no se puede descartar la implicación del gen en la patología ya que el gen *PDE6A* se localiza entre los marcadores D5S413 y D5S2013. La mutación no cosegrega en la familia, pues no está presente en el hermano afecto (Figura 4.2), lo que confirma que la mutación estudiada no es responsable de la enfermedad. El estudio se repitió con nuevas muestras para la confirmación de los resultados.

En la familia RP-0341 (forma juvenil) se detectó la mutación c.998+1G>A en heterocigosis. El estudio familiar (Figura 4.2.A) mediante marcadores microsatélites confirmó la posible implicación de *PDE6A* en la patología por lo que se llevó a cabo el cribado del gen, que mostró la presencia de la mutación c.1705C>A; p.Gly569Lys en heterocigosis, mutación asociada previamente a RP, pero no incluida en el *microarray* en el momento del estudio. La figura 4.2 muestra la segregación de ambos alelos mutados en la familia.

La familia RP-0881 (forma típica) presentó la mutación c.305 G>A; p.Arg102His en homocigosis. No se pudo llevar a cabo la segregación de la mutación ya que no se disponía de muestra de otros miembros de la familia.

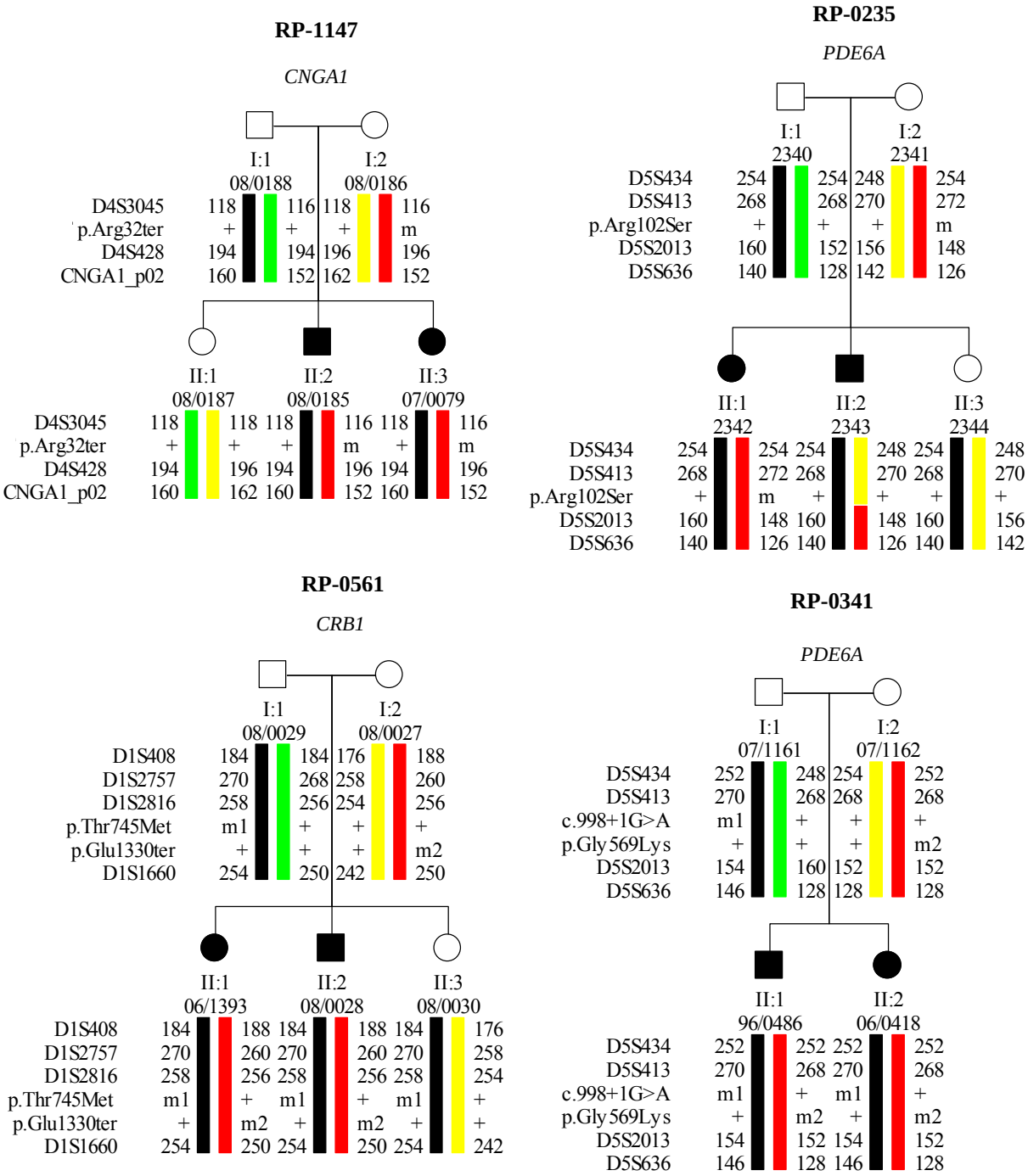


Figura 4.2. A. Estudio de cosegregación de los genes *CNGA1*, *CRB1* y *PDE6A* y mutaciones para las familias RP-1147, RP-0235, RP-0561 y R-0341. "+" alelo normal "m" alelo mutado

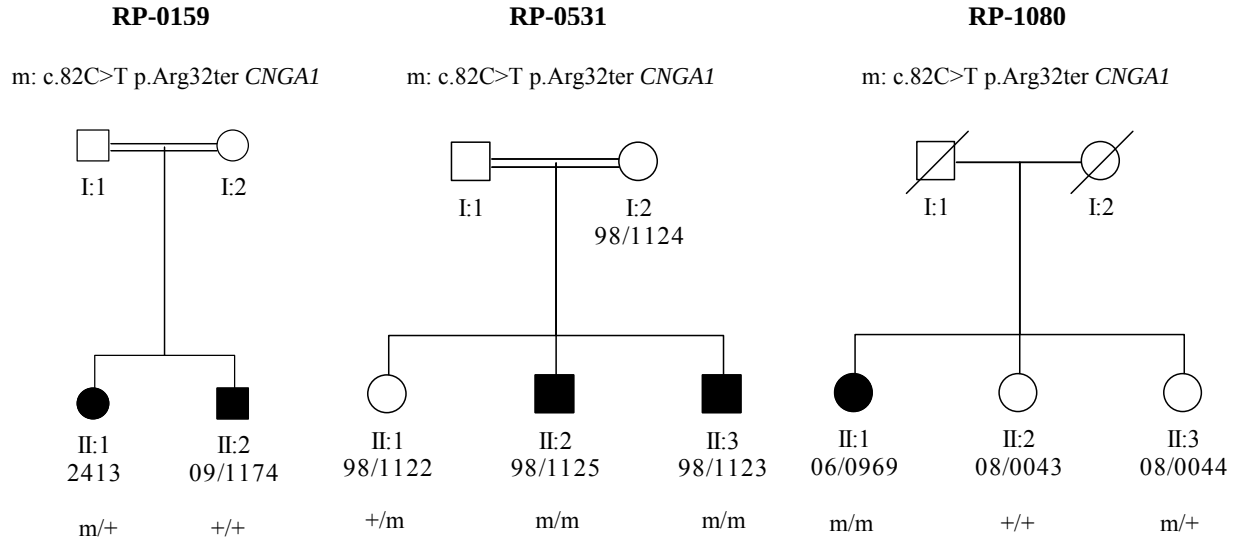


Figura 4.2. B. Segregación de las mutaciones detectadas en las familias RP-1147, RP-0561, RP-0235, RP-0341, RP-0159, RP-0531 y RP-1080. "+" alelo normal "m, m1 y m2" alelos mutados.

4.1.2.5. FAMILIAS CON MUTACIÓN EN EL GEN *PDE6B*

En una de las 272 (0,36%) familias estudiadas se detectó la mutación c.810C>A; p.Cys270ter en homocigosis en el gen *PDE6B*. La familia presenta un fenotipo RP juvenil. La figura 4.5 muestra la segregación de la mutación en la familia.

4.1.2.6. FAMILIAS CON MUTACIÓN EN EL GEN *RDH12*

En tres de las 272 (1,1%) familias estudiadas, clasificadas como RP juvenil, se detectó al menos una mutación en el gen *RDH12* mediante el *microarray* de genotipado (Tabla 4.7).

		Mutación 1		Mutación 2		
Familia	Fenotipo	Nucleótido	Proteína	Nucleótido	Proteína	Estudio familiar
RP-0340	RP Juvenil	c.464 C>T	p.Tyr155Ile	c.464 C>T	p.Tyr155Ile	NF
RP-0379	RP Juvenil	c.375 T>A	p.Asn125Lys	c.701 G>A	p.Arg234His	C
RP-1339	RP Juvenil	c.295C>A	p.Leu99Ile	c.278T>C	p.Leu93Pro^	C

Tabla 4.7. Familias con mutaciones en el gen *RDH12*. NF no hay familiares para realizar el estudio C cosegrega. ^ Mutación nueva descrita en este estudio.

En la familia RP-0340 se detectó la mutación c.464C>T; p.Tyr155Ile en homocigosis. La segregación no se pudo llevar a cabo en la familia ya que no se disponía de muestra de los familiares.

En el caso de la familia RP-0379 se detectaron dos mutaciones, c.375T>C; p.Asn125Lys y c.701G>A; p.Arg234His, en heterocigosis. La figura 4.5 muestra el estudio familiar, donde se observa que ambas mutaciones cosegregan con la patología.

Para la familia RP-1339 se detectó la mutación c.295C>A; p.Leu99Ile en heterocigosis. El cribado del gen *RDH12,* mediante secuenciación automática, mostró la presencia de una nueva variante c.278T>C; p.Leu93Pro en heterocigosis, no descrita previamente en pacientes de RP. La figura 4.5 muestra la segregación de ambos alelos mutados en la familia, donde se observa que cosegregan con la patología en la familia. Para valorar su posible patogenicidad, se llevó a cabo el estudio de dicha mutación en población control, no detectándose el cambio en 100 cromosomas. El análisis *in silico* realizado con el programa *SIFT* indica probable afectación de la función de la proteína con un *score* 0.03, mientras que *Polyphen* predice "no patogenicidad" de la variante. La figura 4.3 muestra la alineación múltiple y conservación de la secuencia de la proteína RDH12 en diferentes especies. La nueva variante se encuentra en el dominio catalítico de la proteína.

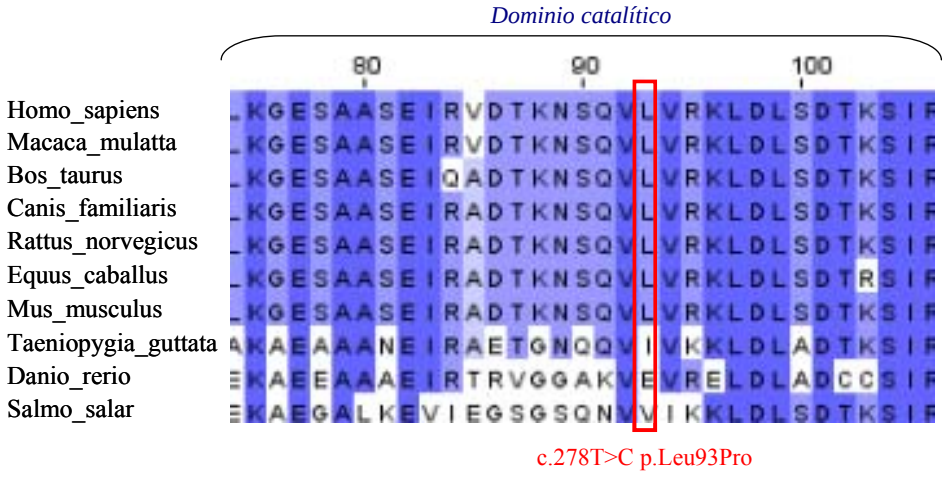


Figura 4.3. Alineación múltiple de la proteína RDH12 en diferentes especies. La conservación de los residuos se marca mediante un código de colores, el color más intenso (azul oscuro) es el más conservado, el color menos intenso (blanco) es el residuo menos conservado. El cuadro rojo indica el residuo afectado (p.Leu93Pro).

4.1.2.7. FAMILIAS CON MUTACIÓN EN EL GEN *RLBP1*

En una de las 272 (0,36%) familias estudiadas se detectó la mutación c.451C>T; p.Arg151Gln en homocigosis en el gen *RLBP1*. La familia presentaba un fenotipo RP juvenil. La figura 4.3 muestra la segregación de la mutación en la familia

4.1.2.8. FAMILIAS CON MUTACIÓN EN EL GEN *RPE65*

En una de las 272 (0,36%) familias estudiadas, afectada de RP precoz, se detectó la mutación c.95-2A>T en heterocigosis en el gen *RPE65*. El cribado del gen *RPE65* mostró la presencia de una nueva variante c.457A>G; p.Thr153Ala en heterocigosis, no descrita previamente en pacientes afectados de RP. La figura 4.5 muestra la segregación de ambos alelos mutados en la familia. Para valorar su posible patogenicidad, se llevó a cabo el estudio de dicha mutación en población control, no detectándose el cambio en 100 cromosomas. El análisis *in silico* realizado con el programa *SIFT* indica probable afectación de la función de la proteína con un *score* 0.0, y *Polyphen* predice "no patogenicidad" de la variante. La figura 4.4 muestra la alineación múltiple de la secuencia y conservación de la proteína RPE65 en diferentes especies. La nueva variante se encuentra en el dominio catalítico de la proteína.

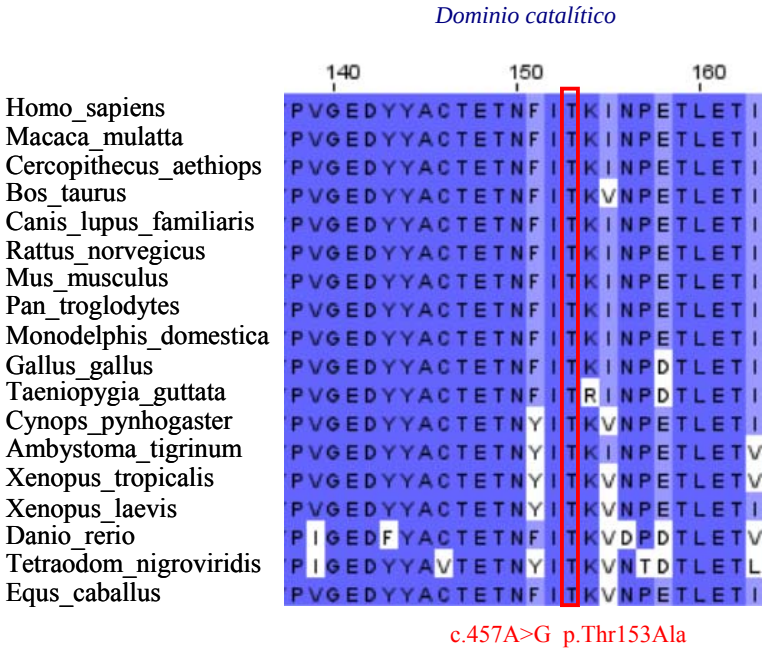


Figura 4.4. Alineación múltiple de la proteína *RPE65* en diferentes especies. La conservación de los residuos se marca mediante un código de colores, el color más intenso (azul oscuro) es el más conservado, el color menos intenso (blanco) es el residuo menos conservado. El cuadro rojo indica el residuo afectado (p.Thr153Ala).

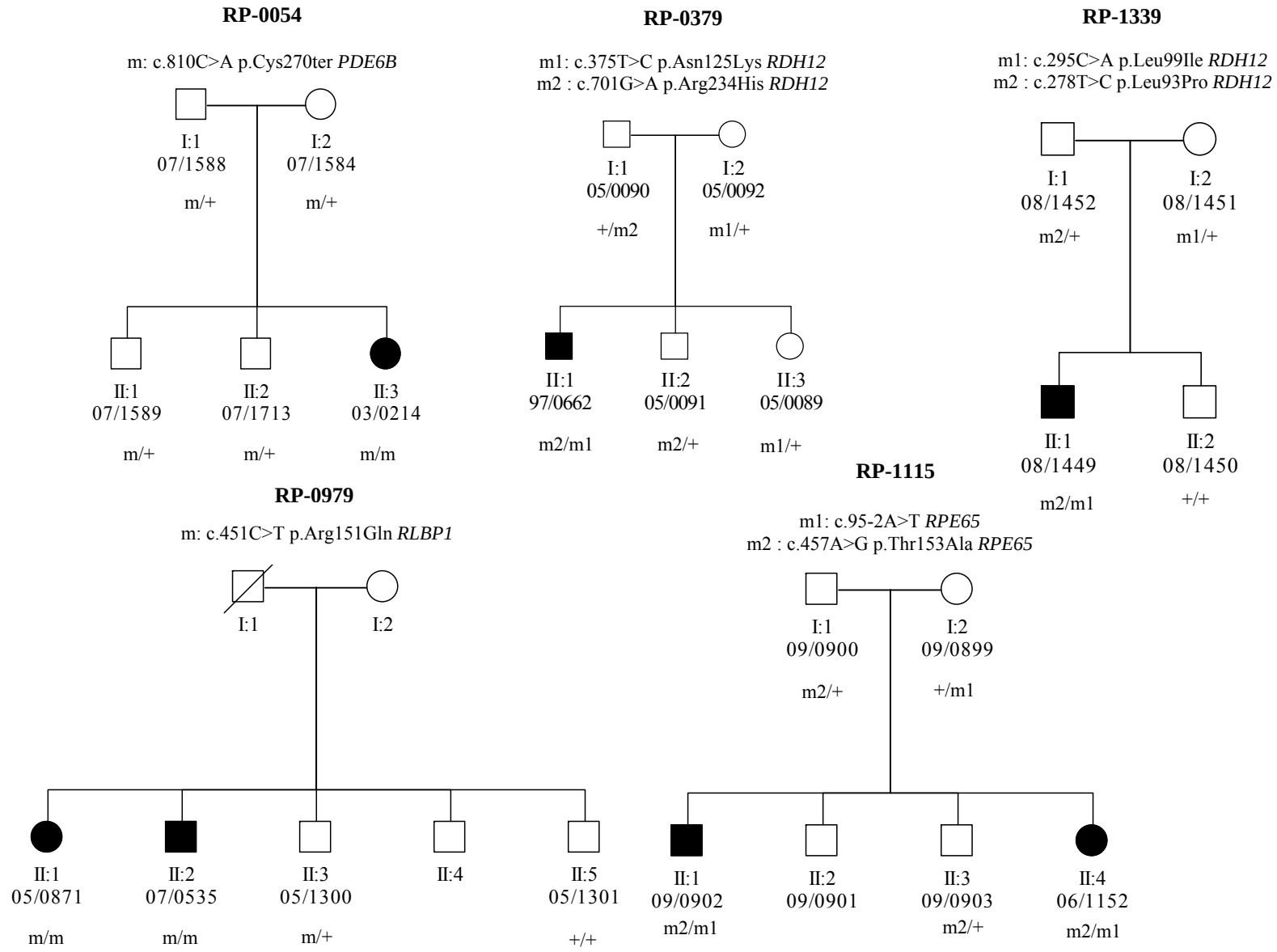


Figura 4.5. Segregación de las mutaciones detectadas en las familias RP-0054, RP-0379, RP-1339, RP-0979 y RP-1115. "+" alelo normal "m, m1 y m2" alelos mutados.

4.1.2.9. FAMILIAS CON MUTACIÓN EN EL GEN *SAG*

En tres de las 272 (1,1%) familias estudiadas se detectó la mutación c.577C>T; p.Arg193ter en el gen *SAG* mediante el *microarray* de genotipado (Tabla 4.8).

		Mutación 1		Mutación 2		
Familia	Fenotipo	Nucleótido	Proteína	Nucleótido	Proteína	Estudio familiar
RP-1206	RP Juvenil	c.577 C>T	p.Arg193ter	c.577 C>T	p.Arg193ter	NF
RP-1023	RP Típica	c.577 C>T	p.Arg193ter	---	----	NF
RP-1292	RP Típica	c.577 C>T	p.Arg193ter	---	----	NC

Tabla 4.8. Familias con mutaciones en el gen *SAG*. NF no hay familiares para realizar el estudio, NC no cosegrega.

En la familia RP-1206 (forma juvenil) se detectó la mutación en homocigosis. La segregación no se pudo llevar a cabo en la familia ya que no se disponía de muestra de los familiares.

Para la familia RP-1023 (forma típica) se detectó la mutación en heterocigosis. El cribado del gen *SAG* mediante secuenciación automática no mostró ninguna otra variante patogénica.

En la familia RP-1292 (forma típica) se detectó la mutación en heterocigosis. El estudio familiar mediante marcadores microsatélites mostró la no implicación de *SAG* en la patología (Figura 4.6), ya que los hermanos afectos no compartían el mismo haplotipo.

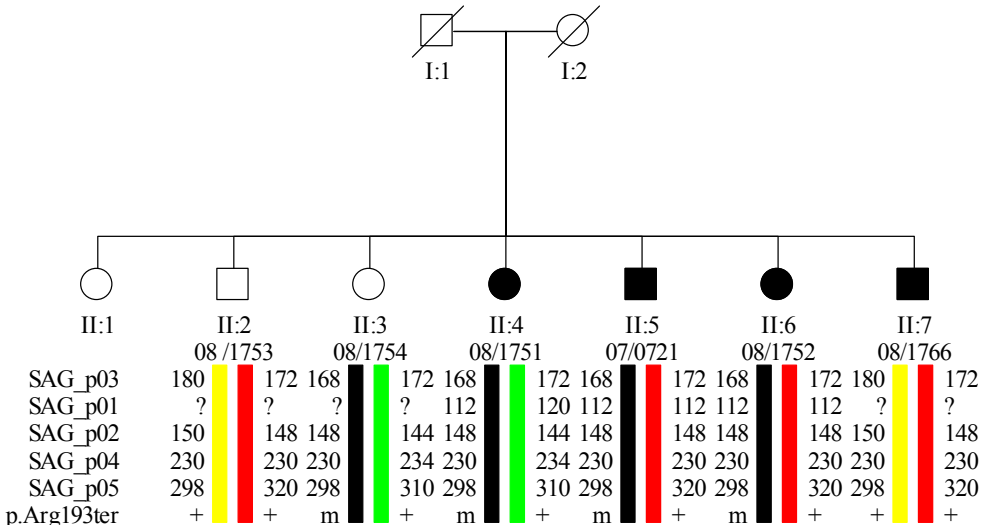


Figura 4.6. Estudio de cosegregación del gen *SAG* para la familia RP-1292. "+" alelo normal "m" alelo mutado.

4.1.2.10. FAMILIAS CON MUTACIÓN EN EL GEN *USH2A*

En 14 de las 272 (5,1%) familias estudiadas, clasificadas como RP típica, se detectó al menos una mutación en el gen *USH2A* mediante el *microarray* de genotipado (Tabla 4.9).

	Mutación 1		Mutación 2		
Familia	Nucleótido	Proteína	Nucleótido	Proteína	Estudio familiar
RP-0134	c.1606T>C	p.Cys536Arg	---	---	NF
RP-0404	c.2167+5G>A	c.2167+5G>A	c.2167+5G>A	c.2167+5G>A	NF
RP-0467	c.2276G>T	p.Cys759Phe	---	---	C
RP-1016	c.2276G>T	p.Cys759Phe	---	---	C
RP-1053	c.2276G>T	p.Cys759Phe	---	---	C
RP-1071	c.2276G>T	p.Cys759Phe	---	---	C
RP-0332	c.2276G>T	p.Cys759Phe	c.2276G>T	p.Cys759Phe	C
RP-0849	c.2276G>T	p.Cys759Phe	c.2276G>T	p.Cys759Phe	C
RP-0930	c.2276G>T	p.Cys759Phe	c.2276G>T	p.Cys759Phe	C
RP-0721	c.2276G>T	p.Cys759Phe	c. 3713C>G	**p.Thr1238Arg^**	C
RP-0204	c.2276G>T	p.Cys759Phe	c.9799T>C	p.Cys3267Arg	NF
RP-0653	c.2276G>T	p.Cys759Phe	c.12575G>A	p.Arg4192His^	C
RP-1059	c.2276G>T	p.Cys759Phe	c.13745delT	**p.Ile4582Lysfs14^**	C
RP-0260	c.9799T>C	p.Cys3267Arg	c.10073G>A	p.Cys3358Tyr^	C

Tabla 4.9. Familias con mutaciones en el gen *USH2A*. NF no hay familiares para realizar el estudio, C cosegrega. ^ Mutación detectada mediante secuenciación automática. En negrita mutación nueva descrita en este estudio.

En la familia RP-0134 se detectó la mutación c.1606T>C; p.Cys536Arg en heterocigosis. No se pudo continuar con el estudio debido a la mala calidad de la muestra de ADN del paciente y a que no fue posible la obtención de una nueva muestra.

Para la familia RP-0404 se detectó la mutación c.2167+5G>A en homocigosis. No se pudo llevar a cabo la cosegregación de las mutaciones ya que no se disponía de muestra de los familiares.

En 11 de las familias se detectó la mutación c.2276G>T; p.Cys759Phe, en 3 de ellas en homocigosis y en 8 en heterocigosis.

Las familias RP-0467, RP-1016, RP-1053, RP-1071, RP-0721, RP-0204, RP-0653 y RP-1059 presentaron la mutación en heterocigosis. El estudio familiar (Figura 4.8 y 4.9) mostró la implicación del gen *USH2A* en la patología en todos los casos, excepto para la

familia RP-0204 ya que no se disponía de muestra de los familiares. La cosegregación llevó al cribado completo del gen mediante secuenciación automática, no detectándose el segundo alelo mutado en las familias RP-0467, RP-1016, RP-1053 y RP-1071. Para las familias RP-0721 y RP-1059 el análisis mostró dos nuevas variantes, c.3713C>G; p.Thr1238Arg y c.13745delT; p.Ile4582Lysfs14 respectivamente, no descritas previamente en pacientes afectados de RP. Para valorar la posible patogenicidad de la nueva variante c.3713C>G; p.Thr1238Arg se estudió dicha variación en población control, no detectándose el cambio en 100 cromosomas. El análisis *in silico* realizado con el programa *SIFT* indica probable afectación de la función de la proteína con un *score* 0.00, y *Polyphen* predice probable "patogenicidad" de la variante. La figura 4.7 muestra la alineación múltiple y conservación de la secuencia de la proteína USH2A en diferentes especies. La nueva variante se encuentra entre dos de los dominios fibronectina tipo III. En la familia RP-0653 se detectó la mutación c.12575G>A; p.Arg4192His, variación descrita previamente. La figura 4.9 muestra la cosegregación de ambos alelos mutados en la familia.

En las familias RP-0332, RP-0849 y RP-0930, con el alelo en homocigosis, se realizó la segregación de la mutación y se demostró que cosegregaba con la enfermedad en todos los casos (Figura 4.10).

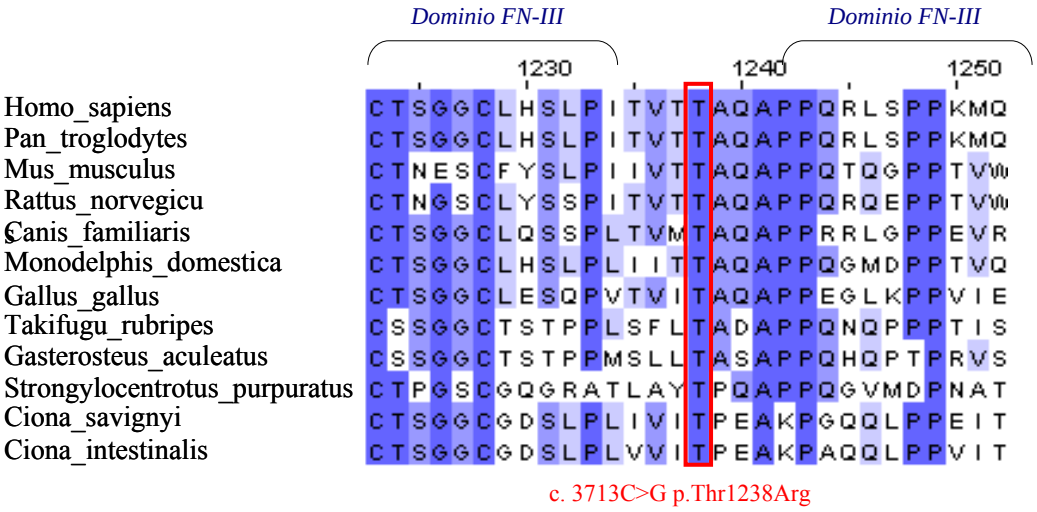


Figura 4.7. Alineación múltiple de la proteína USH2A en diferentes especies. La conservación de los residuos se marca mediante un código de colores, el color más intenso (azul oscuro) es el más conservado, el color menos intenso (blanco) es el residuo menos conservado. En el cuadro rojo indica el residuo afectado (p.Thr1238Arg). FN-III fibronectina tipo III.

En el caso de la familia RP-0260 se detectó la mutación c.9799T>C; p.Cys3267Arg en heterocigosis mediante el *microarray* de genotipado. El estudio familiar (Figura 4.9) no descarta la implicación de *USH2A* en la patología por lo que se realizó el cribado del gen, que mostró la presencia de la mutación c.10073G>A; p.Cys3358ter en heterocigosis, mutación descrita previamente pero no incluida en el *microarray* en el momento del estudio.

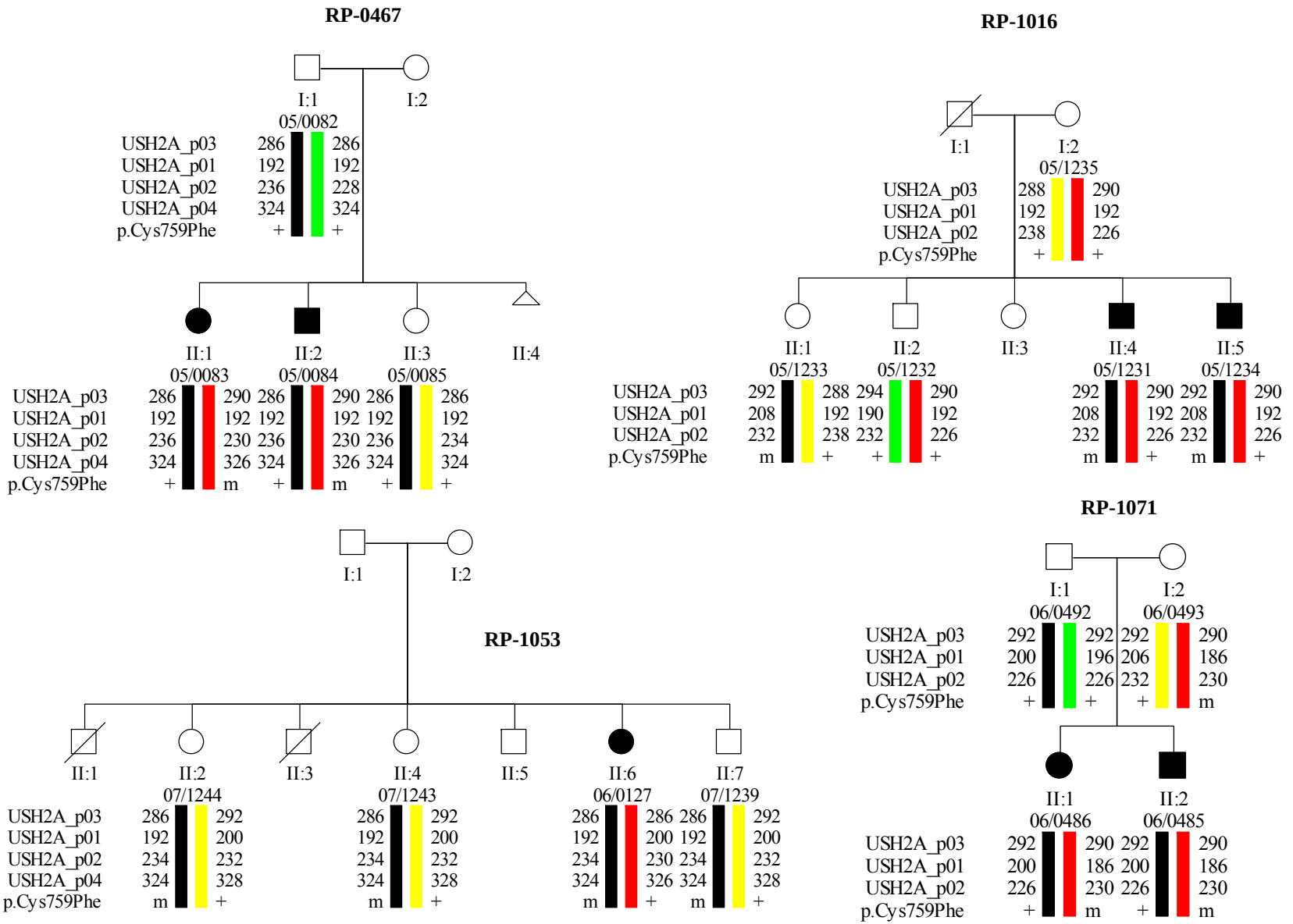


Figura 4.8. Estudio de cosegregación del gen *USH2A* para las familias RP-0467, RP-1016, RP-1053 y RP-1071.

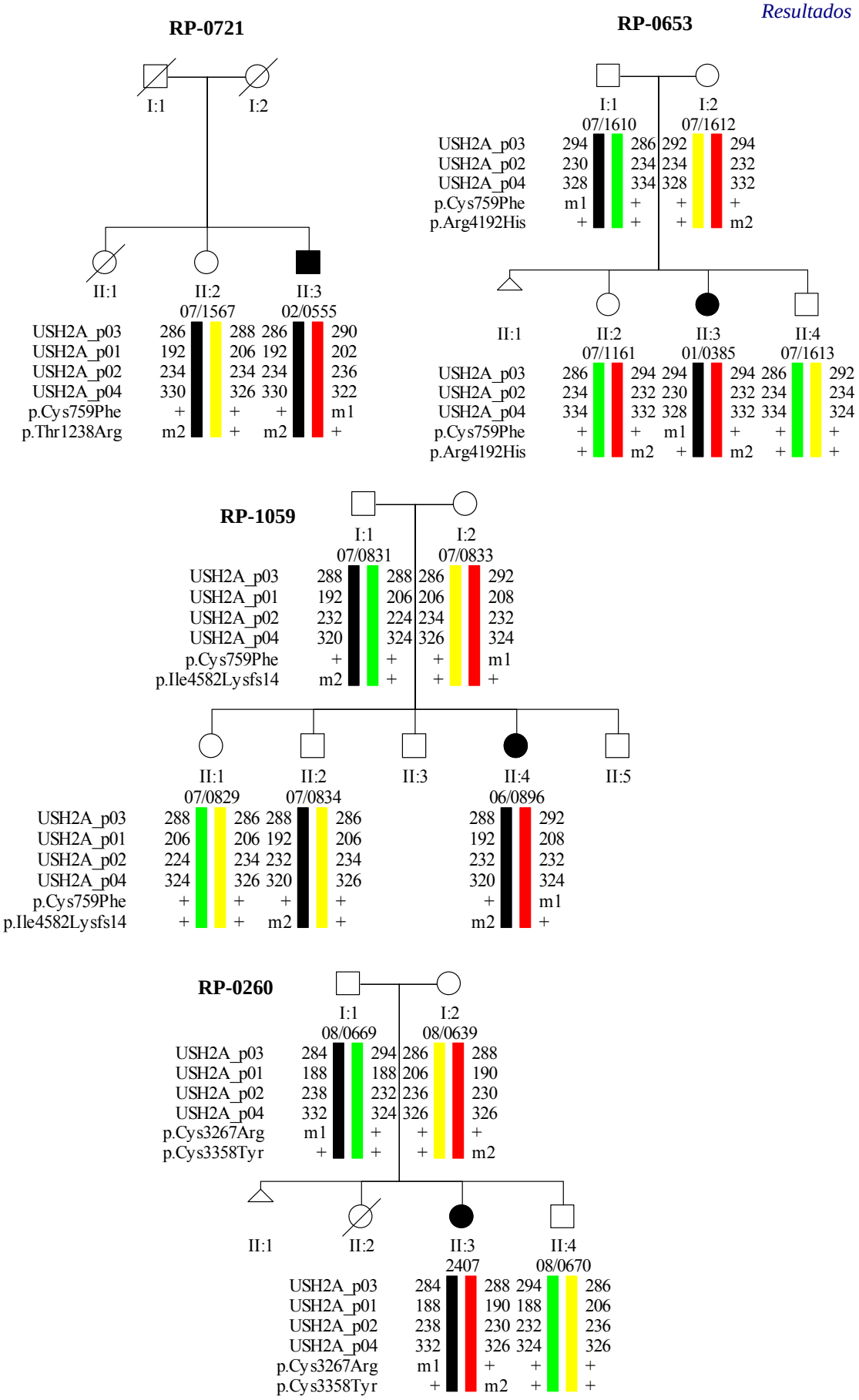


Figura 4.9. Estudio de cosegregación del gen *USH2A* para las familias RP-0721, RP-0653, RP-1059 y RP-0260. Segregación de las mutaciones detectadas en el gen *USH2A* en las familias RP-0721, RP-0653, RP-1059 y RP-0260. "+" alelo normal "m, m1 y m2" alelos mutados.

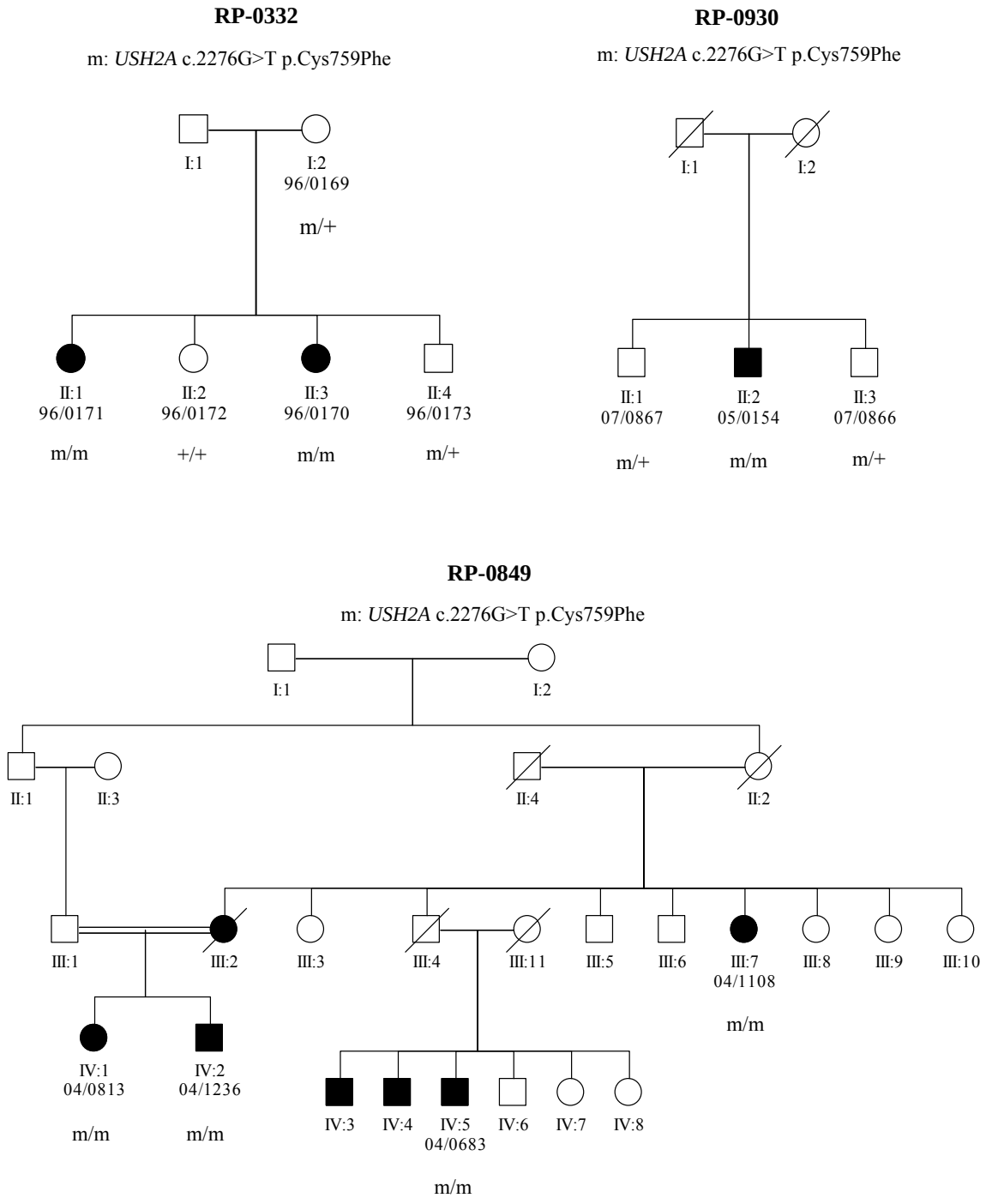


Figura 4.10. Segregación de las mutaciones detectadas en el gen *USH2A* en las familias RP-0332, RP-0930 y RP-0849. "+" alelo normal "m" alelo mutado.

4.1.3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS APARTADOS 4.1.1 y 4.1.2.

Una vez finalizado el análisis descrito en los apartados 4.1.1 y 4.1.2, se detectaron dos falsos positivos en las familias RP-0337 y RP-1015 en las que el *microarray* detectó las mutaciones c.5191_5192delAT p.Met1731fs en *USH2A* y c.523 T>C p.Ser175Pro en *RDH12* respectivamente, que no se observaron tras la comprobación mediante secuenciación automática; hubo un falso negativo, ya que el *microarray* no detectó la mutación c. 1705C>A p.Gly569Lys en *PDE6A* en la familia RP-0341. Para las familias RP-0561, RP-0260 y RP-0653 se detectaron tras secuenciación automática las mutaciones c.3988G>T p.Glu1330ter en *CRB1* y c.10073G>A p.Cys3358Tyr, c.12575G>A p.Arg4192His en *USH2A* respectivamente. Estas variaciones fueron descritas previamente, sin embargo, no estaban incluidas en el *microarray* de genotipado en el momento del estudio.

4.1.3.1. FAMILIAS CARACTERIZADAS

Tras el estudio realizado por ambas técnicas se han caracterizado totalmente 30 de las 42 familias que presentaron mutación tras el uso del *microarray* de genotipado. Por lo tanto, el porcentaje de familias caracterizadas es del 11% (30 de 272) del total de las familias estudiadas, siendo del 4,5% (12 de 272) de las familias donde se identificó un único alelo mutado.

Analizando los resultados obtenidos en base a la **clasificación genética** se observa que, en el grupo de las familias sRP se caracterizaron 17 de las 22 familias que presentaron al menos una mutación, mientras que para el grupo de las arRP se caracterizaron 13 de 20 de las familias (Ver tabla 4.10 y 4.11).

La figura 4.11 muestra el porcentaje de familias sRP y arRP caracterizadas tras el estudio, siendo del 10% (17 de 165) y 12% (13 de 107) del total de las familias en los grupos sRP y arRP respectivamente. El análisis *Chi*-cuadrado (χ^2=0,23 p=0,6349) no mostró diferencias significativas entre ambos grupos por lo que la eficiencia de la estrategia a seguir es la misma para los grupos sRP y arRP.

Según la **clasificación clínica**, en el grupo de las familias RP juvenil, se caracterizaron 10 de las 12 familias que presentaron al menos una mutación (Tabla 4.10), mientras que para las familias clasificadas como RP típica se caracterizaron 20 de las 30 familias (Tabla 4.11).

La figura 4.11 muestra el porcentaje de familias caracterizadas tras el estudio, siendo el 12% (10 de 86) y el 11% (20 de 186) en los grupos RP Juvenil y RP típica respectivamente. Con el objetivo de determinar si el abordaje molecular permite la caracterización del mismo número de familias independientemente del grupo clínico al que pertenezcan, se llevó a cabo un análisis *chi*-cuadrado (χ^2=0,05 p=0,8303) tras el que se observó que no existen diferencias significativas entre ambos grupos (RP juvenil *vs* RP típica). La eficiencia de la estrategia llevada a cabo es la misma para los grupos RP juvenil y RP típica.

Como se observa en las tablas 4.10 y 4.11 el cribado de genes mediante secuenciación automática ha permitido la detección de cuatro nuevas variantes patogénicas en los genes *RDH12*, *RPE65* y *USH2A* y cuatro variantes descritas previamente, pero no incluidas en el *microarray* en el momento del estudio.

RP Juvenil								
			Mutación 1			Mutación 2		
Familia	Clasificación genética	Gen	Nucleótido	Proteína	Referencia	Nucleótido	Proteína	Referencia
RP-0531	arRP	*CNGA1*	c.82 C>T	p.Arg28ter	Paloma *et al*., 2002	c.82 C>T	p.Arg28ter	Paloma *et al*., 2002
RP-0561	arRP	*CRB1*	c.2234 C>T	p.Thr745Met	den Hollander *et al*., 1999	c.3988G>T	p.Glu1330ter^	Vallespín *et al*., 2006
RP-1311	sRP	*CRB1*	c.611_617del	p.Ile205_Gly206delfs	Lotery *et al*., 2001	---	---	---
RP-0235	arRP	*PDE6A*	c.304 C>A	p.Arg102Ser	Dryja *et al*., 1999	---	---	---
RP-0341	arRP	*PDE6A*	c.998+1 G>A	Defecto de *splicing*	Dryja *et al*., 1999	c.1705C>A	p.Gly569Lys^	Dryja *et al*., 1999
RP-0054	sRP	*PDE6B*	c.810 C>A	p.Cys270ter	Danciger *et al*., 1996	c.810 C>A	p.Cys270ter	Danciger *et al*., 1996
RP-0340	arRP	*RDH12*	c.464 C>T	p.Tyr155Ile	Thompson *et al*., 2005	c.464 C>T	p.Tyr155Ile	Thompson *et al*., 2005
RP-0379	sRP	*RDH12*	c.375 T>A	p.Asn125Lys	Thompson *et al*., 2005	c.701 G>A	p.Arg234His	Thompson *et al*., 2005
RP-1339	sRP	*RDH12*	c.295 C>A	p.Leu99Ile	Perrault *et al*., 2004	**c.278T>C**	**p.Leu93Pro^**	Ávila-Fernández *et al*., 2010
RP-0979	arRP	*RLBP1*	c.451 C>T	p.Arg151Gln	Maw *et al*., 1997	c.451 C>T	p.Arg151Gln	Maw *et al*., 1997
RP-1115	arRP	*RPE65*	c.95-2 A>T	Defecto de *splicing*	Hanein *et al*., 2004	**c.457A>G**	**p.Thr153Ala^**	Ávila-Fernández *et al*., 2010
RP-1206	sRP	*SAG*	c.577 C>T	p.Arg193ter	Maw *et al*., 1998	c.577 C>T	p.Arg193ter	*Maw et al*., 1998

Tabla 4.10. Mutaciones identificadas tras el análisis molecular en pacientes afectados de RP Juvenil. ^ Variantes detectadas por secuenciación automática (Las nuevas variantes aparecen en negrita).

RP Típica								
			Mutación 1			Mutación 2		
Familia	Clasificación genética	Gen	Nucleótido	Proteína	Referencia	Nucleótido	Proteína	Referencia
RP-0211	sRP	*CERKL*	c.769 C>T	p.Arg257ter	Tuson *et al* .,2004	c.769 C>T	p.Arg257ter	Tuson *et al* .,2004
RP-0218	sRP	*CERKL*	c.769 C>T	p.Arg257ter	Tuson *et al* .,2004	c.769 C>T	p.Arg257ter	Tuson *et al* .,2004
RP-0320	arRP	*CERKL*	c.769 C>T	p.Arg257ter	Tuson *et al* .,2004	c.769 C>T	p.Arg257ter	Tuson *et al* .,2004
RP-0325	sRP	*CERKL*	c.769 C>T	p.Arg257ter	Tuson *et al* .,2004	c.769 C>T	p.Arg257ter	Tuson *et al* .,2004
RP-0535	arRP	*CERKL*	c.769 C>T	p.Arg257ter	Tuson *et al* .,2004	c.769 C>T	p.Arg257ter	Tuson *et al* .,2004
RP-0595	arRP	*CERKL*	c.769 C>T	p.Arg257ter	Tuson *et al* .,2004	c.769 C>T	p.Arg257ter	Tuson *et al* .,2004
RP-0657	sRP	*CERKL*	c.769 C>T	p.Arg257ter	Tuson *et al* .,2004	c.769 C>T	p.Arg257ter	Tuson *et al* .,2004
RP-0828	sRP	*CERKL*	c.769 C>T	p.Arg257ter	Tuson *et al* .,2004	c.769 C>T	p.Arg257ter	Tuson *et al* .,2004
RP-1159	arRP	*CERKL*	c.769 C>T	p.Arg257ter	Tuson *et al* .,2004	c.769 C>T	p.Arg257ter	Tuson *et al* .,2004
RP-0159	arRP	*CNGA1*	c.94 C>T	p.Arg28ter	Paloma *et al*., 2002	---	---	---
RP-1080	sRP	*CNGA1*	c.94 C>T	p.Arg28ter	Paloma *et al*., 2002	c.94 C>T	p.Arg28ter	Paloma *et al*., 2002
RP-1147	arRP	*CNGA1*	c.94 C>T	p.Arg28ter	Paloma *et al*., 2002	---	---	---
RP-1106	sRP	*CRB1*	c.2681 A>G	p.Asn894Ser	den Hollander *et al*., 2001	---	---	---
RP-0881	sRP	*PDE6A*	c.305 G>A	p.Arg102His	Dryja *et al*., 1999	c.305 G>A	p.Arg102His	Dryja *et al*., 1999
RP-1023	sRP	*SAG*	c.577 C>T	p.Arg193ter	Maw *et al*., 1998	---	---	---
RP-1292	arRP	*SAG*	c.577 C>T	p.Arg193ter	Maw *et al*., 1998	---	---	---
RP-0134	sRP	*USH2A*	c.1606T>C	p.Cys536Arg	Dreyer *et al*., 2000	---	---	---
RP-0204	arRP	*USH2A*	c.2276G>T	p.Cys759Phe	Rivolta *et al*., 2000	c.9799T>C	p.Cys3267Arg	Jaijo *et al*., 2009
RP-0260	sRP	*USH2A*	c.9799T>C	p.Cys3267Arg	Jaijo *et al*., 2009	c.10073G>A	p.Cys3358Tyr^	McGee *et al*., 2010
RP-0332	arRP	*USH2A*	c.2276G>T	p.Cys759Phe	Rivolta *et al*., 2000	c.2276G>T	p.Cys759Phe	Rivolta *et al*., 2000

Tabla 4.11. Mutaciones identificadas tras el análisis molecular en pacientes afectados de RP Típica. ^ Variantes detectadas por secuenciación automática (Las nuevas variantes aparecen en negrita).

RP Típica								
			Mutación 1			Mutación 2		
Familia	Clasificación genética	Gen	Nucleótido	Proteína	Referencia	Nucleótido	Proteína	Referencia
RP-0404	sRP	*USH2A*	c.2167+5G>A	Defecto de *splicing*	Nájera *et al*., 2002	c.2167+5G>A	Defecto de *splicing*	Nájera *et al*., 2002
RP-0467	arRP	*USH2A*	c.2276G>T	p.Cys759Phe	Rivolta *et al*., 2000	---	---	---
RP-0653	sRP	*USH2A*	c.2276G>T	p.Cys759Phe	Rivolta *et al*., 2000	c.12575G>A	p.Arg4192His^	McGee *et al*., 2010
RP-0721	sRP	*USH2A*	c.2276G>T	p.Cys759Phe	Rivolta *et al*., 2000	**c. 3713C>G**	**p.Thr1238Arg^**	Ávila-Fernández *et al*., 2010
RP-0849	arRP	*USH2A*	c.2276G>T	p.Cys759Phe	Rivolta *et al*., 2000	c.2276G>T	p.Cys759Phe	Rivolta *et al*., 2000
RP-0930	sRP	*USH2A*	c.2276G>T	p.Cys759Phe	Rivolta *et al*., 2000	c.2276G>T	p.Cys759Phe	Rivolta *et al*., 2000
RP-1016	arRP	*USH2A*	c.2276G>T	p.Cys759Phe	Rivolta *et al*., 2000	---	---	---
RP-1053	sRP	*USH2A*	c.2276G>T	p.Cys759Phe	Rivolta *et al*., 2000	---	---	---
RP-1059	sRP	*USH2A*	c.2276G>T	p.Cys759Phe	Rivolta *et al*., 2000	**c.13745delT**	**p.Ile4582LysfsX14^**	Ávila-Fernández *et al*., 2010
RP-1071	arRP	*USH2A*	c.2276G>T	p.Cys759Phe	Rivolta *et al*., 2000	---	---	---

Tabla 4.11. Mutaciones identificadas tras el análisis molecular en pacientes afectados de RP Típica. ^ Variantes detectadas por secuenciación automática (Las nuevas variantes aparecen en negrita).

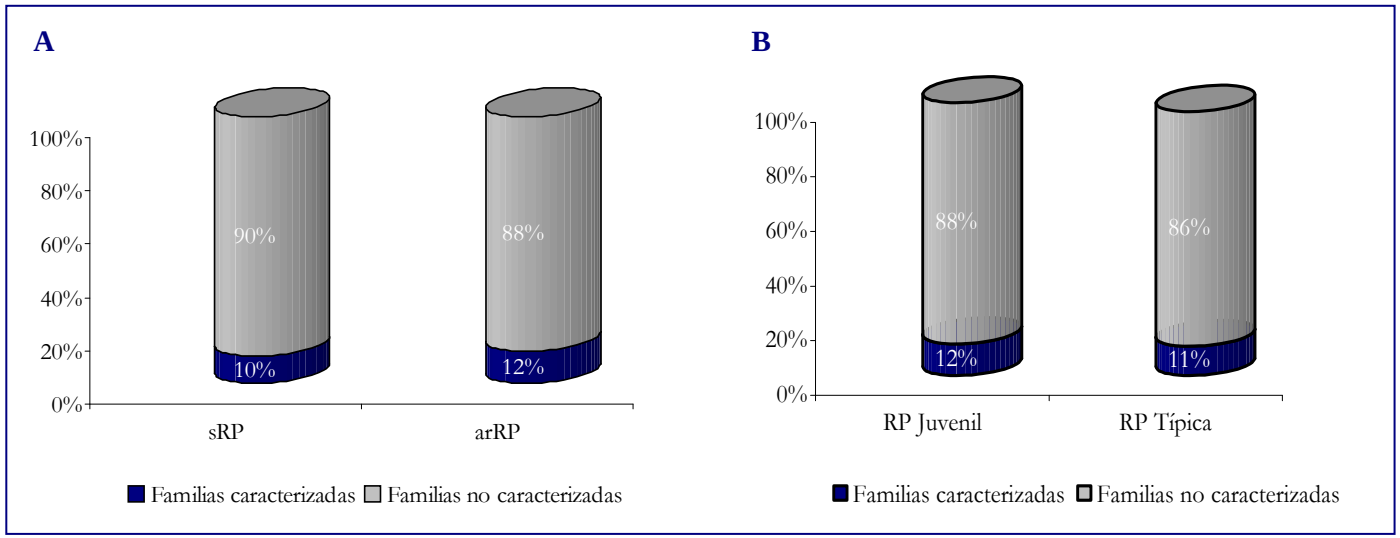


Figura 4.11. Porcentaje de familias caracterizadas tras el estudio **A.** sRP *vs* arRP. El análisis *Chi*-cuadrado mostró χ^2=0,23 p=0,6349, por lo que no hay diferencias significativas entre ambos grupos. **B.** RP juvenil *vs* RP típica. El análisis *Chi*-cuadrado mostró χ^2=0,05 p=0,8303, por lo que no hay diferencias significativas entre ambos grupos.

4.1.3.2. ANÁLISIS DE HOMOCIGOSIDAD. FAMILIAS CONSANGUÍNEAS *VS* NO CONSANGUÍNEAS

Se analizaron los resultados obtenidos con el fin de establecer el porcentaje de familias que presentan una mutación en homocigosis en población española afecta de arRP y sRP. El 66,6% (20 de 30) del total de las familias caracterizadas, presentaron una mutación en homocigosis, impedientemente de si eran consanguíneas o no.

Cuando analizamos los resultados en función de la consanguinidad de las familias, un total de 58 de las 272 familias estudiadas presentaban consanguinidad. Tras el estudio realizado se caracterizó a 10 de las 58 familias estudiadas, de las cuales el 70% (7 de 10) presentó una mutación en homocigosis. Para las familias no consanguíneas, presentaron mutación en homocigosis el 65% (13 de 20).

4.1.3.3. ESPECTRO DE GENES RESPONSABLES EN POBLACIÓN ESPAÑOLA

Para analizar el espectro de genes responsables en nuestra cohorte de pacientes no se han considerado aquellas familias en las que el gen afectado no cosegrega con la patología.

La figura 4.12 muestra la comparación de la distribución de los genes implicados en el grupo de pacientes sRP frente al grupo arRP. Tal y como se observa para ambos grupos, el gen con mayor tasa de mutación es el gen *USH2A*, seguido del gen *CERKL*. Para analizar estos resultados se realizó un test de *Fisher* (p=0,9225), con lo que se confirma que no existen diferencias en la distribución de los genes implicados según **clasificación genética**.

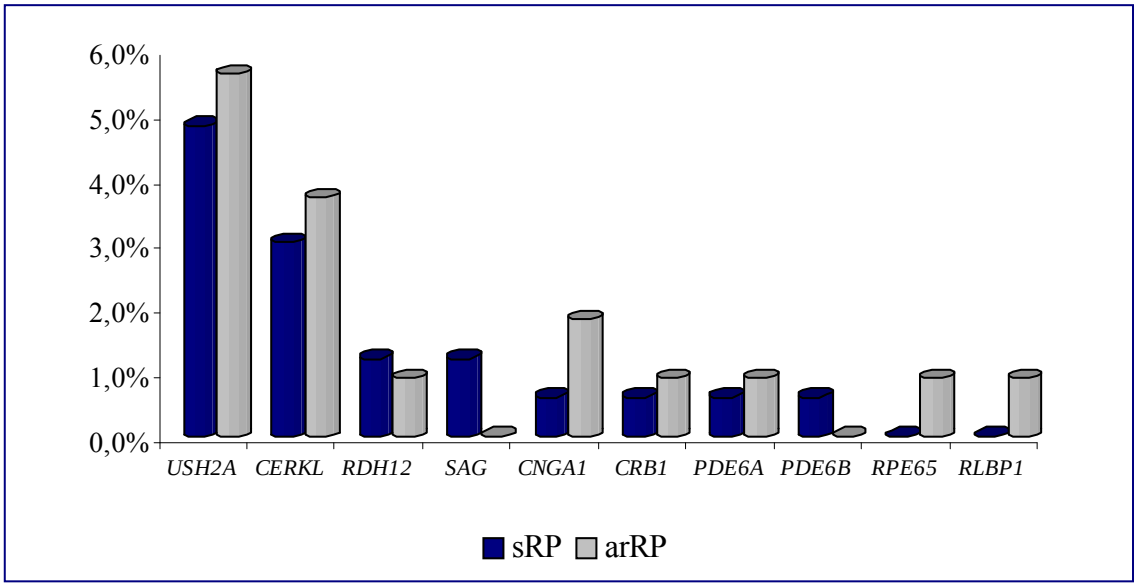


Figura 4.12. Representación de la distribución de los genes implicados para los grupos sRP *vs* arRP.

En cuanto a la **clasificación clínica**, para el grupo de los pacientes afectados de RP juvenil, el gen con mayor tasa de mutación es el gen *RDH12,* responsable del 3,5% (3 de 86) de las familias afectadas, seguido del gen *CRB1* con el 2,3% (2 de 86). Para el grupo de los pacientes afectados de RP típica el gen con mayor tasa de mutación es el gen *USH2A* responsable del 7,5% de las familias estudiadas (14 de 186), seguido del gen *CERKL* con un 4,8% (9 de 186) de las familias. Ver figura 4.13. En este caso, el test *Fisher* ($p=1,14x10^{-6}$) indica diferencias significativas entre ambos grupos, por lo que la distribución de los genes implicados es distinta para los grupos RP juvenil y RP típica.

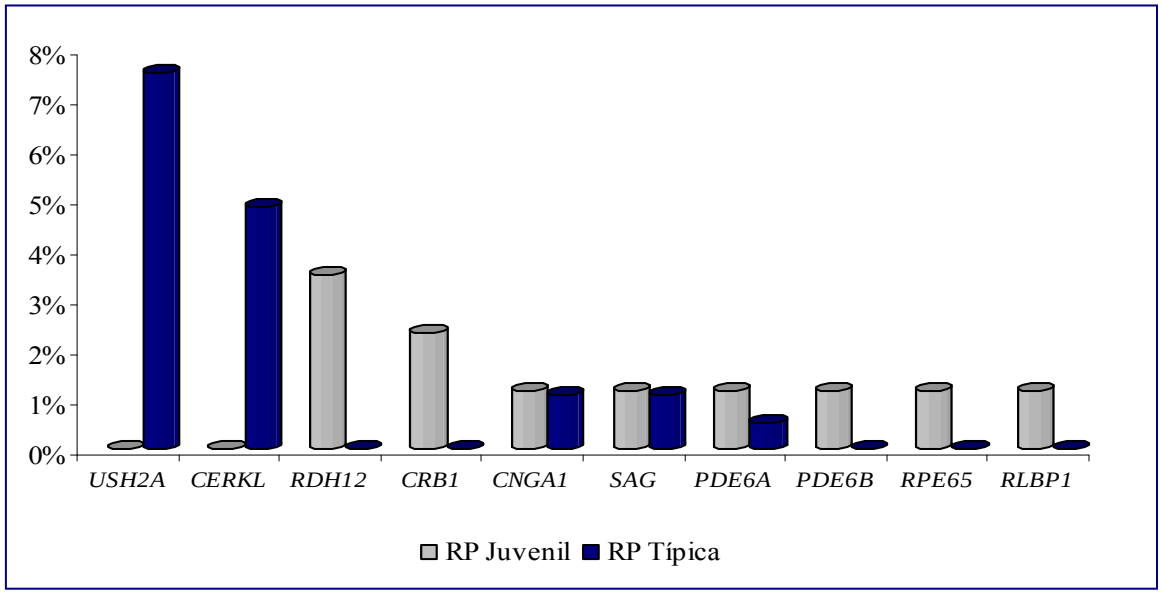


Figura 4.13. Representación de la distribución de los genes implicados para los grupos RP típica *vs* RP juvenil.

4.1.3.4. MUTACIONES FRECUENTES

Una vez analizados los genes implicados en nuestra población en los distintos grupos de pacientes, se analizaron las mutaciones más frecuentes según clasificación clínica. Mientras que para las familias afectadas de **RP juvenil** no se observa (Tabla 4.9) ninguna mutación frecuente, en el grupo de los pacientes afectados de **RP típica** (Tabla 4.10) la mutación más prevalente es p.Arg257ter en el gen *CERKL* que representa el 4,8% (18 de 372) de los alelos mutados, estando presente en el 4,8% (9 de 186) del total de las familias estudiadas ya que es la única mutación detectada en es gen. Esta mutación va seguida de la mutación p.Cys759Phe en el gen *USH2A*, que representa el 3,7% (14 de 372) de los alelos mutados, y que se encuentra en el 6% (11 de 186) del total de las familias estudiadas.

Mutación p.Arg257ter en el gen *CERKL*

Al observar que la mutación p.Arg257ter era la más frecuente en nuestro grupo de pacientes afectados de RP típica y con el objetivo de determinar si se trataba de una mutación procedente de un ancestro común, se llevó a cabo el análisis de haplotipos mediante la técnica del *SNaPshot*. En la tabla 4.12 se muestra el haplotipo asociado al alelo que presenta la mutación p.Arg257ter en el gen *CERKL* para siete de las familias. En el momento del estudio no se disponía de muestra de las familias RP-0657 y RP-1159.

	RP-0211	RP-0218	RP-0320	RP-0325	RP-0535	RP-0595	RP-0828
rs720453	G	G	G	G	G	G	G
rs155107	C	C	C	C	C	C	C
gen *CERKL*							
rs1047307 (intragénico)	C	C	C	C	C	C	C
rs1449255 (intragénico)	G	G	G	G	G	G	G

Tabla 4.12. Haplotipo asociado a la mutación p.Arg257ter en el gen *CERKL* en las distintas familias.

También se estudió la procedencia geográfica de las familias con la mutación p.Arg257ter en el gen *CERKL*. En la figura 4.14 se representa el origen geográfico de los abuelos del *probandus* para cada familia, no observándose un patrón geográfico asociado a la mutación.

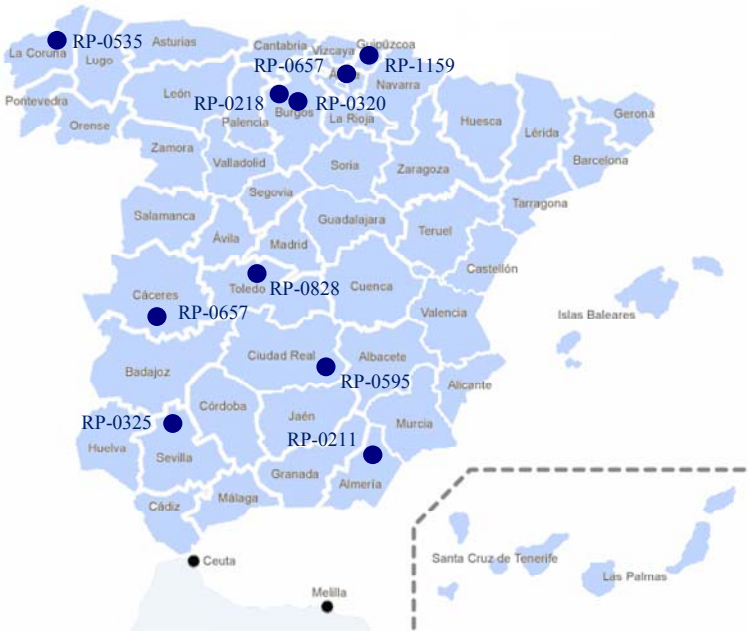


Figura 4.14. Mapa de España. Distribución geográfica de las familias que presentan la mutación p.Arg257ter en el gen *CERKL*. En el mapa queda representado el origen geográfico de los abuelos del *probandus* para cada familia.

Mutación p.Cys759Phe en el gen *USH2A*

Diferentes estudios confirman que la mutación p.Cys759Phe se encuentra en algunos casos en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo p.His752His. En nuestra cohorte de pacientes con la mutación p.Cys759Phe se observó que el polimorfismo está asociado a 12 de los 14 alelos mutados. En la figura 4.15 se representa la procedencia geográfica del abuelo portador de la mutación asociada o no el polimorfismo, en los casos en los que se pudo establecer la fase.

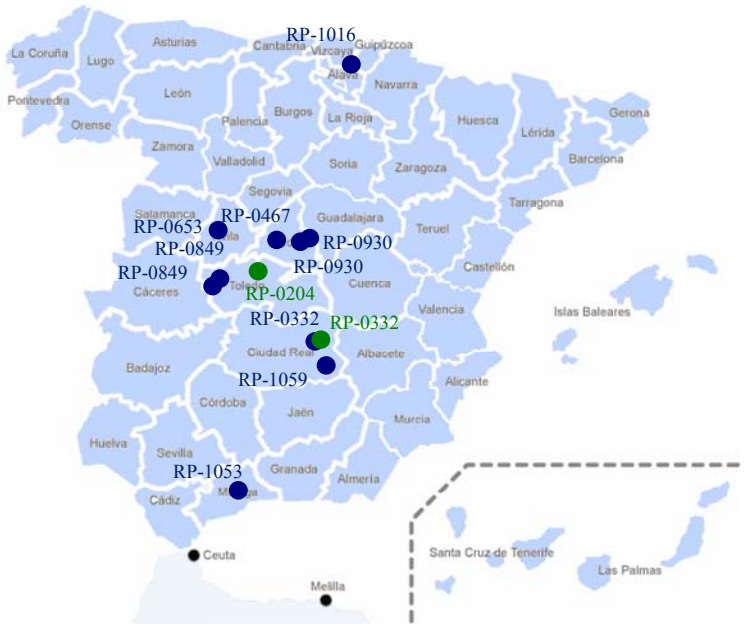


Figura 4.15. Mapa de España. Origen geográfico de los abuelos del *probandus* que presentan la mutación p.Cys759Phe en el gen *USH2A* En azul mutación asociada al polimorfismo p.His752His. En verde mutación no asociada a p.His752His.

Los resultados obtenidos en los apartados 4.1.1, 4.1.2 y 4.1.3 quedan recogidos en el Anexo IV [Ávila-Fernández *et al*., 2010].

4.1.4. RESULTADOS DERIVADOS DEL MAPEO DE HOMOCIGOSIDAD

En este apartado se describen los resultados obtenidos tras el uso del *array* de SNPs. Mediante esta herramienta se han estudiado un total de 43 individuos, de los cuales 42 eran afectos y uno sano, pertenecientes a 17 familias consanguíneas afectadas de arRP y una familia consanguínea sRP, nueve RP juveniles y nueve RP típicas, en las cuales no se detectó ningún alelo mutado tras el cribado con el *microarray* de genotipado específico para arRP.

4.1.4.1. REGIONES DE HOMOCIGOSIDAD

De las 18 familias estudiadas, 5 de ellas fueron genotipadas con el *array Infinium II HumanLinkage-12 panels* II, que contiene 6.090 marcadores, y las 13 restantes con el *array HumanCytoSNP12,* con 220.000 marcadores. Los datos recogidos del *array* de SNPs fueron analizados mediante el uso del programa *EasyLinkage Plus v5.08* con el módulo "*GeneHunter Multipoint Linkage Analysis"* que permitió determinar las regiones de ligamiento para cada una de las familias estudiadas. Para determinar las regiones de ligamiento relevantes se considero el *LOD-Score*, que varía de unas familias a otras en función de la estructura familiar y el número de individuos analizados. Las regiones de ligamiento obtenidas para cada una de las familias analizadas se muestran en el anexo III. Dicha regiones fueron analizadas manualmente teniéndose en cuenta sólo aquellas regiones de homocigosidad superiores a 2Mb.

Tras el estudio se identificaron regiones relevantes de homocigosidad en el 94,4% (17 de 18) de las familias estudiadas. Sin tener en cuenta la familia RP-1073, ya que no se detectó ninguna región homocigota en este caso, la media del número de regiones homocigotas relevantes en las familias estudiadas fue de 3,9 (rango: 1-11). La longitud media total de las regiones fue de 38,9Mb (rango: 6,57-101,5), lo que corresponde a un 1,1% (rango: 0,19-2,90%) del genoma. En la tabla 4.13 se muestra el número de regiones de homocigosidad obtenidas para cada una de las familias, el porcentaje de genoma homocigoto teniendo en cuenta las regiones mayores de 2Mb, así como los genes asociados previamente a distrofias de retina en cada una de las regiones.

En las regiones homocigotas relevantes identificadas en cinco (RP-0830, RP-0399, RP-0035, RP-0371 y RP-0024) de las 17 familias, no se encontraron genes previamente asociados a DR (Tabla 4.13).

Familia	Fenotipo	Afectos	Sanos	*Array* (*Illumina*)	Regiones de Homocigosidad (>2Mb)	Rango (Mb)	% de genoma homocigoto (regiones >2Mb)	Genes Distrofias de Retina (Región de homocigosidad)
RP-0573*	RP Juvenil	2	---	*HumanCytoSNP-12*	11	3-23,2	2,90	*RPE65* (5)
RP-0509*	RP Juvenil	2	---	*Infinium II HumanLinkage-12 Panels*	6	3,5-9,4	1,01	*ABCA4* (1), *BBS2* (2), *CNGB1* (2), *RPGRIP1L* (2)
RP-0503*	RP Juvenil	2	---	*HumanCytoSNP-12*	5	2,3-32,3	2,50	*MERTK* (1), *NPHP1* (1), *BBS* (2), *RP9*(2)
RP-0055***	RP Típica	3	---	*Infinium II HumanLinkage-12 Panels*	5	3,6-17	1,20	*EYS* (1), *RPE65* (3)
RP-0043*	RP Juvenil	2	---	*HumanCytoSNP-12*	4	2,4- 46,8	2,28	*PCH21* (1), *PDE6C* (1), *RGR* (1), *LRAT* (2)
RP-0285**	RP Juvenil	3	---	*Infinium II HumanLinkage-12 Panels*	4	3-47	1,63	*EYS* (1), *LCA5* (1), *RIMS1* (1), *CDH23* (3)
RP-1190*	RP Típica	3	---	*Infinium II HumanLinkage-12 Panels*	3	4,6-24	1,25	*RP22* (1), *BBS2* (2), *CNGB1* (2), *RPGRIP1L* (2)
^RP-1451**	RP Típica	1	1	*HumanCytoSNP-12*	3	2,4-29,1	1,02	*RP22* (3)
RP-1374***	RP Típica	2	---	*HumanCytoSNP-12*	3	3,7-13,3	0,46	*SPATA7* (3), *BBS8* (3)
RP-1105*	RP Típica	3	---	*HumanCytoSNP-12*	2	11,8-20,4	0,92	*CLRN1* (1)
RP-1296***	RP Juvenil	3	---	*HumanCytoSNP-12*	1	7,8-7,8	0,22	*RP1* (1)
RP-1411***	RP Juvenil	2	---	*HumanCytoSNP-12*	1	6,5-6,5	0,19	*RPE65* (1)
RP-0830**	RP Típica	2	---	*HumanCytoSNP-12*	6	2,17-14,9	0,73	---
RP-0399***	RP Típica	2	---	*HumanCytoSNP-12*	5	2,75-15,9	1,28	---
RP-0035*	RP Típica	2	---	*HumanCytoSNP-12*	4	3-6,7	0,55	---
RP-0371***	RP Juvenil	2	---	*Infinium II HumanLinkage-12 Panels*	3	2,6-11	0,50	---
RP-0024*	RP Típica	3	---	*HumanCytoSNP-12*	1	9,6-9,6	0,27	---
RP-1073*	RP Juvenil	3	---	*HumanCytoSNP-12*	0	---	---	---

Tabla 4.13. Resultados obtenidos tras el mapeo de homocigosidad. Número de regiones de homocigosidad relevantes, porcentaje homocigoto de genoma y genes previamente asociados a DR incluidos en las regiones. ^ Familia sRP. Familias consanguíneas: * padres primos hermanos ** padres primos segundos *** padres primos terceros. ( ) Indica el número región de homocigosidad según tamaño (Mb).

4.1.4.2. CRIBADO DE GENES

Una vez determinadas las regiones de homocigosidad, con el fin de identificar la causa genética de la enfermedad para cada una de las familias, se analizaron en primer lugar los genes previamente asociados a arRP que se encontraban en esas regiones, empezando por las de mayor tamaño. En los casos en los que estos genes fueron descartados se paso al análisis de genes asociados a otras DR. La tabla 4.14 muestra las variantes detectadas tras el cribado de genes en este estudio.

Familia	Gen	Región (nº total de regiones)	Tamaño (Mb)	Mutación en homocigosis		Estudio familiar	Referencia
				Nucleótido	Proteína		
RP-0573	*RPE65*	5 (11)	9	c.560G>A	p.Gly187Glu	C	Este estudio
RP-0509	*CNGB1*	2 (3)	7	c.1150C>T	p.Gln384ter	C	Este estudio
RP-0503	*MERTK*	1 (5)	32	c.92delAC	p.Ser331CysfsX5	C	Este estudio
RP-0055	*EYS*	1 (5)	17	c.5928-2A>G	defecto *splicing*	C	Este estudio
RP-0043	*PCDH21*	1 (4)	47	c.1458+2T>C	defecto *splicing*	C	Este estudio
RP-0285	*LCA5*	1 (4)	47	c. 149delA	p.Asn50IlefsX77	C	Este estudio
RP-1190	*CNGB1*	2 (3)	15	c.2957A>T	p.Asn986Ile	C	Simpson *et al.*, 2010
RP-1374	*SPATA7*	3 (3)	4	c.253C>T	p.Arg84ter	C	Este estudio
RP-1296	*RP1*	1 (1)	8	c.1625C>G	p.Ser541ter	C	Este estudio
RP-1411	*RPE65*	1 (1)	7	c.331C>T	c.Pro111Ser	C	Corton *et al.*, 2011

Tabla 4.14. Nuevas variantes detectadas tras el cribado de genes de las regiones de homocigosidad mediante secuenciación automática. C cosegrega.

A continuación se detallan los resultados obtenidos tras el análisis para cada una de las familias.

En la familia RP-0573 se detectaron 11 regiones de homocigosidad mayores de 2Mb. Las cuatro primeras regiones de homocigosidad, según tamaño, no incluían genes descritos previamente. La quinta región (9Mb) incluía el gen *RPE65*, asociado a arRP precoz. El cribado del gen *RPE65* mediante secuenciación automática permitió la detección de la nueva variante c.560G>A p.Gly187Glu en homocigosis (Tabla 4.14). La figura 4.18 muestra la segregación de la nueva variante en la familia. Para valorar su posible patogenicidad se analizó la presencia de dicha mutación en población control, no detectándose el cambio en 100 cromosomas. El análisis *in silico* realizado con el programa *SIFT* muestra afectación de función de la proteína con un *score* 0.00 y *Polyphen* predice

probabilidad de patogenicidad de la variante. La figura 4.16 muestra la alineación múltiple y conservación de la secuencia de la proteína RPE65 en diferentes especies. La nueva variante se encuentra en el dominio catalítico de la proteína.

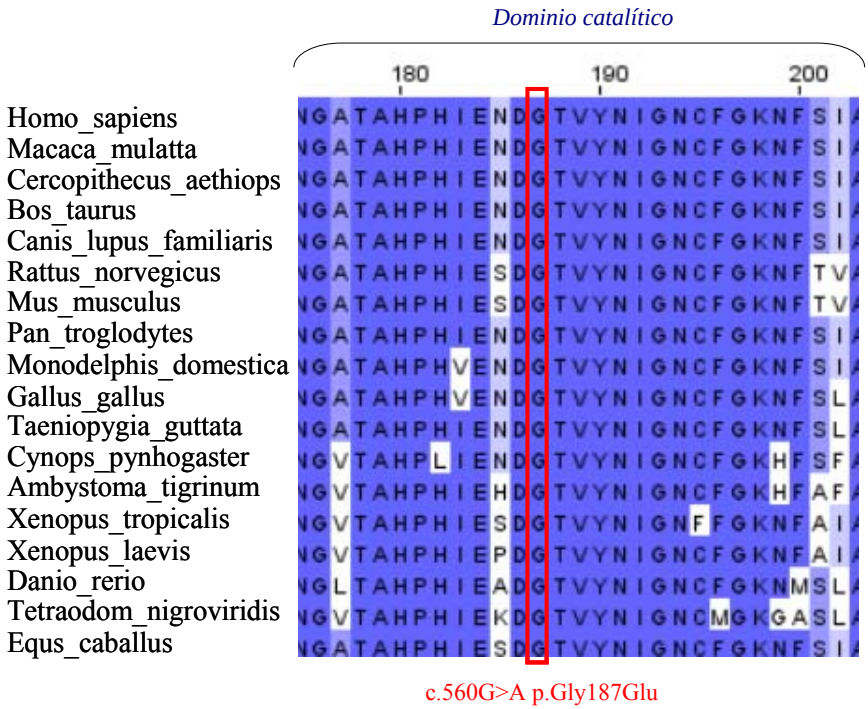


Figura 4.16. Alineación múltiple de la proteína RPE65 en diferentes especies. La conservación de los residuos se marca mediante un código de colores, el color más intenso (azul oscuro) es el más conservado, el color menos intenso (blanco) es el residuo menos conservado. En el cuadro rojo indica el residuo afectado (p. p.Gly187Glu).

Para la familia RP-0509 se detectaron tres regiones de homocigosidad según el criterio establecido. La región más grande (9Mb) incluía el gen *ABCA4* y la segunda región (7Mb) incluía los genes *BBS2*, *CNGB1* y *RPGRIP1L*. El cribado del gen *CNGB1*, asociado a arRP, mediante secuenciación automática permitió la detección de la nueva variante c.1150C>T; p.Gln384ter en homocigosis (Tabla 4.14). La figura 4.18 muestra la segregación de la mutación en la familia.

Según el criterio establecido, en la familia RP-0503 se detectaron cinco regiones de homocigosidad. La región más grande (32Mb) incluía los genes *MERTK* y *NPHP1*. El cribado del gen *MERTK*, asociado a arRP, mediante secuenciación automática permitió la detección de la nueva variante c.92delAC; p.Ser331CysfsX5 en homocigosis (Tabla 4.14). La figura 4.18 muestra la segregación de la mutación en la familia.

En la familia RP-0055 se detectaron tres regiones de homocigosidad mayores de 2Mb. La región más grande (17Mb) incluía el gen *EYS,* asociado a arRP, y la tercera región (4,5Mb) incluía el gen *RPE65,* asociado a arRP precoz. Mediante el cribado del gen *EYS* por secuenciación automática se identificó una nueva variante c.5928-2A>G en homocigosis (Tabla 4.14). El análisis *in silico* realizado con el programa *Human Splicing Finder* muestra afectación del sitio aceptor de *splicing*. La figura 4.18 muestra la segregación de la mutación en la familia.

Según el criterio establecido, en la familia RP-0043 se detectaron cuatro regiones de homocigosidad. La primera región (47Mb), según tamaño, incluía los genes *PCDH21*, *PDE6C* y *RGR*, y la segunda (18Mb) incluía el gen *LRAT*. En primer lugar se realizó el cribado de los genes *RGR* y *LRAT,* genes previamente asociados a arRP. La no detección de la variante patogénica hizo que se llevara a cabo el análisis del gen *PDE6C*, asociado a DCB, que al igual que en los casos anteriores no permitió la identificación de las causa genética de la enfermedad. Por último, se pasó al estudio del gen *PCDH21*. El análisis de dicho gen permitió la detección de una nueva variante c.1458+2T>C en homocigosis (Tabla 4.14). El análisis *in silico* realizado con el programa *Human Splicing Finder* muestra afectación del sitio donador de *splicing*. La figura 4.18 muestra la segregación de la mutación en la familia.

Para la familia RP-0285 se detectaron tres regiones de homocigosidad mayores de 2Mb. La región más grande (47Mb) incluía los genes *EYS*, *LCA5* y *RIMS1*. El cribado del gen *EYS,* asociado a arRP, mediante secuenciación automática no mostró ninguna variante patogénica por lo que se pasó al estudio del gen *LCA5,* asociado previamente a LCA. Tal y como se muestra en la tabla 4.13, el análisis del gen permitió la detección de una nueva variante patogénica c.149delA; p.Asn50IlefsX77 en homocigosis. La figura 4.19 muestra la segregación de la mutación en la familia.

En la familia RP-1190 se detectaron tres regiones de homocigosidad según el criterio establecido. La región más grande (24Mb) incluía el *locus* RP22 y la segunda región (15Mb) incluía los genes *BBS2*, *CNGB1* y *RPGRIP1L*. Mediante secuenciación automática del gen *CNGB1,* asociado a arRP, se detectó la nueva variante c.2957A>T; p.Asn986Ile en homocigosis (Tabla 4.14). La figura 4.19 muestra la segregación de la variación en la familia. Para valorar su posible patogenicidad se llevo a cabo el estudio de dicha mutación en población control, no detectándose el cambio en 100 cromosomas. El análisis *in silico*

realizado con el programa *SIFT* muestra afectación de función de la proteína con un *score* 0.00 y *Polyphen* predice probabilidad de patogenicidad de la variante. La figura 4.17 muestra la alineación múltiple y conservación de la secuencia de la proteína CNGB1 en diferentes especies. La nueva variante se encuentra en el dominio *cNMP,* dominio de unión a GMPc. Durante la elaboración de este manuscrito, la variante c.2957A>T; p.Asn986Ile ha sido asociada a arRP en otro estudio [Simpson *et al*., 2010].

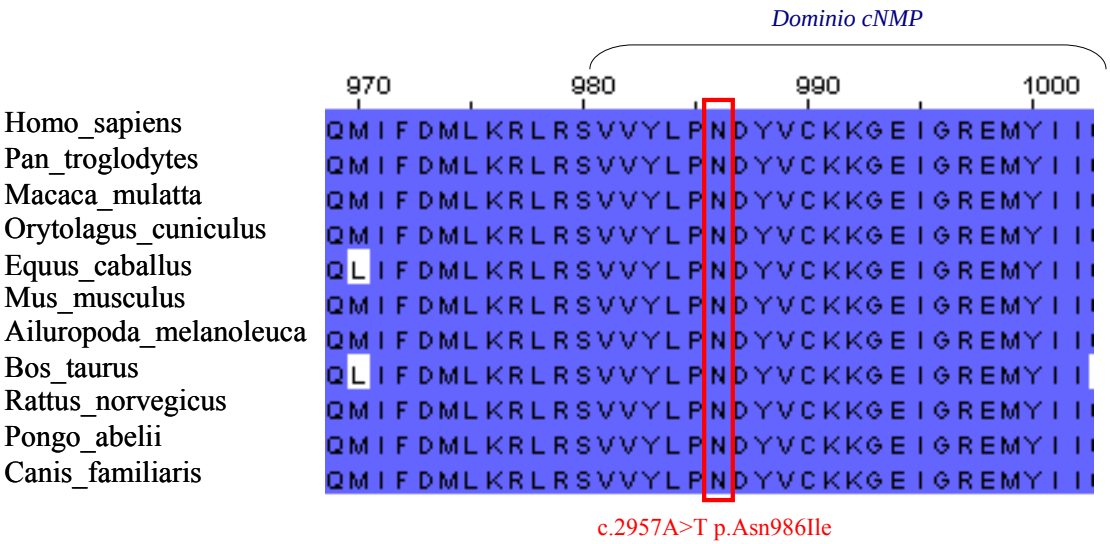


Figura 4.17. Alineación múltiple de la proteína CNGB1 en diferentes especies. La conservación de los residuos se marca mediante un código de colores, el color más intenso (azul oscuro) es el más conservado, el color menos intenso (blanco) es el residuo menos conservado. En el cuadro rojo indica el residuo afectado p.Asn986Ile. cNMP dominio de unión a GMPc.

Según el criterio establecido, en la familia RP-1374 se detectaron 3 regiones de homocigosidad. Las dos primeras regiones de homocigosidad, según tamaño, no incluían genes descritos previamente. La tercera región (4Mb) incluía los genes *BBS8* y *SPATA7*. El cribado del gen *SPATA7*, asociado a arRP juvenil y LCA, mediante secuenciación automática permitió la detección de la nueva variante c.253C>T; p.Arg84ter en homocigosis (Tabla 4.14). La figura 4.19 muestra la segregación de la mutación en la familia.

Tras el análisis en la familia RP-1296 se detectó una única región de homocigosidad (8Mb) que cumplía los criterios establecidos. La región incluía el gen *RP1*. El cribado del

gen mediante secuenciación automática permitió la detección de la nueva variante c.1625C>G; p.Ser541ter en homocigosis (Tabla 4.14). La figura 4.19 muestra la segregación de la mutación en la familia.

Para la familia RP-1411 se detectó una región de homocigosidad mayor de 2Mb. Ésta región (7Mb) incluía el gen *RPE65*, asociado a arRP precoz. Tras el cribado del gen *RPE65* mediante secuenciación automática se detectó de la variante c.331C>T; p.Pro111Ser en homocigosis (Tabla 4.14) recientemente asociada a arRP en población española [Corton *et al* 2011]. La figura 4.19 muestra la segregación de la mutación en la familia.

Tras el análisis en la familia RP-1105 se detectaron dos regiones de homocigosidad. La primera región (20Mb), según tamaño, incluía el gen *CLRN1*, asociado a síndrome de Usher. La segunda región no incluía genes asociados a DR. El cribado del gen *CLRN1* mediante secuenciación automática no mostró ninguna variante patogénica.

4.1.5. ESTUDIOS DERIVADOS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL APARTADO 4.1.4.

4.1.5.1. CRIBADO DEL GEN *LCA5*

Tras el resultado obtenido en la familia RP-0285 donde se detectó una mutación en homocigosis en el gen *LCA5* (Tabla 4.14), hasta entonces únicamente asociado a fenotipo LCA, se llevó a cabo el cribado del gen mediante secuenciación automática en 117 familias arRP, con el fin de establecer si mutaciones en el gen *LCA5* contribuían a la aparición de arRP en población española y poder establecer la frecuencia con la que esto ocurría. El cribado del gen no mostró variantes patogénicas para ninguna de las familias analizadas.

4.1.6. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS TRAS EL MAPEO DE HOMOCIGOSIDAD

Tal y como se muestra en la tabla 4.12, 11 de las 18 familias analizadas presentaron regiones homocigotas que incluían genes previamente asociados a DR. Estos genes fueron analizados mediante secuenciación automática lo que nos ha permitido identificar la mutación responsable en 10 de ellas (Ver tabla 4.14).

Por lo tanto, la estrategia llevada a cabo mediante el mapeo de homocigosidad ha permitido la caracterización del 55% (10 de 18) de las familias estudiadas, dando lugar a la descripción de 8 nuevas variantes en genes asociados previamente a pacientes afectados de DR. Las otras dos variantes encontradas han sido descritas [Simpson *et al*., 2010; Cortón *et al*., 2011] a lo largo de la elaboración de este manuscrito. La media del tamaño de las regiones de homocigosidad que contienen la mutación causante de la enfermedad es de 19,3Mb.

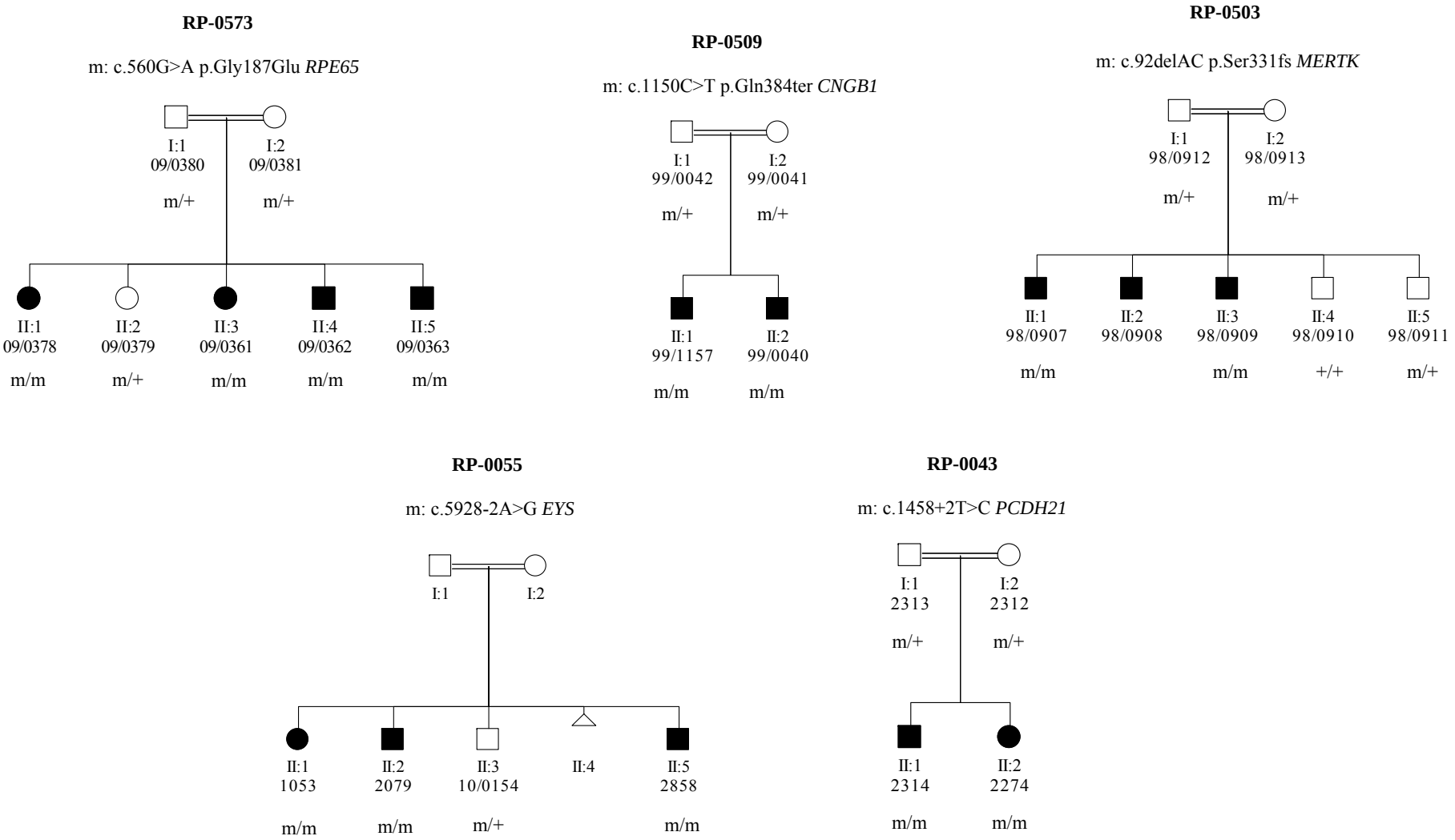


Figura 4.18. Segregación de las mutaciones detectadas en las familias RP-0573, RP-0509, RP-0503, RP-0055 y RP-0034. "+" alelo normal "m" alelo mutado.

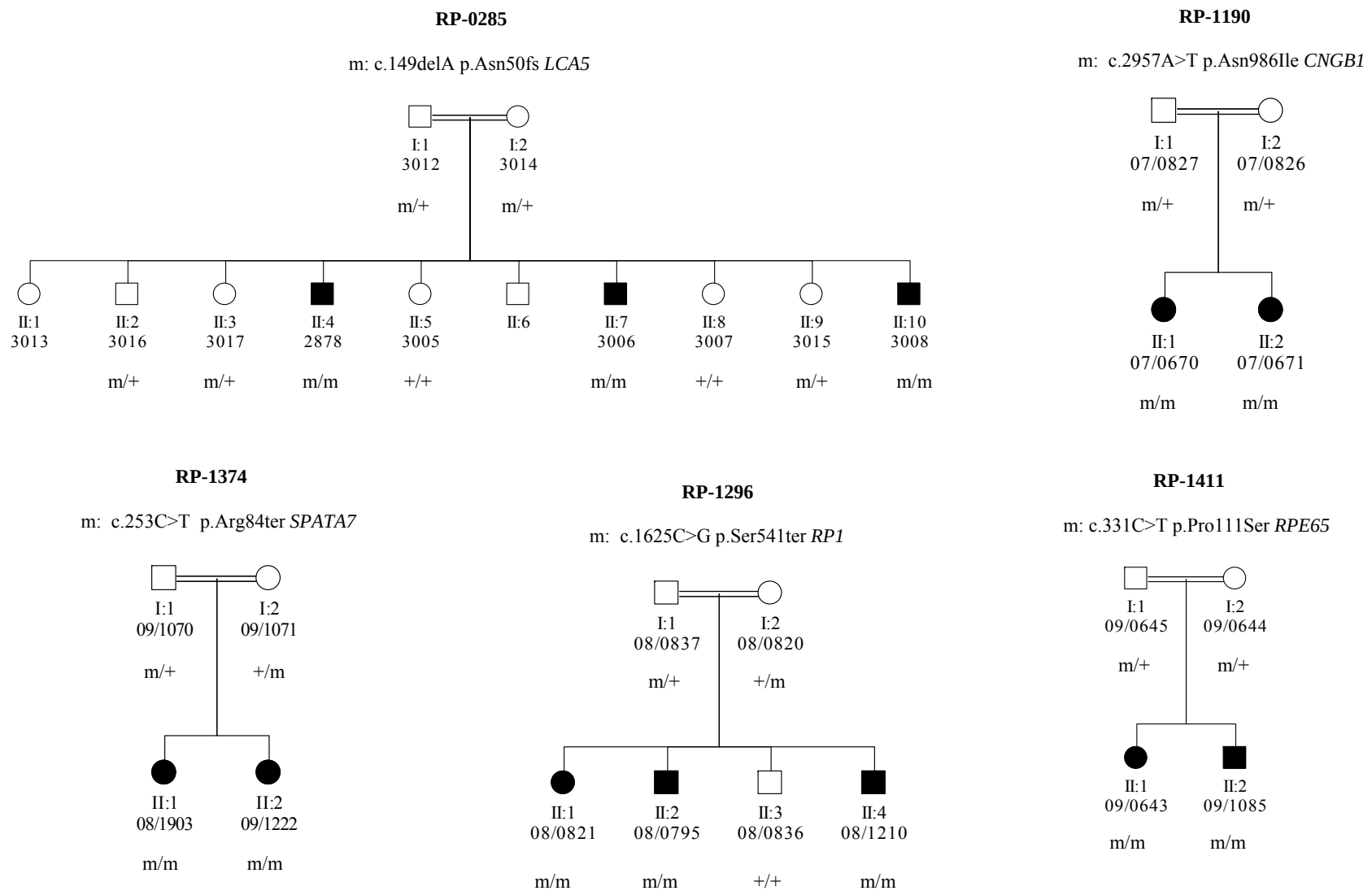


Figura 4.19. Segregación de las mutaciones detectadas en las familias RP-0285, RP-1190, RP-1374, RP-1296 y RP-1411. "+" alelo normal "m" alelo mutado.

4.2. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

En este apartado se describe el fenotipo que presentan los pacientes caracterizados en este estudio según el gen afectado en cada caso.

4.2.1. GEN *CERKL*

La exploración oftalmológica realizada en nueve afectos de siete familias, de entre 32 y 55 años de edad, con la mutación p.Arg257ter en homocigosis en el gen *CERKL* muestra un fenotipo uniforme, caracterizado por ceguera nocturna (CN) y disminución de la agudeza visual (AV) central en la 3ª década de la vida. Tras la exploración se observó que la AV se encontraba entre 0,4 hasta percepciones de luz, disminuyendo con la edad. El campo visual (CV) presentaba un escotoma central y constricción periférica. El fondo de ojo, bastante característico de esta mutación, presenta maculopatía atrófica y áreas redondeadas de atrofia coriorretiniana en media periferia asociada a pigmentaciones redondeadas o espículas (Figura 4.20). El electrorretinograma estaba abolido en todos los casos. Características fenotípicas: ver tabla 2 anexo IV [Ávila-Fernández *et al*., 2008].

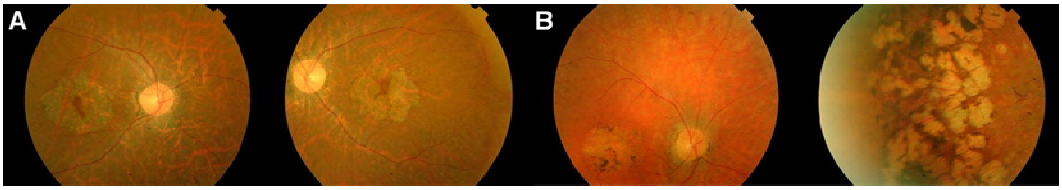


Figura 4.20. Fondo de ojo que presentan los pacientes que con la mutación p.Arg257ter en el gen *CERKL* en homocigosis. **A.** El grupo de pacientes muestran atrofia macular de distintas intensidades, acúmulos de pigmento y cambios en la retina periférica. **B.** Fondo de ojo de uno de los pacientes donde se observa la apariencia típica de la atrofia girata.

4.2.2. GEN *CNGA1*

Las familias RP-0531 y RP-1080 presentaron la mutación p.Arg28ter en homocigosis en el gen *CNGA1*.

La familia RP-0531, presenta una arRP juvenil. Ambos afectos refieren ceguera nocturna y disminución del campo visual a los 3 años de edad. No se dispone de datos detallados de la exploración oftalmológica.

La familia RP-1080, clasificada como sRP típica, refiere ceguera nocturna y disminución de la agudeza visual a los 60 años de edad, y disminución del campo visual a los 64 años. Los datos oftalmológicos se muestran en la tabla 4.15.

4.2.3. GEN *CNGB1*

La familia RP-0509, arRP juvenil consanguínea, presentó la mutación p.Gln384ter en el gen *CNGB1* en homocigosis. Ambos afectos refieren ceguera nocturna y una disminución del campo visual desde el primer año de vida, y una disminución de la agudeza visual desde los 14 años de edad. No se dispone de informe oftalmológico.

La familia RP-1190, arRP típica consanguínea, presentó la mutación p.Asn986Ile en homocigosis en el gen *CNGB1*. El caso índice refiere ceguera nocturna a los 10 años de edad, y disminución del campo y de la agudeza visual a los 38 y 39 años de edad, respectivamente. La hermana afecta refiere ceguera nocturna a los 14 años, con disminución del campo y agudeza visual a los 39 años de edad. Los datos oftalmológicos se muestran en la tabla 4.15.

4.2.4. GEN *CRB1*

La familia RP-0561, clasificada como arRP juvenil, presentó las mutaciones p.Thr745Met y p.Glu1330ter en el gen *CRB1*. El caso índice refiere ceguera nocturna a los seis años de edad, una disminución del campo visual a los 30 años y una disminución de la agudeza visual desde la infancia. No se dispone de datos detallados de la exploración oftalmológica.

4.2.5. GEN *EYS*

La familia RP-0055, arRP típica, presentó la mutación c.5928-2A>G en el gen *EYS* en homocigosis. El caso índice refiere disminución del campo y de la agudeza visual a los 25 años de edad, y ceguera nocturna a los 32 años. El hermano afecto refiere ceguera nocturna desde los 15 años con disminución del campo visual desde los 21 años de edad. Los datos oftalmológicos se muestran en la tabla 4.15.

4.2.6. GEN *LCA5*

La familia RP-0285, clasificada como arRP juvenil consanguínea, presentó la mutación p.Asn50IlefsX77 en homocigosis en el gen *LCA5*. El caso índice refiere ceguera nocturna al nacimiento, disminución del campo visual a los 4 años y una disminución de la agudeza visual a los 12 años de edad. El hermano afecto refiere una disminución de la agudeza visual desde la infancia. En las figuras 4.21, 4.22 y 4.23 se muestran las fotos de fondo de ojo de los tres individuos afectados. La tabla 4.15 muestra los datos clínicos recogidos tras la exploración oftalmológica de los individuos afectados en la familia.

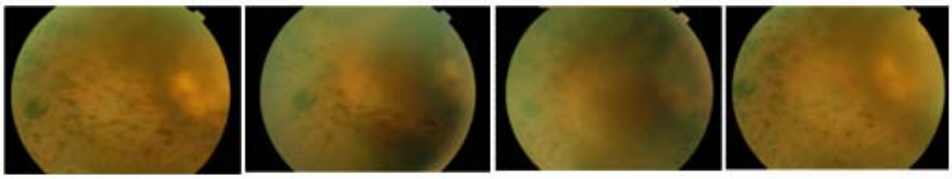


Figura 4.21. Fondo de ojo del caso índice (II:4) de la familia RP-0285 donde se observa atrofia papilar, atenuación vascular, pigmento en acúmulos, áreas de desestructuración retiniana, atrofia y coloboma macular.

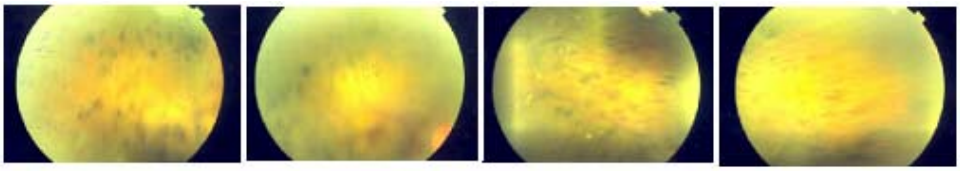


Figura 4.22. Fondo de ojo del hermano afecto (II:7) de la familia RP-0285 donde se observa papila normal, parénquima grisáceo, acúmulo de pigmento y lesión macular: lesión naranja oscura sobreelevada rodeada de un halo de exudado amarillento.

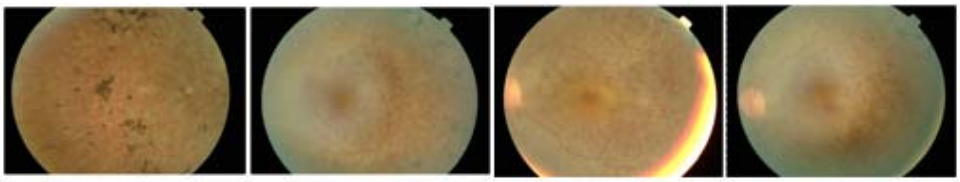


Figura 4.23. Fondo de ojo del hermano afecto (II:10) de la familia RP-0285 donde se observa papila normal, acúmulo de pigmento en osteoclastos y lesiones blanquecinas. Mácula sin patología evidente.

4.2.7. GEN *MERTK*

La familia RP-0503, arRP juvenil consanguínea, presentó la mutación p.Ser331CysfsX5 en el gen *MERTK* en homocigosis. Tanto el caso índice como los dos hermanos afectados refieren ceguera nocturna en la primera década de la vida, disminución del campo visual en la segunda, seguido se una disminución de la agudeza visual Los datos oftalmológicos se muestran en la tabla 4.15.

4.2.8. GEN *PCDH21*

La familia RP-0043, clasificada como arRP juvenil consanguínea, presentó la mutación c.1458+2T>C en el gen *PCDH21* en homocigosis. El caso índice refiere disminución de la agudeza visual a los 3 años de edad, y ceguera nocturna y disminución del campo visual a los 5 años. Los datos oftalmológicos tras la exploración se muestran en la tabla 4.15.

4.2.9. GEN *PDE6A*

En la familia RP-0341, arRP juvenil, y con las mutaciones c.998+1 G>A y p.Gln569Lys en el gen *PDE6A*, el caso índice refiere ceguera nocturna a los 3 años, disminución del campo visual a los 15 años y disminución de la agudeza visual a los 16 años de edad. La hermana afecta refiere ceguera nocturna desde la infancia, con disminución del campo y de la agudeza visual desde los 12 años de edad. Los datos oftalmológicos del caso índice se muestran en la tabla 4.15. No se dispone de informes oftalmológicos de la hermana afecta.

La familia RP-0881, clasificada como sRP típica, presentó la mutación p.Arg102His en el gen *PDE6A* en homocigosis. El caso índice refiere ceguera nocturna a los 20 años de edad, seguida de una disminución del campo y una leve perdida de la agudeza visual. Los datos oftalmológicos se muestran en la tabla 4.15.

4.2.10. GEN *PDE6B*

La familia RP-0054, sRP juvenil, presentó la mutación p.Cys270ter en el gen *PDE6B* en homocigosis. El caso índice refiere ceguera nocturna y disminución del campo visual a los 18 meses de edad. Disminución de la agudeza visual a los 20 años. Los datos oftalmológicos recogidos tras la exploración se muestran en la tabla 4.15.

4.2.11. GEN *RDH12*

La familia RP-0340, clasificada como arRP juvenil, presentó la mutación p.Trp155Ile en el gen *RDH12* en homocigosis. El caso índice refiere ceguera nocturna a los tres años de edad, disminución del campo visual a los cuatro años y disminución de la agudeza visual a los 18 años. Los datos oftalmológicos se muestran en la tabla 4.15. No se dispone de datos familiares.

La familia RP-0379, sRP de inicio precoz, presentó las mutaciones p.Asn125Lys y p.Arg234His en el gen *RDH12.* No se dispone de datos oftalmológicos.

La familia RP-1339, sRP juvenil, presentó las mutaciones p.Leu99Ile y p. Leu93Pro en el gen *RDH12.* El caso índice refiere ceguera nocturna a los cuatro años, con una disminución del campo y de la agudeza visual a los nueve años de edad. Los datos oftalmológicos se muestran en la tabla 4.15.

4.2.12. GEN *RLBP1*

La familia RP-0979, clasificada como arRP juvenil, presentó la mutación p.Arg151Gln en el gen *RLBP1* en homocigosis. El caso índice refiere ceguera nocturna al nacimiento, disminución del campo visual a los seis años de edad y disminución de la agudeza visual entre los ocho y los 10 años. El fondo de ojo se muestra en la figura 00. Los datos oftalmológicos recogidos tras la exploración se detallan en la tabla 4.15. El hermano afecto refiere una disminución del campo y de la agudeza visual a los nueve años de edad. No se dispone de informe oftalmológico.

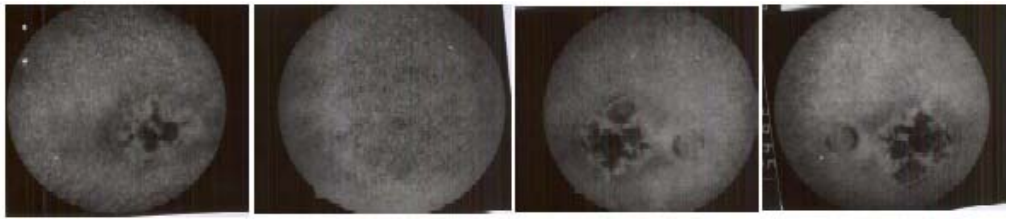


Figura 4.24. Fondo de ojo del caso índice de la familia RP-0979 donde se observan papilas pálidas bien delimitadas, vasos filiformes, mácula con edema y lesiones pigmentadas, y parénquima con aspecto granuloso y lesiones blanquecinas.

4.2.13. GEN *RP1*

La familia RP-1296, arRP juvenil consanguínea, presentó la mutación p.Ser541ter en el gen *RP1* en homocigosis. El caso índice refiere ceguera nocturna a los 10 años de edad, una disminución de la agudeza visual a partir de los siete años y una disminución del campo visual entre los 15 y los 20 años de edad. El hermano afecto refiere ceguera nocturna y disminución del campo visual desde la infancia. Los datos oftalmológicos se muestran en la tabla 4.15.

4.2.14. GEN *RPE65*

La familia RP-0573, clasificada como arRP juvenil consanguínea, presentó la mutación p.Gly187Glu en el gen *RPE65* en homocigosis. El caso índice refiere ceguera nocturna a los nueve años de edad. Los datos oftalmológicos se detallan en la tabla 4.15. La hermana afecta refiere ceguera nocturna a los cinco años de edad. No se dispone de informes oftalmológicos.

La familia RP-1115, arRP juvenil, presentó las mutaciones c.95-2A>T y p.Thr153Ala en el gen *RPE65*. El caso índice refiere ceguera nocturna y disminución del campo visual desde la infancia. El hermano afecto refiere ceguera nocturna y disminución del campo visual desde la infancia y una disminución de la agudeza visual a los 23 años de edad. Los datos oftalmológicos se muestran en la tabla 4.15.

La familia RP-1411, clasificada como arRP juvenil consanguínea, presentó la mutación p.Pro111Ser en el gen *RPE65* en homocigosis. El caso índice y hermano afecto

refieren ceguera nocturna al nacimiento, con una disminución del campo y de la agudeza visual desde la infancia. Los datos oftalmológicos se detallan en la tabla 4.15.

4.2.15. GEN *SAG*

La familia RP-1206, sRP juvenil, presentó la mutación p.Arg193ter en el gen *SAG* en homocigosis. El caso índice refiere ceguera nocturna a los seis años de edad y una disminución del campo visual a los 50 años. Los datos oftalmológicos se muestran en la tabla 4.15.

4.2.16. GEN *SPATA7*

La familia RP-1374, clasificada como arRP típica consanguínea, presentó la mutación p.Arg84ter en el gen *SPATA7* en homocigosis. El caso índice refiere ceguera nocturna, disminución del campo visual y disminución de la agudeza visual a los 27 años de edad. Dificultad para distinguir los colores desde siempre. La hermana afectada no refiere síntomas. Los datos recogidos tras la exploración oftalmológica se detallan en la tabla 4.15.

4.2.17. GEN *USH2A*

La familia RP-0204, sRP típica, presentó las mutaciones p.Cys759Phe y p.Cys3267Arg en el gen *USH2A*. El caso índice refiere ceguera nocturna a los 15 años y una disminución del campo visual a los 33 años de edad. No refiere pérdida auditiva a los 39 años. Los datos oftalmológicos se muestran en la tabla 4.15. No se dispone de informes del ORL.

La familia RP-0260, sRP típica, presentó las mutaciones p.Cys3267Arg y p.Cys3358Tyr en el gen *USH2A*. El caso índice refiere ceguera nocturna a los 12 años y una disminución del campo visual a los 15 años. No refiere pérdida auditiva a los 22 años de edad. Los datos oftalmológicos se muestran en la tabla 4.15. La Audiometría Tonal Liminar (ATL) a los 39 años de edad es normal.

La familia RP-0332, arRP típica, presentó la mutación p.Cys759Phe en el gen *USH2A* en homocigosis. El caso índice refiere ceguera nocturna y disminución del campo visual a

los 15 años de edad. No refiere pérdida auditiva a los 39 años de edad. Los datos oftalmológicos se muestran en la tabla 4.14. La Audiometría Tonal Liminar (ATL) a los 53 años de edad es normal. La hermana afecta refiere ceguera nocturna a los 22 años y una disminución del campo visual a los 24 años de edad. No se dispone de datos oftalmológicos.

La familia RP-0404, sRP consanguínea, clasificada como RP típica, presentó la mutación c.2167+5G>A en el gen *USH2A* en homocigosis. EL caso índice refiere ceguera nocturna a los 25 años y disminución del campo visual a los 30 años de edad. No refiere pérdida auditiva a los 40 años. No se dispone de datos oftalmológicos ni del ORL.

La familia RP-0653, sRP típica, presentó las mutaciones p.Cys759Phe y p.Arg4192His en el gen *USH2A.* El caso índice refiere ceguera nocturna a los 15 años y una disminución del campo visual a los 32 años de edad. No refiere hipoacusia a los 32 años. Los datos oftalmológicos se muestran en la tabla 4.15.

La familia RP-0721, sRP típica, presentó las mutaciones p.Cys759Phe y p.Thr1238Arg en el gen *USH2A*. El caso índice refiere ceguera nocturna y una disminución del campo visual a los 20 años y una disminución de la agudeza visual a los 15 años de edad. No se dispone de datos oftalmológicos. No refiere hipoacusia a los 44 años. El informe del ORL revela, tras una Audiometría Tonal Liminar (ATL) a los 53 años de edad, una caída bilateral en los agudos (OD 35dB y OI 35dB).

La familia RP-0849, arRP típica, presentó la mutación p.Cys759Phe en el gen *USH2A* en homocigosis. El caso índice refiere ceguera nocturna a los 46 años y disminución del campo visual a los 49 años de edad. A los 50 años no refiere pérdida auditiva. El hermano afecto refiere ceguera nocturna y disminución del campo visual a los 40 años. Los datos oftalmológicos de muestran en la tabla 4.15. No se dispone de informe del ORL. El primo afecto refiere disminución del campo visual a los 40 años y disminución de la agudeza visual a los 50 años. A la edad de 60 años no refiere pérdida auditiva. No se dispone de datos oftalmológicos.

La familia RP-0930, sRP típica, presentó la mutación p. Cys759Phe en el gen *USH2A* en homocigosis. El caso índice refiere disminución del campo visual a los 46 años. A los

50 años no refiere pérdida auditiva. No se dispone de informes oftalmológicos. El informe del otorrinolaringólogo revela, tras una Audiometría Tonal Liminar (ATL) a los 54 años de edad, una caída bilateral en los agudos OD 30,50dB y OI 45dB.

La familia RP-1059, sRP típica, presentó las mutaciones c.Cys759Phe y p.Ile4582Lysfs14 en el gen *USH2A.* El caso índice refiere ceguera nocturna a los 24 años con una disminución del campo visual a los 32 años de edad. A los 34 años no refiere pérdida auditiva. Los datos oftalmológicos se muestran en la tabla 4.15. El informe del ORL muestra a los 38 años otoscopia bilateral y Audiometría Tonal Liminar (ATL) normales.

Familia	Paciente	Gen	Mutación1 Mutación2	Edad al diagnóstico (años)	Edad a la exploración (años)	Primer síntoma (Edad) y curso	Agudeza Visual OD/OI
RP-1080	II:1	*CNGA1*	p.Arg28ter p.Arg28ter	64	69	CN (60a) disminución CV (64a) disminución AV (60a)	0.7/0.4
RP-1190	II:1	*CNGB1*	p.Asn986Ile p.Asn986Ile	43	43	CN (11a) disminución CV (38a) disminución AV (39a)	---
	II:2			39	39	CN (14a) disminución CV (39a) disminución AV (39a)	---
RP-0055	II:1	*EYS*	c.5928-2A>G c.5928-2A>G	28	41	CN (32a) disminución CV (25a) disminución AV (25a)	0.3/0.5
	II:4			27	27	CN (15a) disminución CV (21a)	0.9/1.0
RP-0285	II:4	*LCA5*	p.Asn50IlefsX77 p.Asn50IlefsX77	---	29	CN al nacimiento disminución CV (4a) disminución AV (12a)	<0.1 AO
	II:7			---	25	Disminución AV desde infancia	PL proyecta/ <0.1
	II:10			---	20	---	Bultos/ CD
RP-0503	II:1	*MERTK*	p.Ser331CysfsX5 p.Ser331CysfsX5	18	20	CN (12a) disminución CV (18a) disminución AV (18a)	0.1/0.3
	II:2			17	32	CN y disminución CV (10a) disminución AV (10a)	0.3/CD
	II:3			12	---	CN y disminución CV (7a) disminución AV (10a)	---
RP-0043	II:1	*PCDH21*	c.1458+2T>C c.1458+2T>C	31	33	CN y disminución CV (5a) disminución AV (3a)	0.2/0.1
	II:2			---	37	---	---
RP-0341	II:1	*PDE6A*	c.998+1 G>A p.Gln569Lys	16	17	CN (3a) disminución CV (15a) disminución AV (16a)	0.3/0.4
RP-0881	II:7	*PDE6A*	p.Arg102His p.Arg102His	20	41	CN (20a) disminución CV disminución AV	0.4/0.3
RP-0054	II:3	*PDE6B*	p.Cys270ter p.Cys270ter	22	25	CN (18m) disminución CV (18m) disminución AV (20a)	0.6/0.5

Tabla 4.15. Datos oftalmológicos familias caracterizadas molecularmente. CN ceguera nocturna, CV campo visual, AV agudeza visual, a años, m meses, AO ambos ojos, PL proyecciones de luz y CD cuenta dedos.

Refracción	Campo visual	ERG	Fondo de ojo	Otros
---	---	Bastones y mixto abolido conos y flicker amplitud disminuida	Excavaciones papilares amplias, mayor en OI, vasos levemente disminuidos de calibre, pigmento en forma de osteoclastos y en acúmulos en media periferia, con respeto parcial de la zona temporal	Catarata OD glaucoma OD y fotosensibilidad
---	Constricción tubular (46a)	Disfunción de los bastones de la retina AO	---	---
---	Constricción tubular (42a)	Disfunción severa de los conos y los bastones de la retina AO	---	---
---	---	Abolido AO	Palidez papilar, atenuación del calibre vascular, depósitos de pigmento en osteoclastos y pseudoagujero macular	---
---	Constricción tubular AO	Abolido AO	Palidez papilar, atenuación del calibre vascular, pigmento en pequeños acúmulos por fuera de las arcadas. Desestructuración del EPR Máculas anaranjadas (33a)	---
---	No se puede valorar	Abolido AO	Atrofia papilar y atenuación vascular Alteraciones pigmentarias retinianas, retina grisácea con pigmento en acúmulos. Áreas de desestructuración retiniana. Atrofia y coloboma macular AO (45a)	Nistagmus rotatorio Catarata subcapsular posterior AO (45a)
---	No se puede valorar	Abolido AO	Papila normal, parénquima grisáceo, acúmulo de pigmento. Lesión macular: lesión naranja oscura sobreelevada rodeada de un halo de exudado amarillento	Nistagmus rotatorio Queratocono bilateral Catarata subcapsular posterior AO (40a)
+4.75D AO	Abolido OI	Abolido AO	Papila normal, ácumulo de pigmento en osteoclastos y lesiones blanquecinas. Mácula sin patología evidente	Refracción +4.75 AO Nistagmus y estrabismo
---	Reducción concéntrica	Patológico Abolido a los 29a	Depósito de pigmento (espículas óseas) y afectación macular	Fotofobia Catarata a los 31a
---	Alterado	---	Depósito de pigmento (espículas óseas) en periferia, atenuación del calibre vascular y palidez de papila en AO y afectación macular	Catarata subcapsular posterior AO Alteración de los colores AO
---	---	---	---	---
---	Cañón de escopeta	Abolido	Disminución calibre arteriolar Palidez papilar, pigmento en osteoclastos en media preiferia	Alteración de la visión cromática
---	Escotoma relativo Mayor afectación nasal superior bilateral	---	Inicio de movilización pigmentaria, brillo tapetorretiniano con coloración blanquecina, estrechamineto arteriolar y degeneración macular	Alteración de la visión cromática
---	---	---	Tìpico de RP	---
---	Reducción concéntrica AO	---	Pápila normal, vasos filiformes, periferia con alteraciones del EP y pigmento en espículas, mácula con alteraciones del EP	Fotosensibilidad
---	Constricción tubular AO	Abolido AO	Atrofia óptica con papilas pálidas, vasos centrales estrechados. Atrofia coriorretiniana difusa a excepción del área macular con migración pigmentaria y aspecto de sal y pimienta	---

Tabla 4.15. Datos oftalmológicos familias caracterizadas molecularmente. D dioptrías, a años, AO ambos ojos, OI ojo izquierdo OD ojo derecho, RP retinosis pigmentaria y EP epitelio pigmentario.

Paciente	Gen	Mutacion1 Mutación2	Edad del diagnóstico (años)	Edad a la exploración (años)	Primer síntoma (Edad) y curso	Agudeza Visual OD/OI
II:4	*RDH12*	p.Trp155Ile p.Trp155Ile	3	30	CN (3a) disminución CV (4a) disminución AV (18a)	Falta de fijación AO
II:1	*RDH12*	p.Leu99Ile p.Leu93Pro	9	19	CN (4a) disminución CV (9a) disminución AV (9a)	0.2/0.2 CC
II:1	*RLBP1*	p.Arg151Gln p.Arg151Gln	15	56	CN al nacimiento disminución CV (6a) disminución AV (8-10a)	CD/CD
II:2	*RP1*	p.Ser541fs p.Ser541fs	12	51	CN (10a) disminución CV (15-20a) disminución AV (15-20a)	PL/PL
II:4			5	29	CN y disminución CV desde la infancia	0.2/0.2
II:3	*RPE65*	p.Gly187Glu p.Gly187Glu	15	37	CN (9a)	0.3/0.5
II:4	*RPE65*	c.95-2A>T p.Thr153Ala	---	18	CN y disminución CV desde la infancia	0.9/0.9 CC
II:1			31	32	CN (1a) disminución CV (1a) disminución AV (23a)	0.7/0.9 CC
II:1	*RPE65*	p.Pro111Ser p.Pro111Ser	8	8	CN al nacimiento, disminución CV y AV desde la infancia	0.3/0.16 CC
II:2			2	11	CN al nacimiento, disminución CV y AV desde la infancia	0.1/0.1 CC
II:2	*SAG*	p.Arg193ter p.Arg193ter	28	62	CN (4a) disminución CV (50a)	1.0/0.8 CC
II:1	*SPATA7*	p.Arg84ter p.Arg84ter	29	29	CN (25a) disminución CV (27a) disminución AV (27a)	---
				31		1.0 /0.8
II:2			26	26	No refiere síntomas	1.0/1.0

Tabla 4.15. Datos oftalmológicos familias caracterizadas molecularmente. CN ceguera nocturna, CV campo visual, AV agudeza visual, a años, m meses, AO ambos ojos, CC con corrección, PL proyecciones de luz y CD cuenta dedos.

Refracción	Campo visual	ERG	Fondo de ojo	Otros
---	OD escotoma absoluto OI constricción tubular	Abolido AO	OD imposible ver por catarata OI papila pálida, vasos estrechos, osteoclastos abundantes y confluentes en media periferia, mácula pigmentada	OD catarata madura OI catarata subcapsular posterior
---	Escotoma absoluto	---	Típico de RP Afectación macular	---
---	Escotoma absoluto AO	Abolido AO	Papilas pálidas bien delimitadas. Vasos filiformes. Mácula con edema y lesiones pigmentadas. Parénquima granuloso con lesiones balnquecinas	Fotosensibilidad Catarata
---	---	---	Tipico de RP	Catarata
-4.00D/-4.50D	Reducido a 5º centrales en AO	---	Acúmulo de pigmento en media periferia AO	
---	Restricción concéntrica AO	Alteración en morfología y amplitudes	Papílas pálidas, pigmentación en sal y pimienta, vasos filiformes, zonas de pequeño tamaño amarillentas	Test de colores: alteración rojo-verde
---	Escotomas dispersos AO	---	Retinosis sin afectación macular	Miopía astigmatismo
---	Escotomas dispersos AO	---	Retinosis sin afectación macular	Miopía astigmatismo
---	Gran reducción concéntrica	Abolido	Punteado blanquecino y ausencia de reflejo foveolar	Estrabismo astigmatismo
---	Gran reducción concéntrica	---	Ligeras zonas degeneradas	Estrabismo OD astigmatismo
---	Escotoma anular	---	Papilas normales, calibre de los vasos disminuidos, escaso pigmento en espículas en media periferia	Fotofobia
---	CV normal (25a) Reducción concéntrica (29a)	ERG de patrón disminuido	Papilas normales, mácula con brillo foveal, espículas pigmentadas ecuatoriales dispersas no muy abundantes	Fotofobia EOG patológico Dificultad distinguir colores
+2.75D/ +3.25D	Constricción tubular AO	Disminución severa	Papilas normocoloreadas, afilamiento vascular, pigmento en espículas en la media periferia superior no muy abundante	---
---	Normal	Moderada reducción de la amplitud del componente b	Normal	---

Tabla 4.15. Datos oftalmológicos familias caracterizadas molecularmente. D dioptrías, a años, AO ambos ojos, OI ojo izquierdo OD ojo derecho, a años y RP retinosis pigmentaria.

Paciente	Gen	Mutacion1 Mutación2	Edad del diagnóstico (años)	Edad a la exploración (años)	Primer síntoma (Edad) y curso	Agudeza Visual OD/OI
II:3	*USH2A*	p.Cys759Phe p.Cys3267Arg		39	CN (15a) disminución CV (33a)	---
II:3	*USH2A*	p.Cys3267Arg p.Cys3358Tyr	20	22	CN (12a) y disminucón CV (15a)	0.9/1.250 CC
II:1	*USH2A*	p.Cys759Phe p.Cys759Phe	31	31	CN (15a) disminucón CV (15a)	1.0/0.6
II:2	*USH2A*	p.Cys759Phe p.Arg4192His	32	32	CN (15a) disminucón CV (32a)	0.55/0.75 SC
IV:1	*USH2A*	p.Cys759Phe p.Cys759Phe	47	47	CN (46a) disminucón CV (49a)	0.3 /0.6
IV:2			45	57	CN (40a) y disminucón CV (40a)	---
II:4	*USH2A*	p.Cys759Phe p.Ile4582LysfsX14	33	33	CN (24a) y disminucón CV (32a)	1.0/1.0

Tabla 4.15. Datos oftalmológicos familias caracterizadas molecularmente. CN ceguera nocturna, CV campo visual, AV agudeza visual, a años, CC con corrección y SC sin corrección.

Refracción	Campo visual	ERG	Fondo de ojo	Otros
---	Escotoma anular	---	Presencia de pigmento	Miopía (27a)
---	Reducción concéntrica AO	Alterado	Palidez papilar, calibre de los vasos disminuidos, atrofia difusa del EP	---
---	---	---	Arterias estrechadas, acúmulo de pigmento en zona periférica	---
---	Constricción con sensibilidades centrales medias AO	Bastones y potenciales oscilatorios abolido, conos flash normales y conos flicker amplitud ligeramente baja, latencia ligeramente aumentada	Reflejo tapetal intenso, ligera palidez del nervio óptico y tenue alteración vascular, pequeños acúmulos de pigmento periférico en osteoclastos muy escasos y dispersos, mácula aspecto norma	---
---	Cosntricción tubular AO	Ausencia de respuesta AO	Típico de RP	Catarata subcapsular posterior AO EOG patológico
---	Constricción tubular	Alterado	---	Fotofobia e inicio de discromatopsia
---	Constricción tubular	---	Papila normal, disminución del calibre de los vasos, pigmentación en forma de osteoclastos abundante en media periferia, mácula normal	---

Tabla 4.15. Datos oftalmológicos familias caracterizadas molecularmente. AO ambos ojos, EP epitelio pigmentario, EOG electrooculograma.

DISCUSIÓN

La RP se caracteriza por la afectación primaria de los bastones de la retina que puede llevar a la ceguera legal después de varias décadas. Pertenece al grupo de la enfermedades raras, ya que presenta una prevalencia de 1 en 4000 [Hartong *et al*., 2006].

En España, se calcula que hay aproximadamente 25.000 personas afectadas de esta patología, de las cuales el 39% presentan arRP y el 41% son casos esporádicos (sRP) [Ayuso *et al*., 1995]. En la RP se observa una enorme heterogeneidad, tanto clínica como genética, lo que hace que el diagnóstico de estos pacientes sea una labor muy compleja. Actualmente, hay descritos alrededor de 50 genes como causa de RP, 33 de ellos se han asociado a arRP [*RetNet*., diciembre 2010].

A pesar de los grandes avances científicos en los últimos tiempos, el estudio exhaustivo de la función de algunos de los genes implicados, y el progreso en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad, la RP es una enfermedad para la cual actualmente aún no existen tratamientos ni paliativos ni curativos disponibles.

Con este trabajo se pretende resaltar la complejidad e importancia del diagnóstico molecular de los pacientes afectados de arRP y sRP en población española, y su repercusión para el manejo clínico presente y futuro de los pacientes.

A continuación se discutirán cada uno de los hallazgos obtenidos y descritos en el capítulo precedente. En **primer lugar**, se discutirán los resultados derivados del uso del *microarray* de genotipado y posterior cribado de los genes implicados, así como las ventajas e inconvenientes de la estrategia a seguir. En **segundo lugar**, se analizarán los resultados obtenidos tras el mapeo de homocigosidad haciendo mención a la utilidad de este abordaje en nuestra población. En **tercer lugar**, se argumentará la importancia del diagnóstico molecular para las familias afectadas, y **por último**, se discutirá la correlación genotipo-fenotipo observada en nuestros pacientes para algunos de los genes afectados.

5.1. USO DEL *MICROARRAY* DE GENOTIPADO Y POSTERIOR ANÁLISIS MEDIANTE OTRAS TÉCNICAS DE LABORATORIO.

5.1.1. FAMILIAS CARACTERIZADAS

Debido a la alta heterogeneidad genética de la arRP, la identificación de las mutaciones causales de la patología en estos pacientes supone un coste elevado tanto económico como de tiempo. En este trabajo se han estudiado 272 familias españolas afectadas de arRP mediante el uso de un *microarray* de genotipado específico para arRP seguido del cribado de los genes candidatos con el fin de establecer un diagnóstico molecular rápido y efectivo. Este abordaje ha permitido la caracterización molecular completa del 11% (30 de 272) del total de las familias estudiadas, además de la identificación de un alelo mutado en el 4,5% (12/272) de las familias, lo que supone aproximadamente en 15% del total de las familias analizadas

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el número de familias caracterizadas es más bajo que los descritos para otras DR en población española tras el uso del *microarray* de genotipado específico para cada caso, siendo del 23,8% para las familias españolas afectadas de *LCA* [Vallespín *et al*., 2007], del 56,5% para las familias españolas afectadas del síndrome de Usher [Jaijo *et al*., 2010], y algo más del 60% para las familias españolas afectadas de la enfermedad de Stargardt [Aguirre-Lambán *et al*., 2009].

A pesar de que la tecnología *APEX* permite la incorporación de nuevas mutaciones al análisis, las diferencias encontradas son debidas a que este *microarray* no incluye, a diferencia del resto de los *microarrays* para otras DR, todos los genes y mutaciones descritos para arRP. En el momento en el que se comenzó este estudio (año 2006), el *microarray* incluía 16 genes. Actualmente, están incluidos 19 de los 33 genes descritos como causa de arRP. Un dato importante es que el *microarray* no ha incluido hasta el presente, el gen *EYS*, el cual ha sido descrito como uno de los genes con mayor tasa de mutación en población española, contando con aproximadamente el 15% de todos los casos [Barragán *et al*., 2010]. Hay que añadir además que, debido a los avances en la tecnología, el número de mutaciones y genes asociados a esta patología está incrementando de forma exponencial, así, sólo en el año 2010 se han identificado 7

genes nuevos en arRP (*C2ORF71*, *FAM161*, *IMPG2*, *PDE6G*, *PRCD*, *TCC8* y *ZNF513*), lo que dificulta y encarece la actualización continúa de este *microarray* de genotipado.

A esto, hay que sumarle que la heterogeneidad genética que presenta la arRP es mucho mayor que para otras DR. Como se ha mencionado ya en varias ocasiones, actualmente hay 33 genes asociados a arRP, los cuales sólo son capaces de explicar algo más del 50% de todos los casos [Wright *et al*., 2010], mientras que a diferencia de otras distrofias de retina, como LCA, síndrome de Usher y enfermedad de *Stargardt*, en donde los genes identificados hasta la fecha explican el 70%, el 50% y prácticamente el total de los casos respectivamente [den Hollander *et al* 2010; Jaijo *et al*., 2010; den Hollander *et al* 2010].

Según la **clasificación genética**, el análisis estadístico muestra que no existen diferencias significativas ni en el porcentaje de familias caracterizadas con la estrategia seguida, ni en la distribución de los genes implicados entre las familias clasificadas como arRP y sRP. Por lo tanto, y como se ha descrito anteriormente [Wang *et al*., 2005], los resultados obtenidos apoyan que, la mayoría de los casos esporádicos presentan una herencia autonómica recesiva.

Si analizamos los resultados obtenidos según la **clasificación clínica** de las familias, se observa (Figura 4.11) que el porcentaje de familias caracterizadas para el grupo de la **RP juvenil** es del 12% (10 de 86) del total de las familias y del 11% (20 de 186) para el grupo de la **RP típica**. El análisis estadístico pone de manifiesto que no existen diferencias significativas entre ambos grupos, por lo que la eficiencia de la estrategia utilizada para el porcentaje de familias caracterizadas es la misma para las familias españolas afectadas de RP juvenil que de RP típica.

En un trabajo previo llevado a cabo en el laboratorio, se analizaron 57 de las 86 (66%) familias RP juvenil incluidas en este estudio, con resultado negativo, utilizando un *microarray* de genotipado específico para mutaciones de LCA. Lo que nos lleva a pensar que el porcentaje de total de familias caracterizadas (12%) hubiera sido mayor si se hubieran incluido las familias caracterizadas con el análisis previo de LCA.

Esta herramienta incluía en el momento del estudio dos genes (*CRB1* y *RPE65*) en común con el *microarray* de arRP. Sin embargo, la frecuencia detectada en este trabajo para *CRB1* es la única que podría estar ligeramente sesgada ya que las familias excluidas por su previa caracterización con el *microarray* de LCA sólo presentaban mutaciones en este gen.

El uso del *microarray* de genotipado específico para arRP combinado con el estudio familiar y secuenciación automática de los genes candidatos en este trabajo, nos ha permitido la caracterización de al menos el 11% de las familias estudiadas. Este bajo número de familias pone de manifiesto la necesidad del uso de otras herramientas con el fin de poder llegar a una completa caracterización molecular de las familias españolas afectadas de arRP.

5.1.2. ESPECTRO DE GENES Y MUTACIONES RESPONSABLES EN POBLACIÓN ESPAÑOLA

Al analizar los resultados obtenidos, y sin tener en cuenta aquellas familias en las que el gen afectado no cosegrega con la patología, se observa que, a diferencia de lo que ocurre entre los grupos sRP y arRP, los genes implicados en población española afectada de arRP son diferentes en los grupos RP juvenil y RP típica (Figura 4.13). Esta observación, desde el punto de vista biológico, podría explicar las diferencias en la gravedad de la patología entre ambos grupos de pacientes.

Los resultados derivados de este trabajo muestran como mutaciones en los genes *CRB1, PDE6B, RDH12, RLBP1* y *RPE65* se han detectado de manera exclusiva en el grupo de las familias afectadas de arRP juvenil, siendo los genes *CERKL* y *USH2A* únicamente afectados en el caso de las arRP típicas.

El gen con mayor tasa de mutación ha sido *RDH12* para el grupo de las familias afectadas de **arRP juvenil**. Mutaciones en este gen se han asociado a arRP de inicio precoz [Janecke *et al*., 2004]. Los resultados obtenidos muestran que el gen *RDH12* es el responsable del 3,4% (3 de 86) de las familias españolas afectadas de arRP juvenil. Esta frecuencia es similar a la reportada en población española en un estudio previo llevado a cabo por Valverde *et al*., [2009]. Un estudio realizado en otras poblaciones atribuye al gen *RDH12* el 2,2% de los casos [Thompson *et al*., 2005], que cuando lo comparamos con nuestro porcentaje de familias con mutación en *RDH12* no se observan diferencias significativas ($p>0.05$).

CRB1 es el segundo gen con mayor tasa de mutación en este grupo de pacientes, siendo el responsable del 2,3% de las familias afectadas de arRP juvenil. Tal y como se ha mencionado anteriormente, este porcentaje podría estar sesgado, ya que el 66% de las familias RP juvenil incluidas en este estudio se analizaron previamente con el *microarray* específico de LCA. Por lo tanto, se esperaría que *CRB1* fuera responsable de un porcentaje superior de familias RP juvenil en nuestra población.

El porcentaje observado en nuestra población es mayor al descrito por un estudio previo para otra población, el cual estima que la contribución del gen *CRB1* en arRP de inicio precoz es de aproximadamente el 1% [den Hollander *et al*., 2004]. Así ocurre

para este mismo gen cuando nos referimos a pacientes afectados de LCA. Mientras que en población española parece estar presente en un 20% de las familias afectadas de LCA [Vallespín *et al*., 2007], en otras poblaciones varía desde el 0% hasta el 15% de los casos [Zernant *et al*., 2005; Yzer *et al*., 2006; Henderson *et al*., 2010].

Las diferencias encontradas para el gen *CRB1* podrían deberse al fondo genético de las distintas poblaciones, que hace que, algunos de los genes implicados en DR, contribuyan de manera distinta cuando comparamos diferentes etnias [Marcos *et al*., 2001; Valverde *et al*., 2006; Vallespín *et al*., 2007].

Las mutaciones en el gen *RPE65* se han asociado a fenotipos graves como LCA [Marlhens *et al*., 1997] y arRP de inicio precoz [Gu *et al*., 1997]. Los resultados obtenidos en nuestro estudio atribuyen al gen *RPE65* el 1,1% de los casos. Datos recogidos en un estudio previo, afirman que el gen *RPE65* es el responsable del 2% de las familias afectadas de arRP [Hartong *et al*., 2006].

A diferencia de lo que parece ocurrir para el gen *CRB1*, no se encuentran diferencias significativas ($p>0.05$) cuando analizamos la contribución de los genes *RDH12*, *RPE65*, *PDE6B* [Bayés *et al*., 1995; McLaughlin *et al*., 1993] y *RLBP1* [Hartong *et al*., 2006].en nuestra población afectada de arRP juvenil frente a los estudios reportados en otras poblaciones

Para el grupo de las familias afectadas de **arRP típica**, *USH2A* ha sido el gen con mayor tasa de mutación. Mutaciones en este gen se han sido descritas en pacientes afectados de síndrome de Usher [Eudy *et al*., 1998] y en pacientes con arRP no sindrómica [Rivolta *et al*., 2002]. Los resultados obtenidos en este trabajo asignan al gen *USH2A* el 7,5% (14 de 186) del total de familias españolas afectadas, porcentaje similar al obtenido en un estudio previo para población norteamericana [Seyedahmadi *et al*., 2004].

El segundo gen con mayor tasa de mutación para el grupo de la arRP típica en población española es el gen *CERKL*. Mutaciones en este gen fueron asociadas a arRP tras un estudio llevado a cabo por Tuson *et al*., [2004] en familias españolas. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que *CERKL* es el responsable del 4,8% de las familias españolas afectadas de arRP típica. Durante la realización de este trabajo,

publicamos unos resultados con un total de 210 familias estudiadas, donde se describe que el gen *CERKL* es el responsable del 3,3% del total de las familias españolas afectadas de arRP [Ávila-Fernández *et al*., 2008], datos similares a los descritos en el estudio previo llevado a cabo por Tuson *et al*., [2004] Esta cifra es inferior a la descrita en este manuscrito debido a que no se tuvo en cuenta la clasificación clínica de las familias estudiadas.

Se han detectado mutaciones en los genes *CNGA1*, *PDE6A* y *SAG* en ambos grupos de familias, de inico precoz y típica.

Mutaciones en el gen *CNGA1* se han identificado en el 1,1% de las familias estudiadas afectadas de arRP. Todas ellas presentan una mutación *nonsense* que fue descrita en población española en el año 2002 por Paloma *et al*., y que está localizada en el segmento N-ternimal intracelular de la proteína. Esta mutación sólo ha sido identificada en población española, por lo que se podría tratar de una mutación con efecto fundador. La frecuencia de mutaciones en este gen en nuestra población de estudio es similar, no encontrándose diferencias significativas ($p>0.05$) con la contribución de este gen en otras poblaciones. [Zhang *et al*., 2004].

Mutaciones en los genes *PDE6A* y *SAG* son responsables del 0,74% cada uno del total de familias afectadas de arRP en nuestra población. Cifras similares han sido reportadas previamente en otras poblaciones, no encontrándose diferencias significativas [Hartong *et al*., 2006].

Mientras que en el grupo de arRP juvenil no se identificó una mutación frecuente, para en familias afectadas de arRP típica, la mutación más frecuente fue p.Arg257ter en el gen *CERKL*, seguida de la mutación p.Cys759Phe en el gen *USH2A*.

Todas las familias, en este estudio, que tienen alterado el gen *CERKL* presentan la misma mutación en homocigosis siendo la mutación más frecuente identificada en nuestra población. El hecho de que todas las familias presentasen la misma mutación, nos llevó a pensar la posibilidad de que todos estos pacientes tuviesen un mismo ancestro común. Para ello se realizó un análisis de haplotipos mediante el uso de marcadores tipo SNPs de cada una de los individuos afectados de siete familias y se observó que, a diferencia de lo descrito por Tuson *et al*., [2004], todo ellos compartían

el mismo haplotipo común. Esta diferencia se debe a que los marcadores utilizados por Tuson *et al*., se encuentran a mayor distancia del gen *CERKL* que los analizados en este trabajo. Por ello, y a pesar de la amplia distribución geográfica de las familias se pudo concluir que todos los pacientes afectados han heredado regiones idénticas procedentes de un mismo ancestro común [Ávila-Fernández *et al*., 2008]. Sería interesante llevar a cabo un estudio exhaustivo que nos permita datar el origen de esta mutación y así poder establecer como se ha producido la propagación de estas familias hasta alcanzar la amplia distribución geográfica que observamos en nuestro país.

La mutación p.Cys759Phe, en el gen *USH2A*, es la segunda más frecuente en nuestra cohorte de pacientes, estando presente en el 3,8% (14 de 372) del total de los alelos, y en el 6% (11 de 186) del total de las familias españolas afectadas de arRP típica. Estudios previos en población española atribuyen a esta mutación el 4,5% de los pacientes españoles afectados de arRP típica no sindrómica [Aller *et al*., 2004], donde se establecen al menos dos orígenes diferentes para la mutación p.Cys759Phe, pues en algunos casos está en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo p.His752His. En nuestra cohorte de pacientes la mutación está asociada a este polimorfismo en 12 de los 14 alelos mutados. La distribución geográfica de las familias muestra una concentración mayoritaria en el centro de la península. Este hallazgo podría indicar un posible ancestro común muy lejano a partir del cual hubieran derivado ambos haplotipos.

5.1.3. NUEVAS VARIANTES IDENTIFICADAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

El cribado de genes candidatos mediante secuenciación automática dio lugar a la identificación de cinco nuevas variantes en tres de los genes estudiados: *RDH12*, *RPE65* y *USH2A*.

La nueva variante c.13745delT; p.Ile4582LysfsX14 en el gen *USH2A* fue detectada en la familia RP-1059, la cual presentaba la mutación p.Cys759Phe [Rivolta *et al*., 2000] previamente identificada con el *microarray* de genotipado. La nueva variante es una mutación *frameshift* por lo que produce una alteración en el marco de lectura dando lugar a un codón de parada prematuro. Se deberían realizar estudios posteriores con el fin de determinar si dicha variante da lugar a la producción de una proteína defectuosa o por el contrario el ARNm mutado es degradado por el mecanismo celular "*nonsense mediated decay"* [Frischmeyer & Dietz *et*., 1999]. La naturaleza de la nueva variante junto con la cosegregación de la misma con la patología en la familia confirma la responsabilidad del gen *USH2A* en el desarrollo de la RP en este caso.

En el caso de las nuevas variantes *missense* identificadas, se llevó a cabo el estudio de patogenicidad con el fin de establecer el papel patogénico de las mismas y por lo tanto la implicación de cada uno de los genes en la enfermedad en las familias.

Para las nuevas variantes c.278T>C; p.Leu93Pro en *RDH12*, c.457A>G; p.Thr153Ala en *RPE65* y c.3713C>G y p.Thr1238Arg en *USH2A*, la cosegregación de los mutaciones en las familias, la ausencia de las variantes en población control, el análisis *in silico* que mostró afectación de la función de la proteína, la conservación del residuo a lo largo de la evolución, y la localización del residuo en el dominio catalítico de la proteína, a excepción de la variante c.3713C>G; p.Thr1238Arg en *USH2A* localizada entre dos dominios fibronectina tipo III, confirmarían el papel patogénico de las variantes, así como su implicación en la enfermedad.

La variante c.12575G>A p.Arg4192His identificada tras el cribado del gen *USH2A* en la familia RP-0653 ha sido descrita a lo largo de la elaboración de este trabajo por McGee *et al*., [2010] como una variante benigna. Sin embargo, la

cosegregación de la variante con la patología en la familia (Figura 4.9) y la ausencia de la misma en población control pone en duda la conclusión de McGee *et al*., [2010], por lo que se deben realizar estudios adicionales que permitan dilucidar el papel patogénico de esta variante.

5.1.4. FAMILIAS CON UNA MUTACIÓN EN HETEROCIGOSIS

En siete familias (RP-1147, RP-1311, RP-1023, RP-0467, RP-1016, RP-1053 y RP-1071) se detectó una mutación en heterocigosis con el *microarray* de genotipado, sin embargo el cribado de los genes candidatos no permitió la identificación del segundo alelo mutado. Esto puede ser debido a distintas razones:

Podría ocurrir que el segundo alelo mutado se encuentre en zonas intrónicas, regiones promotoras o reguladoras del gen, ya que sólo han sido secuenciados los exones y regiones intrónicas flanqueantes. Mutaciones en regiones intrónicas han sido descritas como causa de DR. Se ha descrito que una mutación en el intrón 26 del gen *CEP290* produce la inserción de un exón críptico que introduce un codon de parada prematuro [Perrault *et al*., 2007], siendo esta la mutación más prevalente en el gen *CEP290* para algunas poblaciones afectadas de LCA [den Hollander *et al*., 2006; Perrault *et al*., 2007].

Otra razón podría ser que existan grandes deleciones o inserciones que no hayan podido ser detectadas mediante secuenciación debido a las limitaciones de la técnica. Se han descrito grandes deleciones en el gen *USH2A* como causa del síndrome de Usher, así como en el gen *EYS*, gen asociado a arRP [Abd El-Aziz *et al*., 2008], y que además es responsable de aproximadamente el 15% de los casos en población española [Barragán *et al*., 2008].

Podría ocurrir que la variante detectada no fuera la responsable de la RP en la familia y actuara como un alelo modificador del fenotipo. Estudios realizados describen como variantes en los genes *RPGRP1L* [Khanna *et al*., 2009] y *AHI1* [Louie *et al*., 2010] explican la variabilidad observada en los fenotipos de la retina en pacientes afectados de ciliopatías retinianas.

Otra importante consideración del porqué de la detección de una única variante en algunas familias, incluyendo las familias RP-0159, RP-0235 y RP-1292 en las que los genes afectados no cosegregan con la patología, es que éstos pacientes sean portadores de dichas mutaciones debido a que existe una considerable carga mutacional en la

población general. Rivolta et al., [2002] estimaron que el 10% de los individuos sanos eran portadores de mutaciones. Recientemente, el proyecto "1000 genomas" [Durbin *et al.*, 2010] ha determinado que cada un individuo de la población general es portador de 50 a 100 variaciones previamente asociadas a patología.

Por último, la segunda mutación podría encontrarse en otro gen que esté interaccionando con los genes afectados, es decir, que estemos ante un caso de digenismo. En 1994, Kajiwara *et al*., describieron por primera vez que mutaciones en *ROM1* en combinación con mutaciones en heterocigosis en *RDS* eran causa de RP.

En el caso de la familia RP-1106, el estudio del gen *CRB1* por secuenciación automática no reveló un segundo alelo mutado. La variante detectada con el *microarray* de genotipado p.Asn984Ser fue descrita por den Hollander *et al*., [2001] en un paciente afectado de arRP con vasculopatía exudativa tipo *Coats*, sin embargo, en este caso tampoco se pudo detectar la segunda mutación en este gen. El estudio muestra como la variante no está presente en 180 cromosomas cuando se estudia en población control. Lo mismo ocurre en el estudio realizado por Vallespín *et al*., [2007] donde se detecta la variante en un paciente afectado de RP en el que no aparece una segunda variante patogénica. Estos resultados hicieron pensar que se tratase de una variante rara no patogénica o polimorfismo. Para verificarlo, se llevó a acabo un análisis *in silico* que mostró tolerancia al cambio, con un *score* de 0.1. El aminoácido se encuentra en uno de los dominios EGF, sin embargo, el residuo afectado no se encuentra muy conservado a lo largo de la evolución. Por lo tanto, el hecho de que no se detecte una segunda variante patogénica en *CRB1* en estas familias afectadas de RP, que el análisis *in silico* prediga tolerancia al cambio y que el aminoácido no se encuentre muy conservado a lo largo de la evolución hace que, a pesar de que no sea detectado en población control, se ponga en duda el papel patogénico del cambio p.Asn984Ser, apoyando la hipótesis de que se trate de un polimorfismo raro (frecuencia alélica <1%).

5.1.5. ANÁLISIS DE HOMOCIGOSIDAD

Se observó que el 66,6%, es decir, 20 de las 30 familias caracterizadas, donde sólo 10 de ellas eran consanguíneas, eran homocigotas para una mutación. Este porcentaje es muy superior al descrito, en diferentes estudios, para otras poblaciones de Europa occidental, donde sólo el 35% del total de las familias afectadas de enfermedades con herencia autonómica recesiva presentan mutaciones en homocigosis [Sandoval *et al*., 1999; Krone *et al*., 2000; Wissinger *et al*., 2001; Yzer *et al*., 2006; Roux *et al*., 2006; Littink *et al*., 2010].

El elevado número de familias con mutación en homocigosis establecido tras el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo hace que, la estrategia de mapeo de homocigosidad, elegida por Lander & Botstein., [1987] para la búsqueda de nuevos genes en familias consanguíneas, tome fuerza como método de elección para la caracterización de las familias españolas afectadas de arRP.

5.2. RESULTADOS DERIVADOS DEL USO DEL *MICROARRAY* DE *SNPS* PARA MAPEO DE HOMOCIGOSIDAD

El mapeo de homocigosidad llevado a cabo en 43 individuos pertenecientes a 18 familias consanguíneas españolas afectadas de arRP ha permitido la identificación de regiones relevantes de homocigosidad en el 94,4% (17 de 18). El posterior cribado de genes de RP y otras DR localizados en estas regiones permitió la identificación de nuevas mutaciones en el 55% (10 de 18) del total de las familias analizadas.

5.2.1. REGIONES DE HOMOCIGOSIDAD

Gibson *et al*., [2006] demostraron que individuos no emparentados comparten grandes regiones homocigotas comunes, sin embargo estas regiones son mayores en número y en tamaño en los individuos nacidos de una unión consanguínea, como resultado de heredar zonas genómicas idénticas a través de sus padres. La proporción del genoma homocigoto de un individuo, es decir el coeficiente de *inbreeding*, mide el grado de parentesco entre sus padres [Broman *et al*., 1999; Gibson *et al*., 2006; McQuillan *et al*., 2008]. Lo esperable en hijos nacidos de una unión de primos hermanos es que presenten regiones homocigotas largas, que cubran el 6,25% (1/16) de su genoma. Sin embargo, es importante tener en cuenta los resultados obtenidos en un estudio llevado a cabo por Wood *et al*., [2006] donde se demuestra que el porcentaje de homocigosidad está aumentado aproximadamente un 5% sobre lo esperado según los modelos simples de consanguinidad. Este aumento se debe al nivel de fondo de homocigosis que existe en la población general. Por lo que esperaríamos observar regiones que cubran entre el 10 y el 11% del genoma en estos casos.

Como era de esperar, ya que se trata de individuos nacidos de uniones consanguíneas, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que casi la totalidad (94,4%) de las familias estudiadas presentan regiones relevantes de homocigosidad. Sin embargo, la longitud media de las regiones homocigotas cubre el 1,1 % del genoma. Este dato es muy inferior, al que cabría esperar teniendo en cuenta que se trata de familias consanguíneas. Este valor refleja sólo las regiones comunes en los afectos y potencialmente ligadas a la enfermedad, y por tanto está infravalorado.

La ausencia de regiones homocigotas relevantes detectada en la familia RP-1073 (Tabla 4.12) podría deberse a que estemos ante un caso de RP ligada al cromosoma X. Si se observa el árbol genealógico de la familia (Anexo II), a pesar de que el caso índice y su hermano afectado sean hijos de una unión de primos hermanos, la presencia de un sobrino afectado, descendiente de una hija sana, parece dar fuerza a la idea de la herencia propuesta. Sin embargo, esta familia fue incluida en el análisis ya que estudios previos realizados en el laboratorio han descartado que la patología en este caso esté ligada a los genes asociados actualmente a xlRP. Los resultados obtenidos tras el mapeo de homocigosidad no parecen indicar que se trate de una herencia recesiva al no detectar regiones homocigotas tras el análisis.

5.2.2. CRIBADO DE GENES CANDIDATOS. IDENTIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES CAUSALES

En este apartado se discuten los resultados obtenidos tras el cribado de mutaciones en genes, previamente asociados a DR, que se encuentran en las regiones relevantes de homocigosidad detectadas.

En la familia RP-0043, la región homocigota de mayor tamaño (47Mb), incluía los genes *PCDH21*, *PDE6C* y *RGR*, mientras que en la segunda más grande se encontraba el gen *LRAT*. En primer lugar, se realizó el cribado de los genes RGR [Morimura *et al*., 1999], y *LRAT* [Thompson *et al*., 2001], ya que mutaciones en estos genes se han descrito en pacientes con arRP. La ausencia de variantes patogénicas nos llevó a cribar *PDE6C* y *PCDH21*, genes asociados a DCB. Este análisis permitió la identificación de una nueva variante (c.1458+2T>C) en *PCDH21* que consiste en el cambio de una Timina por una Citosina en la secuencia consenso del sitio donador de *splicing* del intrón 13.

Para la familia RP-0055 se llevó a cabo el cribado del gen EYS, gen asociado a arRP, localizado en la región homocigota de mayor tamaño (17Mb). El estudio permitió la identificación de una nueva variante (c.5928-2A>G) que consiste en el cambio de una Adenina por una Guanina en la secuencia consenso del sitio aceptor de *splicing* del intrón 28.

Se sabe que las mutaciones en los sitios de *splicing* pueden alterar la función de la proteína o bien por la omisión de un exón o bien por el uso de un sitio de *splicing* críptico [Takahara *et al*., 2002]. El análisis *in silico* de las variantes muestra una afectación del sitio donador, para el gen *PCDH21*, y aceptor para el gen *EYS*. La alteración del sitio donador y aceptor de *splicing*, respectivamente, la ausencia en controles para la nueva variación en gen *PCDH21*, y la segregación de las mutaciones en las familias (Figura 4.16) confirman la implicación de los genes *PCDH21* y *EYS* en la patología de las familias RP-0043 y RP-0055.

En la familia RP-0285, la región homocigota de mayor tamaño (47Mb) incluía los genes *EYS*, *LCA5* y *RIMS1*. En primer lugar, se descartaron mutaciones patogénicas en

el gen *EYS*, único gen asociado a arRP. Posteriormente se llevó a cabo el estudio del gen *LCA5*, previamente asociado a LCA en el 1-2% de los casos [den Hollander et al., 2007]. El cribado del gen permitió la identificación de la nueva variante *frameshift* (c.149delA; p.Asn50IlefsX77) que consiste en la deleción de una Adenina produciendo un cambio de aminácido en la posición 50 y dando lugar a un codón de parada prematuro. La naturaleza de la nueva variante junto con la cosegregación de la misma con la patología en la familia confirma la responsabilidad del gen *LCA5* en este caso.

Tras el análisis de homocigosidad, la región de mayor tamaño (32Mb) detectada en la familia RP-0503 incluía los genes *MERTK* y *NPHP1*. En primer lugar se llevó a cabo el estudio del gen *MERTK*, previamente asociado a arRP y LCA [Gal *et al*., 2000]. El cribado permitió la identificación de una nueva variante *frameshift* (c.149delAC; p.Ser331CysfsX5) que consiste en la deleción de una Adenina y una Citosina produciendo un cambio de aminácido en la posición 331 y dando lugar a un codón prematuro de terminación. La naturaleza de la nueva variante junto con la cosegregación de la misma con la patología en la familia confirma la responsabilidad del gen *MERTK* en este caso.

Para las familias RP-0509 y RP-1190 se llevó a cabo el cribado del gen *CNGB1*, localizado en ambos casos en la segunda región homocigota según tamaño. La familia RP-0509 contenía en la región más grande (9,4Mb) el gen *ABCA4*, gen asociado principalmente a la enfermedad de Stargardt. Es un gen con un tamaño muy grande (50 exones) y es responsable de un porcentaje muy pequeño de casos de arRP. En la familia RP-1190, la región de mayor tamaño (24Mb) contenía el *locus* RP22, en donde no se ha identificado el gen responsable. Por ello, se priorizó la secuenciación de *CNGB1*, gen de menor tamaño y responsable de hasta el 4% de los casos [Hartong *et al*., 2006].

El cribado del gen *CNGB1* permitió la identificación de la mutación responsable en ambos casos.

Para la familia RP-0509 se detectó una nueva variante (c.1150C>T; p.Gln384ter) que da lugar a un codón prematuro de terminación en el aminoácido 384. La naturaleza de la nueva variante junto con la cosegregación de la misma con la patología en la familia confirma la responsabilidad del gen *CNGB1* en este caso.

En el caso de la familia RP-1190, se identificó una variante (c.2957A>T; p.Asn986Ile) que da lugar a un cambio de aminoácido en la posición 986. Además de

que la mutación cosegrega con la enfermedad en la familia y que el residuo afectado se encuentra en el dominio proteico de unión a GMPc, el estudio de patogenicidad de la variante muestra la ausencia de la misma en población control, probable afectación de la función de la proteína y patogenicidad tras el análisis *in silico* y conservación del residuo a lo largo de la evolución. Todos estos puntos están a favor de la patogenicidad de la variante, confirmado por la descripción como causa de arRP en una familia por Simpson *et al*., [2010]. Por lo tanto podemos confirmar la implicación de esta mutación en el gen *CNGB1* como responsable de la patología en la familia.

En el caso de la familia RP-1296, se realizó el cribado del gen *RP1* ya que es el único gen asociado a DR que se encontraba en la única región homocigota relevante (8Mb) que presentaba esta familia. Mutaciones en el *RP1* se han asociado a adRP [Pierce *et al*., 1999] y a arRP [Khaliq *et al*., 2005]. El estudio dio lugar a la identificación de una nueva variante (c.1625C>G; p.Ser541ter) que produce un codón de parada prematuro. La naturaleza de la nueva variante junto con la cosegregación de la misma con la patología en la familia confirma la responsabilidad del gen *RP1* en este caso.

Como mutaciones en *RP1* han sido asociadas preferentemente a adRP, el fenotipo de los individuos afectados que presentan la nueva variante, así como el de los portadores de la mutación, será discutido en el apartado 5.4 de este capítulo.

Para la familia RP-1374 se cribó el gen *SPATA7* que se encontraba en la tercera región homocigota (4Mb) según tamaño junto con el gen *TCC8*. En el momento en el que se llevó a cabo este análisis, el gen *TCC8* aún no había sido asociado a arRP, mientras que mutaciones en *SPATA7* habían sido descritas como causa de LCA y arRP de inicio precoz [Wang *et al*., 2009]. El cribado permitió la identificación de una nueva variante (c.253C>T; p.Arg84ter) que produce un codón de parada prematuro. La naturaleza de la nueva variante junto con la cosegregación de la misma con la patología en la familia confirma la responsabilidad del gen *SPATA7* en este caso.

En los casos de las nuevas variantes identificadas en los genes *LCA5*, *MERTK*, *CNGB1*, *RP1 y SPATA7*, las cuales dan lugar a un codón de parada prematura. Se deben realizar estudios funcionales posteriores con el fin de determinar si dicha variante da

lugar a la producción de una proteína defectuosa o por el contrario el ARNm mutado es degradado por el mecanismo celular "*nonsense mediated decay*" [Frischmeyer & Dietz *et*.,1999], mediante el cual los transcritos anormales son eliminados.

Para las familias RP-0573 y RP-1411 se realizó el cribado del gen *RPE65*, único gen previamente asociado a DR. Mutaciones en este gen se han asociado a LCA [Marlhens *et al*., 1997] y a arRP de inicio precoz [Gu *et al*., 1997].

Para la familia RP-0573 se identificó una nueva variante (c.560G>A; p.Gly187Glu) que produce un cambio de aminoácido en la posición 187. Tal y como se muestra en la figura 4.17, el residuo afectado se encuentra en el domino catalítico de la proteína. Además de que la nueva variante cosegrega con la enfermedad en la familia, el estudio de patogenicidad muestra la ausencia de la misma en población control, probable afectación de la función de la proteína y patogenicidad tras el análisis *in silico* y conservación del residuo a lo largo de la evolución. El hecho de que todos los puntos descritos apoyen la patogenicidad de la nueva variante identificada, confirma la implicación de gen *RPE65* en la patología en esta familia.

En el caso de la familia RP-1411 el cribado del gen dio lugar a la identificación de la variante c.331C>T; p.Pro111Ser. La segregación de la mutación en la familia y la asociación previa de la variante en una familia afectada de arRP [Cortón *et al*., 2011] corroboran la implicación de la mutación p.Pro111Ser en el gen *RPE65* en la enfermedad en esta familia.

El cribado del gen *CLRN1* en la familia RP-1105 no mostró ninguna variante patogénica. La ausencia de mutaciones tras la secuenciación no descarta la posible implicación del gen en la patología de la familia ya que solo se han secuenciado los exones y regiones flanqueantes, quedando sin analizar los intrones y regiones promotoras y reguladoras del gen. Además, la técnica empleada no es capaz de detectar grandes deleciones o duplicaciones. Un estudio reciente [Västinsalo *et al*., 2011] revela la presencia de 11 isoformas distintas del gen *CLRN1*, sugiriendo que la complejidad del gen es mucho mayor que la conocida hasta el momento. Este dato sumado a los anteriores justifica que este gen no sea descartado por el momento como causa de arRP en esta familia.

Tal y como se ha descrito en estudios anteriores, se observa que las mutaciones identificadas están en su mayoría localizadas en una de las regiones de mayor tamaño [den Hollander *et al*., 2007; Schraders *et al*., 2010; Littink *et al*., 2010]. Esto es de esperar ya que cuanto más grande es la región, mayor número de genes contiene por lo que es más probable que la mutaciones se encuentren en uno de ellos.

En el 55% (10 de 18) del total de las familias estudiadas, tras el mapeo de homocigosidad se identificó la mutación responsable de la patología. La media del tamaño de las regiones de homocigosidad que contienen la mutación causante de la enfermedad en nuestra serie es de 19,3Mb, valor algo menor que la media observada en estudios previos [Wood *et al*., 2006; den Hollander *et al*., 2007]. Esta diferencia podría ser debida al hecho de que en este trabajo se ha tomado como unión consanguínea a la unión entre individuos relacionados como primos terceros o más cercanos, por lo que se espera que las regiones de homocigosidad tengan un tamaño menor, mientras que los estudios previos incluyen como individuos consanguíneos aquellos que proceden de uniones entre primos segundos o más cercanos [Carothers *et al*., 2006].

En las regiones homocigotas relevantes de cinco de las 17 familias no se han identificado genes previamente asociados a DR. Este hallazgo parece indicar que la RP en estas familias es debida a mutaciones en nuevos genes, no identificados hasta el momento como causa de arRP.

5.2.3. VENTAJAS E INCONVENIENTES DEL MAPEO DE HOMOCIGOSIDAD

El método de mapeo de homocigosidad ha mostrado ser muy eficaz en la identificación de nuevas mutaciones en nuestra población. Estudios previos han descrito diferente efectividad del método identificándose las mutaciones responsables en aproximadamente el 15% de las familias arRP [Singh *et al*., 2009; Collin *et al*., 2011], en el 30% de familias consanguíneas afectadas de LCA [den Hollander *et al*., 2007], siendo del 100% para familias consanguíneas afectadas del síndrome de Bardet-Biedl [Abu Safieh *et al*., 2010] y del 28% de los casos consanguíneos para una población afectada de DCB [Littink *et al*., 2010].

Aunque esta estrategia es muy efectiva cuando se trata de familias consanguíneas informativas, es decir con más de un individuo afectado, es el análisis de los casos esporádicos, una de las principales limitaciones del mapeo de homocigosidad para una enfermedad tan heterogénea genéticamente como es la arRP. Para éstos casos se obtendrían una gran cantidad de regiones homocigotas relevantes que contendrían una enorme cantidad de genes candidatos disminuyendo así la eficiencia de la estrategia seguida, tanto para la identificaión de nuevas mutaciones en genes conocidos como para la identificaión de nuevos genes [Hildebrandt *et al*., 2009].

El mapeo de homocigosidad también presenta sus ventajas y desventajas cuando se intenta aplicar a familias no consanguíneas. En estas familias, aunque la posibilidad de que los individuos presenten una mutación en homocigosis es menor, también lo es el número y tamaño de regiones homocigotas, lo que facilitaría la identificación de nuevas mutaciones y/o nuevos genes. Distintos estudios han permitido la identificación de nuevas mutaciones y nuevos *loci* mediante el uso de esta estrategia en familias no consanguíneas [den Hollander *et al*., 2007; Littink *et al*., 2010; Collin *et al*., 2008].

Tal y como se ha discutido en al apartado 5.1.3 de este capítulo, a diferencia de otras poblaciones europeas donde el porcentaje de los pacientes que presentan una mutación en homocigosis es el 35% [Sandoval *et al*., 1999; Krone *et al*., 2000; Wissinger *et al*., 2001; Yzer *et al*., 2006; Roux *et al*., 2006; Littink *et al*., 2010], los resultados de este trabajo muestran cómo para población española este porcentaje es

muy superior, alcanzando un 66,6% del total de los pacientes, y siendo de un 65% cuando nos referimos a pacientes procedentes de familias no consanguíneas.

Este resultado apoya la idea de la utilización del mapeo de homocigosidad como aproximación eficaz para la caracterización de familias españolas no consanguíneas afectadas de arRP, ya que se esperaría la identificación de las mutaciones en el 65% de ellas.

5.3. IMPORTANCIA DE LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS FAMILIAS

El objetivo principal de este trabajo ha sido la utilización de un abordaje metodológico múltiple con el fin de identificar las mutaciones y genes responsables de las familias españolas afectadas de arRP. A pesar de las dificultades para el estudio genético de la RP a nivel técnico y económico derivados de la heterogeneidad de la enfermedad, una buena caracterización molecular proporciona a las familias afectadas una serie de ventajas.

Uno de los aspectos más importante del diagnóstico molecular es el consejo genético, o lo que es lo mismo, la estimación del riesgo de recurrencia para la futura descendencia. Además, conocer cual es el defecto genético resulta de gran ayuda para la confirmación del diagnóstico clínico preliminar, ya que muchas de las DR en sus estadios iniciales presentan características clínicas similares. Un estudio realizado por Weiss & Biersdorf [1989] mostraba como pacientes afectados de DR visitaban de media a siete oftalmólogos antes de ser diagnosticados.

Otra de las ventajas a tener en cuenta es que el diagnóstico molecular nos va a permitir dar consejos alimentarios que van a depender del defecto genético que presente el paciente. Hay evidencias de que la administración de vitamina A es beneficiosa para pacientes afectados de RP [Berson *et al*., 1993; Li *et al*., 1998], sin embargo, se ha visto que este suplemento es perjudicial en formas genéticas asociadas a mutaciones en el gen *abca4* en ratones [Radu *et al*., 2008].

A pesar de la gran heterogeneidad clínica que presentan las DR, el diagnóstico molecular nos lleva, en algunas ocasiones, a establecer una relación genotipo-fenotipo que nos permite proporcionar al paciente un pronóstico más exacto de la enfermedad.

Por último señalar que debido a los avances que se están produciendo en la terapia génica y otros tratamientos, el diagnóstico genético ha pasado a ser algo indispensable para que los pacientes puedan ser incluidos en ensayos clínicos.

5.4. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

En este apartado se discute el fenotipo que presentan los pacientes caracterizados tras el trabajo realizado con el fin de establecer una relación genotipo-fenotipo que nos permita conocer el pronóstico más exacto de la enfermedad.

Mutaciones en los genes *CNGA1* y *PDE6A* se han asociado principalmente a fenotipos de inicio precoz [Paloma *et al*., 2002; Zang *et al*., 2004; Huang *et al*., 1995; Riazuddiu *et al*., 2006; Cortón *et al*., 2010]. Sin embargo, en este trabajo, las familias RP-1080 y RP-0881, con mutaciones en *CNGA1* y *PDE6A*, respectivamente presentan un fenotipo de inicio tardío.

Esto podría explicarse debido a la variabilidad clínica o expresividad variable, característica de las DR, que hace que la misma mutación produzca distintos fenotipos de unas familias a otras, pudiendo ocurrir incluso dentro de una misma familia. Esta variabilidad fenotípica podría deberse a la presencia de alelos modificadores al igual que se han descrito para otras DR [Khanna *et al*., 2009; Louie *et al*., 2010]. En este caso, ya que las mutaciones en estos genes se han asociado a arRP juvenil, podríamos pensar en la existencia de alelos protectores haciendo que el fenotipo de la RP fuera menos agresivo.

Mutaciones en el gen *CNGB1* se han asociado tanto a arRP típica como a arRP juvenil [Bariel *et al*., 2001; Kondo *et al*., 2004; Becirovic *et al*., 2010].

Tras el estudio realizado dos familias presentaron mutación en este gen. La familia RP-0509 presenta un fenotipo juvenil. A pesar de que no se dispone de informes oftalmológicos, ambos afectos refieren ceguera nocturna y disminución del campo visual desde el nacimiento con una disminución de la agudeza visual a los 14 años de edad. En el caso de la familia RP-1190 tanto los datos aportados por los pacientes como los datos oftalmológicos refieren un fenotipo de inicio más tardío. A pesar de que tras los estudios previos no se haya podido establecer una correlación entre el tipo de mutación y la severidad del fenotipo [Bariel *et al*., 2001; Kondo *et al*., 2004; Becirovic *et al*., 2010], nuestros resultados podrían fortalecer la idea de que el fenotipo precoz que presentan los individuos afectados de la familia RP-0503 se deba a que la mutación que presentan, p.Gln384ter, que produce un codón prematuro de parada, de lugar a una

proteína más corta que puede ser degradada por el mecanismo celular NMD o no ser funcional por la pérdida de su dominio transportador de iones y su dominio de unión a GMPc. De modo que se produzca un fenotipo más agresivo que el en caso de la mutación, p.Asn986Ile, que presenta la familia RP-1190. La mutación produce un cambio de aminoácido que como se ha descrito recientemente [Simpson *et al*., 2010] es probable que esté afectando al sitio de unión de GMPc o produciendo un cambio en la estructura de la proteína.

Mutaciones en el ge *EYS* se han asociado a arRP en distintas poblaciones [Abd El-Aziz *et al*., 2008; Collin *et al*., 2008; Abd El-Aziz *et al*., 2010; Audo *et al*., 2010; Bandah-Rozenfeld *et al*., 2010; Littink *et al*., 2010; Barragán *et al*., 2010; Huang *et al*., 2010].

Todas las familias, con mutación en este gen, descritas hasta el momento presentan las características de la RP típica. Tanto la edad de inicio como el resto de síntomas y signos oftalmológicos detectados en la familia RP-0055 coinciden con lo descrito en estudios anteriores.

Mutaciones en el gen *MERTK* se han asociado a un fenotipo de inicio precoz con afectación macular en estadios tempranos [McHenry *et al*., 2004; Tschernutter *et al*., 2006; Mackay *et al*., 2010]. Los datos oftalmológicos presentados para la familia RP-0503, confirman que, tal y como se ha observado en otros estudios, que la mutación p.Ser331CysfsX5 causa un fenotipo de distrofia de bastones-conos en esta familia española.

Mutaciones en el gen *PCDH21* se han asociado recientemente a DCB [Ostergaard *et al*., 2010].

La familia RP-0043 fue clasificada previamente como arRP, sin embargo el análisis posterior de los datos oftalmológicos confirman, junto con la nueva mutación identificada en el gen *PCDH21*, que los individuos afectados presentan una DCB, debido a la afectación inicial de los conos reflejada por la disminución de la agudeza visual como primer síntoma.

Mutaciones en el gen *RDH12* se han asociado a LCA y a arRP de inico precoz [Janecke *et al*., 2004]. Se han llevado a cabo distintos estudios con el fin de establecer una asociación genotipo-fenotipo en pacientes afectados de arRP juvenil, observándose

que mutaciones en este se asocian a un fenotipo severo [Perrault *et al*., 2004; Janecke *et al*., 2004; Schuster *et al*., 2007; Valverde *et al*., 2009].

La familia RP-0340 presentó la mutación p.Trp155Ile en homocigosis. El fenotipo descrito previamente asociado a esta mutación en otra familia española muestra una edad de inicio en la primera década de la vida con una progresión lenta, ya que presenta mantenimiento de percepción de luz hasta la cuarta década. El fondo de ojo era característico de RP y el ERG estaba abolido en ambos ojos [Valverde *et al*., 2009]. A pesar de no disponer de datos oftalmológicos de nuestro paciente, el fenotipo parece asemejarse al descrito previamente, ya que presenta un inicio muy precoz manteniendo una buena agudeza visual hasta prácticamente la tercera década de la vida.

En el caso de la familia RP-1339, el caso índice presenta las mutaciones p.Leu99Ile y p.Ile93Pro. Estudios previos han asociado la mutación p.Leu99Ile en homocigosis con fenotipo severo, que incluye afectación macular, escotoma central y baja agudeza visual, mientras que la misma mutación en heterocigosis junto con mutaciones *frameshift* se han asociado a un fenotipo más severo, ya que los pacientes presentan una agudeza visual de percepción de luz o cuenta dedos en una edad mucho más temprana, que varía desde al nacimiento hasta los siete años de edad. [Valverde *et al*., 2009]. El fenotipo que presenta el paciente coincide con el fenotipo descrito por Valverde *et al*., cuando la mutación se presenta en homocigosis. En este caso, dicha mutación va asociada a p.Ile93Pro, cambio que afecta a un residuo que se encuentra seis aminoácidos antes, por lo que es probable que la afectación de la proteína sea similar. Estudios funcionales de la proteína RDH12 sugieren que las variantes *missense* conducen una reducción significativa de expresión y actividad de la proteína [Thompson *et al*., 2005].

Mutaciones en el gen *RLBP1* se han asociado a distintos tipos de distrofias de retina: a retinosis *punctata albencens* (RPA) en la mayoría de los casos [Morimura *et al*., 1999; Demirci *et al*., 2004; Fishman *et al*., 2004; Nakamura *et al*., 2005], a arRP [Maw *et al*., 1997] y a distrofia Bothnia, variante atípica de RP, con ceguera nocturna, RPA y afectación macular [Bursted *et al*., 1997].

La familia RP-0979 presentó la mutación p.Arg151Gln. Esta mutación fue descrita por Maw *et al*., [1997] en una familia clasificada como arRP; la revisión del fenotipo descrito en este trabajo con la presencia de pequeños puntos blancos en el fondo de ojo y la degeneración macular apuntan hacia una distrofia Bothnia [Bursted *et al*., 1997;

Fishman *et al*., 2004]. De manera similar, la familia RP-0979 fue clasificada como arRP típica, sin embargo el análisis posterior de los datos oftalmológicos confirman características de RPA con afectación macular por lo que el fenotipo concuerda con una distrofia Bothnia.

Mutaciones en el gen *RPE65* se han asociado a fenotipos graves, como LCA [Marlhens *et al*., 1997], y arRP precoz [Gu *et al*., 1997]. Estudios posteriores afirman que la mayoría de los pacientes que presentan mutaciones en el gen *RPE65* son diagnosticados con ceguera nocturna, restricción del campo visual y nistagmo en edades muy tempranas. El ERG no es detectable en condiciones escotópicas. Sin embargo, muchos de estos pacientes tienen una visión suficiente en edad escolar que van perdiendo gradualmente hasta una ceguera legal en la tercera década de la vida [Thompson *et al*., 2000; Thompson *et al*., 2003], fenotipo similar al que presenta la familia RP-1411. Un estudio realizado por Marlhens et al., [1998] describe un fenotipo más leve en la infancia con una progresión más lenta de la enfermedad, que concuerda con el fenotipo de la familia RP-1115, que presenta la mutación c.94-2A>T, descrita por Hanein *et al*., [2004], y asociada también a un fenotipo más leve.
Las diferencias observadas en los fenotipos de las familias confirman, al igual que se observa en el trabajo llevado a cabo por Thompson *et al*., [2000], que la gravedad de la enfermedad es independiente del tipo de mutaciones que presentan, ya que la familia RP-1411, que tiene una mutación *missense* en homocigosis, presenta un fenotipo más agresivo que la familia RP-1115 con una mutación que afecta el sitio de *splicing*. Esto sugiere la posibilidad de que algunas mutaciones *missense* den lugar a alelos nulos o tal y como se ha descrito para otras DR, la variabilidad fenotípica se deba a la presencia de alelos modificadores [Khanna *et al*., 2009; Louis *et al*., 2010].

Mutaciones en el gen *SAG* se han asociado a la enfermedad de Oguchi [Maw *et al*., 1998] y a arRP [Nakazawa *et al*., 1998] El caso índice de la familia RP-1206 presenta un fenotipo de RP típica. Al igual que ocurre con muchos de los genes implicados en DR, mutaciones en el gen *SAG* puedan lugar a distintos fenotipos. Este fenómeno es debido a la expresividad variable de las distintas mutaciones en este gen.

Mutaciones en el gen *USH2A* se han asociado a síndrome de Usher tipo II [Eudy *et al*., 1998], a síndrome de Usher atípico [Liu *et al.* 1999], y a arRP [Rivolta *et al*., 2000].

La mayoría de los pacientes de Usher se clasifican en tres grupos en función de sus características clínicas [Usher *et al.*, 1935]. El tipo I (USH1) es la forma más severa, consiste en una sordera congénita de grave a profunda, disfunción vestibular al nacimiento y RP de inicio generalmente antes de la pubertad. El tipo II (USH2) se caracteriza por una sordera congénita moderada o grave, una función vestibular normal y una RP de inicio en la pubertad o después de la pubertad. El síndrome tipo III (USH2) consiste en una sordera progresiva de grave a profunda, una variable disfunción vestibular y una RP de inicio en la pubertad o después de la pubertad. Esta forma es menos frecuente, a excepción de algunas poblaciones. Sin embargo, algunos casos no son fácilmente clasificables en las categorías mencionadas por lo que han sido categorizados en un grupo denominado síndrome de Usher atípico [Otterstedde *et al.*, 2001].

Las familias RP-0332, RP-0849 y RP-0930 presentaron la mutación p.Cys759Phe. Distintos estudios afirman que los pacientes que portan esta mutación en homocigosis presentan una RP no sindrómica [Rivolta *et al.*, 2000; Bernal *et al.*, 2003; Seyedahmadi *et al.*, 2004]. También se ha descrito en un individuo, que siendo homocigoto para la mutación, no padecía la enfermedad [Bernal *et al.*, 2003]. Al analizar el fenotipo que presentan nuestras familias, se observa que, la familia RP-0332 presenta una arRP típica no sindrómica, debido a que a los 53 años de edad la audiometría es normal. La RP-0849 presenta una arRP con un inicio en la cuarta década de la vida para todos los individuos afectados. No refieren pérdida auditiva a los 50 y 60 años de vida. Sin embargo, en la familia RP-0930, el caso índice, con RP típica sin pérdida auditiva a los 50 años, presenta en una última revisión, a los 54 años de edad, una sordera leve-moderada bilateral en los agudos. El fenotipo observado en este paciente se podría incluir en el grupo de Usher atípico, pues no se corresponde con ninguna de las tres categorías establecidas.

Cuatro familias, RP-0204, RP-0653, RP-0721 y RP-1059, fueron doble heterocigotas para la mutación p.Cys759Phe junto con otra mutación *missense o frameshift* en el gen *USH2A*. Todas ellas presentan arRP típica. Las familias RP-0204 y RP-0653 no refieren sordera a la edad de 39 y 32 años respectivamente, sin embargo no se dispone de informes clínicos concluyentes que lo descarten. Por otro lado, la familia RP-0721 presenta una sordera bilateral leve en los agudos a los 53 años de edad, a pesar de no haber referido hipoacusia en una revisión anterior a los 44 años. La familia RP-

1059 no refiere hipoacusia y la ATL es normal a los 38 años de edad Al igual que lo observado en este trabajo, otros estudios muestran como la mutación pCys759Phe en presencia de otras mutaciones puede dar lugar tanto a RP no sindrómica, como a Usher atípico y como a Usher tipo II [Rivolta *et al.*, 2000; Bernal *et al.*, 2003; Seyedahmadi *et al.*, 2004; Bernal *et al*., 2005].

La familia RP-0260, doble heterocigoto para las mutaciones p.Cys3267Arg y p.Cys3358Tyr, presenta una RP típica. La audiometría es normal a los 39 años de edad.

Los resultados obtenidos como la RP en los pacientes con mutaciones en el gen *USH2A* es muy variable fenotípicamente, lo que dificulta el establecimiento de una correlación genotipo-fenotipo. La ausencia de sordera en las familias RP-1059 y RP-0260 no descarta la aparición de la misma en edades más avanzadas. La sordera bilateral en los agudos detectada en nuestros pacientes parece tener un inicio tardío y su gravedad es de leve a moderada.

Por todo lo anterior se resalta la necesidad de llevar a cabo una valoración y seguimiento de la función auditiva de todos aquellos pacientes afectados con mutaciones en el gen *USH2A*. De otra forma estaremos sobreestimando la contribución de este gen en la población afectada a arRP.

5.4.1. NUEVOS HALLAZGOS DERIVADOS DE ESTE TRABAJO

GEN *CERKL*

Los pacientes con la mutación p.Arg257ter en el gen *CERKL* presentaron todo un fenotipo común (Anexo VI). A pesar de que *CERKL*, además de expresarse en retina se expresa también en riñón, pulmón y páncreas, y en niveles más bajos se expresa en cerebro, placenta e hígado [Tuson *et al*., 2004], nuestros pacientes no presentaron síntomas extraoculares. La edad de inicio corresponde a la segunda década de la vida, el curso de la enfermedad y las características de la retina parecen ir ligadas a la mutación p.Arg257ter. Todos los pacientes estuvieron libres de síntomas hasta la segunda década de la vida. La media de edad del primer síntoma fue los 23 años de edad. El primer síntoma que presentaron fue ceguera nocturna seguida de una rápida pérdida de función visual.

Todos los pacientes referían tener ceguera nocturna, disminución del campo visual, sensibilidad al a la luz y dificultad en la discriminación de los colores, lo que sugiere que tienen igualmente afectado el sistema de conos y de bastones.

Tal y como se observa en la figura 4.19., el fondo de ojo muestra lesiones redondeadas de atrofia coriorretiniana en la periferia, en parte confluentes con acúmulos de pigmento. Estas características se asemejan a una atrofia *girata;* sin embargo, las personas con la mutación presentan como característica adicional una atrofia macular. La mayoría de los pacientes presentan pigmento en la media periferia en forma de espículas.

Aunque mutaciones en el gen *CERKL* han sido previamente asociadas a arRP [Tuson *et al*., 2004], este trabajo muestra la primera asociación genotipo-fenotipo para mutaciones en este gen [Ávila-Fernández *et al*., 2008]; permitiendo la identificación de las características fenotípicas de esta mutación en los pacientes afectados de arRP, así como el poder conocer la evolución de la enfermedad de estos pacientes.

Estudios posteriores asocian la mutación p.Arg257ter y otras mutaciones en el gen *CERKL* a un fenotipo de DCB [Aleman *et al*., 2009; Littink *et al*., 2010].

GEN *LCA5*

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la presencia de una mutación en homocigosis en el gen *LCA5* en la familia RP-0285. Dado que mutaciones en este gen no habían sido asociadas previamente a arRP, sólo a LCA [den Hollander *et al*., 2007].se llevó a cabo un análisis detallado de los datos oftalmológicos de los tres individuos afectados de esta familia, con el fin de determinar si se trataba de una nueva asociación o por el contrario la clasificación clínica de la familia había sido errónea.

Los datos oftalmológicos disponibles fueron recogidos en la segunda década de la vida en los tres casos. La presencia de *nistagmo* (II:4, II:7 y II:10), de queratocono bilateral (II:7) y la afectación macular (II:10) en todos o en alguno de los individuos afectados son características típicas de fenotipo LCA. El caso índice refiere buena visión hasta los 12 años de edad lo que parece acercarse más a una RP juvenil. Para poder concluir si se trata de un fenotipo LCA sería necesario el estudio de informes oftalmológicos previos a los cuales no hemos podido tener acceso. Sin embargo, la presencia de mutaciones en *LCA5* junto con la ausencia de mutaciones tras el cribado del gen en un total de 117 familias afectadas de arRP, apoyan la idea de que la familia RP-0285 está afectada de LCA. Los datos oftalmológicos discutidos previamente concuerdan con el fenotipo LCA tipo II que se caracteriza por una distrofia de bastones-conos progresiva, presente en otras mutaciones de *LCA5* [Gerber *et al*., 2007].

La variación fenotípica intrafamiliar detectada a nivel de edad de inicio y progresión, podría deberse a la presencia de alelos modificadores [Khanna *et al*., 2009; Louie *et al*., 2010].

GEN *RP1*

Mutaciones en el gen *RP1* se han asociado tanto a formas dominantes [Pierce *et al*., 1999] como a formas recesivas de RP [Khaliq *et al*., 2005].

Recientemente, Chen *et al*., [2010] proponen cuatro clases de mutaciones que producen un codón de parada en el gen *RP1* en función de las distintas implicaciones que pueden tener en la RP. Clase I, mutaciones en el exón 2 y 3 sensibles al mecanismo NMD. Estas mutaciones no causan RP en humanos debido a la pérdida de expresión por

NMD; Clase II, mutaciones localizadas desde el residuo 500 al 1053, que son insensibles al mecanismo NMD ya que se localizan en el último exón. En esta región se encuentran la mayoría de las mutaciones asociadas a RP. La proteína que no puede ser degradada produce un efecto negativo sobre el fotorreceptor, dando lugar a la muerte celular. Este tipo de mutación produce adRP. Clase III, mutaciones localizadas entre los residuos 264-499 y 1054-1751. La proteína mutada sufre una pérdida de función y causa RP en individuos homocigotos o dobles heterocigotos para la mutación.

La nueva variante identificada en este estudio está localizada en el residuo 541 (p.Ser241ter) por lo que según la hipótesis anterior pertenece a la clase II. Sin embargo, dicha variante causa RP en una familia consanguínea con patrón de herencia autosómica recesiva, donde los tres individuos afectos son descendientes de la unión de primos terceros que presentan la mutación en homocigosis. Los padres portadores de dicha mutación no están afectados, y no hay antecedentes de la patología en la familia.

La presencia de la nueva variante en homocigosis y la ausencia de RP en los individuos heterocigotos para la mutación ponen en duda la clasificación realizada por Chen *et al*., [2010].
Para poder determinar la implicación de la nueva variante en la RP sería necesario un estudio exhaustivo mediante estudios funcionales y de expresión que nos permitan conocer como esta mutación está afectando a la proteína, a los procesos de NMD, y cómo la célula reacciona ante esta situación.

GEN *SPATA7*

Mutaciones en *SPATA7* han sido descritas como causa tanto de LCA como de arRP de inicio precoz [Wang *et al*., 2009]. Los estudios previos proponen la existencia de una correlación entre la gravedad de las mutaciones en *SPATA7* y el fenotipo clínico, que consiste en que mutaciones que producen un codon prematuro de parada en la última mitad de la proteína dan lugar a un fenotipo LCA, mientras que mutaciones de codón prematuro de parada en el último tercio son responsables de un fenotipo menos agresivo como la RP juvenil [Wang *et al*., 2009; Perrault *et al*., 2010].

Los resultados derivados de este trabajo muestran la presencia de una nueva variante en homocigosis en el gen *SPATA7* en la familia RP-1374. Esta variante produce un codon de parada en el residuo 87 de la proteína. Tras el análisis clínico de las personas afectadas se observa que el caso índice presenta una edad de inicio a los 25 años de edad con una evolución muy rápida. A los 25 años el campo visual era normal mientras que a los 29 años es tubular en ambos ojos. El ERG muestra patrón disminuido a la edad del diagnóstico, estando prácticamente abolido 4 años más tarde. La hermana, quién presenta la nueva variante en homocigosis, no refiere síntomas a los 26 años de edad, sin embargo en el ERG se observa una disminución de los componentes a y b en condiciones fotópicas y escotópicas. Los datos oftalmológicos obtenidos junto con el diagnóstico molecular apuntan a una arRP típica con una progresión rápida de la enfermedad. Un estudio de seguimiento oftalmológico se debería llevar a cabo en los pacientes con el fin de poder observar la evolución de las mismas.

El fenotipo detectado en nuestras pacientes pone en duda la correlación genotipo-fenotipo establecida por los estudios previos [Wang *et al*., 2009; Perrault *et al*., 2010], ya que la nueva variante identificada se encuentra en la primera mitad de la proteína y produce un fenotipo mucho más leve, aunque de progresión rápida, que el asociado a este tipo de mutaciones.

Los resultdos obtenidos podrían se explicados o bien por la existencia de alelos que estuviesen modificando el fenotipo, o bien porque la función de la proteína SPATA7 estuviese siendo suplida por otra u otras proteínas. Por ello, sería necesario llevar a cabo estudios funcionales con el fin de identificar la función de la proteína, aún desconocida, así como el papel patológico de las mutaciones encontradas.

Los hallazgos discutidos en este apartado confirman la importancia tanto del diagnóstico genético como del diagnóstico clínico. En el caso de las familias con mutación en el gen *CERKL,* un exhaustivo estudio oftalmológico puede llevar a un rápido y eficaz diagnóstico genético. Por el contrario, hay familias como la RP-0043 y RP-0285, previamente diagnosticadas como arRP, en las que la detección de mutaciones en un gen no asociado a RP, ha permitido, tras la revisión de los informes oftalmológicos, que se realice una reclasificación clínica. Esta revisión ha evitado que

se establezca una asociación errónea entre los genes *LCA5* y *PCDH21* y RP. Todo ello, recalca la importancia de la integración de los datos clínicos, oftalmológicos y genéticos para el correcto diagnóstico de los pacientes.

CONCLUSIONES

1. El uso de un *microarray* de genotipado específico de arRP, seguido del cribado de los genes candidatos mediante secuenciación automática, permite la caracterización molecular completa del 11% de las familias españolas afectadas de arRP y sRP, así como la identificación de un alelo mutado en un 4,5% adicional de ellas.

2. El bajo número de familias diagnosticadas con esta estrategia de estudio, a diferencia de los datos descritos para otros tipos de DR con la misma técnica en población española, se debe a la mayor heterogeneidad genética de la arRP, así como a la no inclusión de varios genes candidatos.

3. La mayoría de los casos esporádicos (sRP) en población española presentan un patrón autosómico recesivo, como lo demuestra la similitud en el porcentaje y tipo de genes mutados en ambos tipos de familias (sRP *vs* arRP).

4. El porcentaje de homocigosidad en población española es del 66% del total de las familias afectadas.

5. Las familias RP juveniles y típicas son similares en cuanto al porcentaje de casos mutados detectados tras el uso del *microarray* de genotipado. Sin embargo, sus características genéticas son muy diferentes en cuanto al tipo de genes mutados.

6. *RDH12* es el gen con mayor tasa de mutación en familias españolas afectadas de arRP juvenil.

7. Para las familias españolas afectadas de arRP típica, el gen con mayor tasa de mutación es el gen *USH2A*, seguido del gen *CERKL*.

8. En las familias afectadas de arRP juvenil no hay una mutación frecuente.

9. En las familias afectadas de arRP típica la mutación más frecuente es p.Arg257ter en el gen *CERKL*, seguida de la mutación p.Cys759Phe en el gen *USH2A*.

10. Todos los pacientes afectados de RP típica que tienen la mutación p.Arg257ter en el gen *CERKL* en homocigosis, presentan un fenotipo característico y .han heredado la región afectada de un mismo ancestro común.

11. El mapeo de homocigosidad es un abordaje eficaz para la caracterización molecular de familias españolas consanguíneas afectadas de arRP, permitiendo el diagnóstico genético del 55% de las familias estudiadas.

12. Para determinados genes y mutaciones, como en el caso de los genes *CERKL, MERTK, RLBP1 y RPE65,* es posible establecer una correlación genotipo-fenotipo. Por el contrario, para otros genes como *CNGA1*, *PDE6A* y *USH2A* existe una mayor variabilidad clínica.

13. La caracterización molecular de familias españolas diagnosticadas *a priori* de arRP ha permitido modificar el diagnóstico clínico de las familias RP-0043 y RP-0285.

14. Por todo lo anterior, el algoritmo propuesto para la caracterización de los casos familiares y esporádicos en población española afectada de RP juvenil y típica, consiste en la aplicación conjunta de un *microarray* de genotipado específico para arRP y cribado de los genes candidatos como primer abordaje al diagnóstico, seguido de otras estrategias, como el mapeo de homocigosidad.

BIBLIOGRAFÍA

A

Abd El-Aziz, M.M., Barragan, I., O'Driscoll, C., Borrego, S., Abu-Safieh, L., Pieras, J.I., El-Ashry, M.F., Prigmore, E., Carter, N., Antinolo, G. et al. (2008) Large-scale molecular analysis of a 34 Mb interval on chromosome 6q: major refinement of the RP25 interval. *Ann Hum Genet*, 72, 463-77.

Abd El-Aziz, M.M., Barragan, I., O'Driscoll, C.A., Goodstadt, L., Prigmore, E., Borrego, S., Mena, M., Pieras, J.I., El-Ashry, M.F., Safieh, L.A. et al. (2008) EYS, encoding an ortholog of Drosophila spacemaker, is mutated in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 40, 1285-7.

Abd El-Aziz, M.M., O'Driscoll, C.A., Kaye, R.S., Barragan, I., El-Ashry, M.F., Borrego, S., Antinolo, G., Pang, C.P., Webster, A.R. and Bhattacharya, S.S. Identification of novel mutations in the ortholog of Drosophila eyes shut gene (EYS) causing autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 4266-72.

Abu Safieh, L., Aldahmesh, M.A., Shamseldin, H., Hashem, M., Shaheen, R., Alkuraya, H., Al Hazzaa, S.A., Al-Rajhi, A. and Alkuraya, F.S. Clinical and molecular characterisation of Bardet-Biedl syndrome in consanguineous populations: the power of homozygosity mapping. *J Med Genet*, 47, 236-41.

Aguirre-Lamban, J., Riveiro-Alvarez, R., Maia-Lopes, S., Cantalapiedra, D., Vallespin, E., Avila-Fernandez, A., Villaverde-Montero, C., Trujillo-Tiebas, M.J., Ramos, C. and Ayuso, C. (2009) Molecular analysis of the ABCA4 gene for reliable detection of allelic variations in Spanish patients: identification of 21 novel variants. *Br J Ophthalmol*, 93, 614-21.

Aleman, T.S., Soumittra, N., Cideciyan, A.V., Sumaroka, A.M., Ramprasad, V.L., Herrera, W., Windsor, E.A., Schwartz, S.B., Russell, R.C., Roman, A.J. et al. (2009) CERKL mutations cause an autosomal recessive cone-rod dystrophy with inner retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 5944-54.

Aller, E., Najera, C., Millan, J.M., Oltra, J.S., Perez-Garrigues, H., Vilela, C., Navea, A. and Beneyto, M. (2004) Genetic analysis of 2299delG and C759F mutations (USH2A) in patients with visual and/or auditory impairments. *Eur J Hum Genet*, 12, 407-10.

Ardell, M.D., Makhija, A.K., Oliveira, L., Miniou, P., Viegas-Pequignot, E. and Pittler, S.J. (1995) cDNA, gene structure, and chromosomal localization of human GAR1 (CNCG3L), a homolog of the third subunit of bovine photoreceptor cGMP-gated channel. *Genomics*, 28, 32-8.

Audo, I., Sahel, J.A., Mohand-Said, S., Lancelot, M.E., Antonio, A., Moskova-Doumanova, V., Nandrot, E.F., Doumanov, J., Barragan, I., Antinolo, G. et al. EYS is a major gene for rod-cone dystrophies in France. *Hum Mutat*, 31, E1406-35.

Auslender, N., Sharon, D., Abbasi, A.H., Garzozi, H.J., Banin, E. and Ben-Yosef, T. (2007) A common founder mutation of CERKL underlies autosomal recessive retinal degeneration with early macular involvement among Yemenite Jews. Invest Ophthalmol Vis Sci, 48, 5431-8.

Ayuso, C. and Millan, J.M. (2010) Retinitis pigmentosa and allied conditions today: a paradigm of translational research. *Genome Med*, 2, 34.

Avila-Fernandez A., Riveiro-Alvarez R., Vallespin E., Wilke R., Tapias I., Cantalapiedra D., Aguirre-Lamban J., Gimenez A., Trujillo-Tiebas MJ., Ayuso C. CERKL mutations and associated phenotypes in seven Spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Jun;49(6):2709-13.

Ayuso, C., Garcia-Sandoval, B., Najera, C., Valverde, D., Carballo, M. and Antinolo, G. (1995) Retinitis pigmentosa in Spain. The Spanish Multicentric and Multidisciplinary Group for Research into Retinitis Pigmentosa. *Clin Genet*, 48, 120-2.

B

Bainbridge, J.W., Smith, A.J., Barker, S.S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., Viswanathan, A., Holder, G.E., Stockman, A., Tyler, N. et al. (2008) Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*, 358, 2231-9.

Bandah-Rozenfeld, D., Littink, K.W., Ben-Yosef, T., Strom, T.M., Chowers, I., Collin, R.W., den Hollander, A.I., van den Born, I., Zonneveld, M.N., Merin, S. et al. Novel null mutations in the EYS gene are a frequent cause of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Israeli population. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*

Bandah-Rozenfeld, D., Mizrahi-Meissonnier, L., Farhy, C., Obolensky, A., Chowers, I., Pe'er, J., Merin, S., Ben-Yosef, T., Ashery-Padan, R., Banin, E. et al. Homozygosity mapping reveals null mutations in FAM161A as a cause of autosomal-recessive retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet*, 87, 382-91.

Bareil, C., Hamel, C.P., Delague, V., Arnaud, B., Demaille, J. and 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, 328-34.

Barragan, I., Borrego, S., Pieras, J.I., Gonzalez-del Pozo, M., Santoyo, J., Ayuso, C., Baiget, M., Millan, J.M., Mena, M., Abd El-Aziz, M.M. et al. Mutation spectrum of EYS in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Mutat*, 31, E1772-800.

Barragan, I., Marcos, I., Borrego, S. and Antinolo, G. (2005) Mutation screening of three candidate genes, ELOVL5, SMAP1 and GLULD1 in autosomal recessive retinitis pigmentosa. Int *J Mol Med*, 16, 1163-7.

Bayes, M., Giordano, M., Balcells, S., Grinberg, D., Vilageliu, L., Martinez, I., Ayuso, C., Benitez, J., Ramos-Arroyo, M.A., Chivelet, P. et al. (1995) Homozygous tandem duplication within the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase as a cause for autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Mutat*, 5, 228-34.

Beavo, J.A. (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev*, 75, 725-48.

Becirovic, E., Nakova, K., Hammelmann, V., Hennel, R., Biel, M. and Michalakis, S. The retinitis pigmentosa mutation c.3444+1G>A in CNGB1 results in skipping of exon 32. *PLoS One*, 5, e8969.

Berger, W., Kloeckener-Gruissem, B. and Neidhardt, J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res*, 29, 335-75.

Bernal, S., Ayuso, C., Antinolo, G., Gimenez, A., Borrego, S., Trujillo, M.J., Marcos, I., Calaf, M., Del Rio, E. and Baiget, M. (2003) Mutations in USH2A in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa: high prevalence and phenotypic variation. J Med Genet, 40, e8.

Bernal, S., Meda, C., Solans, T., Ayuso, C., Garcia-Sandoval, B., Valverde, D., Del Rio, E. and Baiget, M. (2005) Clinical and genetic studies in Spanish patients with Usher syndrome type II: description of new mutations and evidence for a lack of genotype--phenotype correlation. *Clin Genet*, 68, 204-14.

Bernal, S., Solans, T., Gamundi, M.J., Hernan, I., de Jorge, L., Carballo, M., Navarro, R., Tizzano, E., Ayuso, C. and Baiget, M. (2008) Analysis of the involvement of the NR2E3 gene in autosomal recessive retinal dystrophies. *Clin Genet*, 73, 360-6.

Berson, E.L., Rosner, B., Sandberg, M.A., Hayes, K.C., Nicholson, B.W., Weigel-DiFrano, C. and Willett, W. (1993) Vitamin A supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*, 111, 1456-9.

Bhattacharya, G., Miller, C., Kimberling, W.J., Jablonski, M.M. and 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.

Bornancin, F., Mechtcheriakova, D., Stora, S., Graf, C., Wlachos, A., Devay, P., Urtz, N., Baumruker, T. and Billich, A. (2005) Characterization of a ceramide kinase-like protein. *Biochim Biophys Acta*, 1687, 31-43.

Bramall, A.N., Wright, A.F., Jacobson, S.G. and McInnes, R.R. The genomic, biochemical, and cellular responses of the retina in inherited photoreceptor degenerations and prospects for the treatment of these disorders. *Annu Rev Neurosci*, 33, 441-72.

Broman, K.W. and Weber, J.L. (1999) Long homozygous chromosomal segments in reference families from the centre d'Etude du polymorphisme humain. Am J Hum Genet, 65, 1493-500.

Bunt-Milam, A.H., Kalina, R.E. and Pagon, R.A. (1983) Clinical-ultrastructural study of a retinal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 24, 458-69.

Burns, M.E. and Baylor, D.A. (2001) Activation, deactivation, and adaptation in vertebrate photoreceptor cells. *Annu Rev Neurosci*, 24, 779-805.

Burstedt, M.S., Sandgren, O., Holmgren, G. and 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.

Busskamp, V., Duebel, J., Balya, D., Fradot, M., Viney, T.J., Siegert, S., Groner, A.C., Cabuy, E., Forster, V., Seeliger, M. et al. Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science*, 329, 413-7.

C

Caberoy, N.B., Zhou, Y. and Li, W. Tubby and tubby-like protein 1 are new MerTK ligands for phagocytosis. *Embo J*, 29, 3898-910.

Calabrese, G., Sallese, M., Stornaiuolo, A., Stuppia, L., Palka, G. and De Blasi, A. (1994) Chromosome mapping of the human arrestin (SAG), beta-arrestin 2 (ARRB2), and beta-adrenergic receptor kinase 2 (ADRBK2) genes. *Genomics*, 23, 286-8.

Carothers, A.D., Rudan, I., Kolcic, I., Polasek, O., Hayward, C., Wright, A.F., Campbell, H., Teague, P., Hastie, N.D. and Weber, J.L. (2006) Estimating human

inbreeding coefficients: comparison of genealogical and marker heterozygosity approaches. *Ann Hum Genet*, 70, 666-76.

Chen, L.J., Lai, T.Y., Tam, P.O., Chiang, S.W., Zhang, X., Lam, S., Lai, R.Y., Lam, D.S. and Pang, C.P. Compound heterozygosity of two novel truncation mutations in RP1 causing autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 2236-42.

Chen, X.N., Korenberg, J.R., Jiang, M., Shen, D. and Fong, H.K. (1996) Localization of the human RGR opsin gene to chromosome 10q23. *Hum Genet*, 97, 720-2.

Cheng, H., Khanna, H., Oh, E.C., Hicks, D., Mitton, K.P. and Swaroop, A. (2004) Photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 functions as a transcriptional activator in rod photoreceptors. *Hum Mol Genet*, 13, 1563-75.

Cideciyan, A.V. (2010) Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. *Prog Retin Eye Res*, 29, 398-427.

Cideciyan, A.V., Aleman, T.S., Boye, S.L., Schwartz, S.B., Kaushal, S., Roman, A.J., Pang, J.J., Sumaroka, A., Windsor, E.A., Wilson, J.M. et al. (2008) Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 15112-7.

Collin, R.W., Littink, K.W., Klevering, B.J., van den Born, L.I., Koenekoop, R.K., Zonneveld, M.N., Blokland, E.A., Strom, T.M., Hoyng, C.B., den Hollander, A.I. et al. (2008) Identification of a 2 Mb human ortholog of Drosophila eyes shut/spacemaker that is mutated in patients with retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet*, 83, 594-603.

Collin RW., van den Born LI., Klevering BJ., de Castro-Miró M., Littink KW., Arimadyo K., Azam M., Yazar V., Zonneveld MN., Paun CC., Siemiatkowska AM., Strom TM., Hehir-Kwa JY., Kroes HY., de Faber JT., van Schooneveld M., Heckenlively JR., Hoyng CB., den Hollander AI., Cremers FP. High-resolution homozygosity mapping is a powerful tool to detect novel mutations causative for autosomal recessive RP in the Dutch population. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Jan 7.

Coppieters, F., Leroy, B.P., Beysen, D., Hellemans, J., De Bosscher, K., Haegeman, G., Robberecht, K., Wuyts, W., Coucke, P.J. and De Baere, 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, 147-57.

Corton, M., Blanco, M.J., Torres, M., Sanchez-Salorio, M., Carracedo, A. and Brion, M. (2010) Identification of a novel mutation in the human PDE6A gene in autosomal recessive retinitis pigmentosa: homology with the nmf28/nmf28 mice model. *Clin Genet*, 78, 495-8.

Cote, R.H. (2004) Characteristics of photoreceptor PDE (PDE6): similarities and differences to PDE5. *Int J Impot Res*, 16 *Suppl* 1, S28-33.

Crabb, J.W., Carlson, A., Chen, Y., Goldflam, S., Intres, R., West, K.A., Hulmes, J.D., Kapron, J.T., Luck, L.A., Horwitz, J. et al. (1998) Structural and functional characterization of recombinant human cellular retinaldehyde-binding protein. *Protein Sci*, 7, 746-57.

Cremers, F.P., Kimberling, W.J., Kulm, M., de Brouwer, A.P., van Wijk, E., te Brinke, H., Cremers, C.W., Hoefsloot, L.H., Banfi, S., Simonelli, F. et al. (2007) Development of a genotyping microarray for Usher syndrome. *J Med Genet*, 44, 153-60.

D

Daiger, S.P., Bowne, S.J. and Sullivan, L.S. (2007) Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*, 125, 151-8.

Daiger, S.P., Sullivan, L.S., Bowne, S.J., Birch, D.G., Heckenlively, J.R., Pierce, E.A. and Weinstock, G.M. Targeted high-throughput DNA sequencing for gene discovery in retinitis pigmentosa. *Adv Exp Med Biol*, 664, 325-31.

D'Cruz, P.M., Yasumura, D., Weir, J., Matthes, M.T., Abderrahim, H., LaVail, M.M. and Vollrath, D. (2000) Mutation of the receptor tyrosine kinase gene Mertk in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Genet*, 9, 645-51.

Delyfer, M.N., Leveillard, T., Mohand-Said, S., Hicks, D., Picaud, S. and Sahel, J.A. (2004) Inherited retinal degenerations: therapeutic prospects. *Biol Cell*, 96, 261-9.

Demirci, F.Y., Rigatti, B.W., Mah, T.S. and Gorin, M.B. (2004) A novel compound heterozygous mutation in the cellular retinaldehyde-binding protein gene (RLBP1) in a patient with retinitis punctata albescens. *Am J Ophthalmol*, 138, 171-3.

Den Hollander, A.I., Black, A., Bennett, J. and Cremers, F.P. Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. *J Clin Invest*, 120, 3042-53.

Den Hollander, A.I., Davis, J., van der Velde-Visser, S.D., Zonneveld, M.N., Pierrottet, C.O., Koenekoop, R.K., Kellner, U., van den Born, L.I., Heckenlively, J.R., Hoyng, C.B. et al. (2004) CRB1 mutation spectrum in inherited retinal dystrophies. *Hum Mutat*, 24, 355-69.

Den Hollander, A.I., Heckenlively, J.R., van den Born, L.I., de Kok, Y.J., van der Velde-Visser, S.D., Kellner, U., Jurklies, B., van Schooneveld, M.J., Blankenagel, A., Rohrschneider, K. et al. (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.

Den Hollander, A.I., Koenekoop, R.K., Mohamed, M.D., Arts, H.H., Boldt, K., Towns, K.V., Sedmak, T., Beer, M., Nagel-Wolfrum, K., McKibbin, M. et al. (2007) Mutations in LCA5, encoding the ciliary protein lebercilin, cause Leber congenital amaurosis. *Nat Genet*, 39, 889-95.

Den Hollander, A.I., Koenekoop, R.K., Yzer, S., Lopez, I., Arends, M.L., Voesenek, K.E., Zonneveld, M.N., Strom, T.M., Meitinger, T., Brunner, H.G. et al. (2006) Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet*, 79, 556-61.

Den Hollander, A.I., Lopez, I., Yzer, S., Zonneveld, M.N., Janssen, I.M., Strom, T.M., Hehir-Kwa, J.Y., Veltman, J.A., Arends, M.L., Meitinger, T. et al. (2007) Identification

of novel mutations in patients with Leber congenital amaurosis and juvenile RP by genome-wide homozygosity mapping with SNP microarrays. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 5690-8.

Den Hollander, A.I., ten Brink, J.B., de Kok, Y.J., van Soest, S., van den Born, L.I., van Driel, M.A., van de Pol, D.J., Payne, A.M., Bhattacharya, S.S., Kellner, U. et al. (1999) Mutations in a human homologue of Drosophila crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat Genet*, 23, 217-21.

Dhallan, R.S., Macke, J.P., Eddy, R.L., Shows, T.B., Reed, R.R., Yau, K.W. and Nathans, J. (1992) Human rod photoreceptor cGMP-gated channel: amino acid sequence, gene structure, and functional expression. *J Neurosci*, 12, 3248-56.

Dryja, T.P., Finn, J.T., Peng, Y.W., McGee, T.L., Berson, E.L. and 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 U S A*, 92, 10177-81.

Dryja, T.P., McGee, T.L., Hahn, L.B., Cowley, G.S., Olsson, J.E., Reichel, E., Sandberg, M.A. and Berson, E.L. (1990) Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *N Engl J Med*, 323, 1302-7.

Durbin RM., Abecasis GR., Altshuler DL., Auton A., Brooks LD., Durbin RM., Gibbs RA., Hurles ME., McVean GA. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010 Oct 28;467(7319):1061-73.

E

Eichers, E.R., Green, J.S., Stockton, D.W., Jackman, C.S., Whelan, J., McNamara, J.A., Johnson, G.J., Lupski, J.R. and Katsanis, N. (2002) Newfoundland rod-cone dystrophy, an early-onset retinal dystrophy, is caused by splice-junction mutations in RLBP1. *Am J Hum Genet*, 70, 955-64.

Ernest, P.J., Boon, C.J., Klevering, B.J., Hoefsloot, L.H. and Hoyng, C.B. (2009) Outcome of ABCA4 microarray screening in routine clinical practice. *Mol Vis*, 15, 2841-7.

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. et al. (1998) Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa. *Science*, 280, 1753-7.

F

Fingert, J.H., Oh, K., Chung, M., Scheetz, T.E., Andorf, J.L., Johnson, R.M., Sheffield, V.C. and Stone, E.M. (2008) Association of a novel mutation in the retinol dehydrogenase 12 (RDH12) gene with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*, 126, 1301-7.

Fishman, G.A., Roberts, M.F., Derlacki, D.J., Grimsby, J.L., Yamamoto, H., Sharon, D., Nishiguchi, K.M. and 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, 70-5.

Frischmeyer, P.A. and Dietz, H.C. (1999) Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet*, 8, 1893-900.

Fuchs, S., Nakazawa, M., Maw, M., Tamai, M., Oguchi, Y. and 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, 360-2.

G

Gal, A., Li, Y., Thompson, D.A., Weir, J., Orth, U., Jacobson, S.G., Apfelstedt-Sylla, E. and Vollrath, D. (2000) Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 26, 270-1.

Gal, A., Orth, U., Baehr, W., Schwinger, E. and Rosenberg, T. (1994) Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in autosomal dominant stationary night blindness. *Nat Genet*, 7, 64-8.

Gao, J., Cheon, K., Nusinowitz, S., Liu, Q., Bei, D., Atkins, K., Azimi, A., Daiger, S.P., Farber, D.B., Heckenlively, J.R. et al. (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 U S A*, 99, 5698-703.

Georgiadis, A., Tschernutter, M., Bainbridge, J.W., Robbie, S.J., McIntosh, J., Nathwani, A.C., Smith, A.J. and Ali, R.R. AAV-mediated knockdown of peripherin-2 in vivo using miRNA-based hairpins. *Gene Ther*, 17, 486-93.

Gibson, J., Morton, N.E. and Collins, A. (2006) Extended tracts of homozygosity in outbred human populations. *Hum Mol Genet*, 15, 789-95.

Graham, D.K., Dawson, T.L., Mullaney, D.L., Snodgrass, H.R. and Earp, H.S. (1994) Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth Differ*, 5, 647-57.

Grossman, G.H., Pauer, G.J., Narendra, U. and Hagstrom, S.A. Tubby-like protein 1 (tulp1) is required for normal photoreceptor synaptic development. *Adv Exp Med Biol*, 664, 89-96.

Grunwald, M.E., Yu, W.P., Yu, H.H. and Yau, K.W. (1998) Identification of a domain on the beta-subunit of the rod cGMP-gated cation channel that mediates inhibition by calcium-calmodulin. *J Biol Chem*, 273, 9148-57.

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. et al. (1997) Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet*, 17, 194-7.

H

Haeseleer, F., Jang, G.F., Imanishi, Y., Driessen, C.A., Matsumura, M., Nelson, P.S. and Palczewski, K. (2002) Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina. *J Biol Chem*, 277, 45537-46.

Hagstrom, S.A., North, M.A., Nishina, P.L., Berson, E.L. and Dryja, T.P. (1998) Recessive mutations in the gene encoding the tubby-like protein TULP1 in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 18, 174-6.

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. et al. (2000) Mutation of a nuclear receptor gene, NR2E3, causes enhanced S cone syndrome, a disorder of retinal cell fate. *Nat Genet*, 24, 127-31.

Hamel, C. (2006) Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis*, 1, 40.

Hamel, C.P., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G. and Redmond, T.M. (1994) The gene for the retinal pigment epithelium-specific protein RPE65 is localized to human 1p31 and mouse 3. *Genomics*, 20, 509-12.

Hamel, C.P., Tsilou, E., Pfeffer, B.A., Hooks, J.J., Detrick, B. and 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, 15751-7.

Hamm, H.E. (2001) How activated receptors couple to G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 4819-21.

Hartong, D.T., Berson, E.L. and Dryja, T.P. (2006) Retinitis pigmentosa. *Lancet*, 368, 1795-809.

Henderson RH., Mackay DS., Li Z., Moradi P., Sergouniotis P., Russell-Eggitt I., Thompson DA., Robson AG., Holder GE., Webster AR., Moore AT. Phenotypic

variability in patients with retinal dystrophies due to mutations in CRB1. *Br J Ophthalmol*.2010 Oct 17.

Henderson, R.H., Waseem, N., Searle, R., van der Spuy, J., Russell-Eggitt, I., Bhattacharya, S.S., Thompson, D.A., Holder, G.E., Cheetham, M.E., Webster, A.R. et al. (2007) An assessment of the apex microarray technology in genotyping patients with Leber congenital amaurosis and early-onset severe retinal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 5684-9.

Hessel, E., Muller, P., Herrmann, A. and Hofmann, K.P. (2001) Light-induced reorganization of phospholipids in rod disc membranes. *J Biol Chem*, 276, 2538-43.

Hildebrandt, F., Heeringa, S.F., Ruschendorf, F., Attanasio, M., Nurnberg, G., Becker, C., Seelow, D., Huebner, N., Chernin, G., Vlangos, C.N. et al. (2009) A systematic approach to mapping recessive disease genes in individuals from outbred populations. *PLoS Genet*, 5, e1000353.

Hmani-Aifa, M., Benzina, Z., Zulfiqar, F., Dhouib, H., Shahzadi, A., Ghorbel, A., Rebai, A., Soderkvist, P., Riazuddin, S., Kimberling, W.J. et al. (2009) Identification of two new mutations in the GPR98 and the PDE6B genes segregating in a Tunisian family. *Eur J Hum Genet*, 17, 474-82.

Huang, D., Eudy, J.D., Uzvolgyi, E., Davis, J.R., Talmadge, C.B., Pretto, D., Weston, M.D., Lehman, J.E., Zhou, M., Seemayer, T.A. et al. (2002) Identification of the mouse and rat orthologs of the gene mutated in Usher syndrome type IIA and the cellular source of USH2A mRNA in retina, a target tissue of the disease. *Genomics*, 80, 195-203.

Huang, S.H., Pittler, S.J., Huang, X., Oliveira, L., Berson, E.L. and Dryja, T.P. (1995) Autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the alpha subunit of rod cGMP phosphodiesterase. *Nat Genet*, 11, 468-71.

Huang, Y., Zhang, J., Li, C., Yang, G., Liu, M., Wang, Q.K. and Tang, Z. Identification of a novel homozygous nonsense mutation in EYS in a Chinese family with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *BMC Med Genet*, 11, 121.

Inagaki, Y., Mitsutake, S. and 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, 982-7.

Intres, R., Goldflam, S., Cook, J.R. and Crabb, J.W. (1994) Molecular cloning and structural analysis of the human gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein. *J Biol Chem*, 269, 25411-8.

Jaakson, K., Zernant, J., Kulm, M., Hutchinson, A., Tonisson, N., Glavac, D., Ravnik-Glavac, M., Hawlina, M., Meltzer, M.R., Caruso, R.C. et al. (2003) Genotyping microarray (gene chip) for the ABCR (ABCA4) gene. *Hum Mutat*, 22, 395-403.

Jacobson, S.G. and Cideciyan, A.V. Treatment possibilities for retinitis pigmentosa. *N Engl J Med*, 363, 1669-71.

Jaijo, T., Aller, E., Garcia-Garcia, G., Aparisi, M.J., Bernal, S., Avila-Fernandez, A., Barragan, I., Baiget, M., Ayuso, C., Antinolo, G. et al. (2009) Microarray-Based Mutation Analysis of 183 Spanish Families Suffering from Usher Syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.

Janecke, A.R., Thompson, D.A., Utermann, G., Becker, C., Hubner, C.A., Schmid, E., McHenry, C.L., Nair, A.R., Ruschendorf, F., Heckenlively, J. et al. (2004) Mutations in RDH12 encoding a photoreceptor cell retinol dehydrogenase cause childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet*, 36, 850-4.

Jiang, M., Pandey, S. and Fong, H.K. (1993) An opsin homologue in the retina and pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34, 3669-78.

Joensuu, T., Hamalainen, R., Yuan, B., Johnson, C., Tegelberg, S., Gasparini, P., Zelante, L., Pirvola, U., Pakarinen, L., Lehesjoki, A.E. et al. (2001) Mutations in a

novel gene with transmembrane domains underlie Usher syndrome type 3. *Am J Hum Genet*, 69, 673-84.

K

Kajiwara, K., Berson, E.L. and Dryja, T.P. (1994) Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science*, 264, 1604-8.

Kantardzhieva, A., Gosens, I., Alexeeva, S., Punte, I.M., Versteeg, I., Krieger, E., Neefjes-Mol, C.A., den Hollander, A.I., Letteboer, S.J., Klooster, J. et al. (2005) MPP5 recruits MPP4 to the CRB1 complex in photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 2192-201.

Kaupp, U.B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bonigk, W., Stuhmer, W., Cook, N.J., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T. et al. (1989) Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature*, 342, 762-6.

Khaliq, S., Abid, A., Ismail, M., Hameed, A., Mohyuddin, A., Lall, P., Aziz, A., Anwar, K. and Mehdi, S.Q. (2005) Novel association of RP1 gene mutations with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *J Med Genet*, 42, 436-8.

Khaliq, S., Hameed, A., Ismail, M., Mehdi, S.Q., Bessant, D.A., Payne, A.M. and 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, 571-4.

Khanna H., Davis EE., Murga-Zamalloa CA., Estrada-Cuzcano A., Lopez I., den Hollander AI., Zonneveld MN., Othman MI., Waseem N., Chakarova CF., Maubaret C., Diaz-Font A., MacDonald I., Muzny DM., Wheeler DA., Morgan M., Lewis LR., Logan CV., Tan PL., Beer MA., Inglehearn CF., Lewis RA., Jacobson SG., Bergmann C., Beales PL., Attié-Bitach T., Johnson CA., Otto EA., Bhattacharya SS., Hildebrandt F., Gibbs RA., Koenekoop RK., Swaroop A., Katsanis N. A common allele in

RPGRIP1L is a modifier of retinal degeneration in ciliopathies. *Nat Genet*. 2009 Jun;41(6):739-45.

Khramtsov, N.V., Feshchenko, E.A., Suslova, V.A., Shmukler, B.E., Terpugov, B.E., Rakitina, T.V., Atabekova, N.V. and Lipkin, V.M. (1993) The human rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase beta-subunit. Structural studies of its cDNA and gene. *FEBS Lett*, 327, 275-8.

Klevering, B.J., Yzer, S., Rohrschneider, K., Zonneveld, M., Allikmets, R., van den Born, L.I., Maugeri, A., Hoyng, C.B. and Cremers, F.P. (2004) Microarray-based mutation analysis of the ABCA4 (ABCR) gene in autosomal recessive cone-rod dystrophy and retinitis pigmentosa. *Eur J Hum Genet*, 12, 1024-32.

Kobayashi, M., Takezawa, S., Hara, K., Yu, R.T., Umesono, Y., Agata, K., Taniwaki, M., Yasuda, K. and Umesono, K. (1999) Identification of a photoreceptor cell-specific nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 4814-9.

Kondo, H., Qin, M., Mizota, A., Kondo, M., Hayashi, H., Hayashi, K., Oshima, K. and Tahira, T. (2004) A homozygosity-based search for mutations in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa, using microsatellite markers. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45, 4433-9.

Krone, N., Braun, A., Roscher, A.A., Knorr, D. and Schwarz, H.P. (2000) Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 1059-65.

L

Lander, E.S. and Botstein, D. (1987) Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science*, 236, 1567-70.

Li, T., Sandberg, M.A., Pawlyk, B.S., Rosner, B., Hayes, K.C., Dryja, T.P. and Berson, E.L. (1998) Effect of vitamin A supplementation on rhodopsin mutants threonine-17 -->

methionine and proline-347 --> serine in transgenic mice and in cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11933-8.

Littink, K.W., Koenekoop, R.K., van den Born, L.I., Collin, R.W., Moruz, L., Veltman, J.A., Roosing, S., Zonneveld, M.N., Omar, A., Darvish, M. et al. Homozygosity mapping in patients with cone-rod dystrophy: novel mutations and clinical characterizations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.

Littink, K.W., van den Born, L.I., Koenekoop, R.K., Collin, R.W., Zonneveld, M.N., Blokland, E.A., Khan, H., Theelen, T., Hoyng, C.B., Cremers, F.P. et al. Mutations in the EYSGene Account for Approximately 5% of Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa and Cause a Fairly Homogeneous Phenotype. *Ophthalmology*.

Liu, Q., Zhou, J., Daiger, S.P., Farber, D.B., Heckenlively, J.R., Smith, J.E., Sullivan, L.S., Zuo, J., Milam, A.H. and Pierce, E.A. (2002) Identification and subcellular localization of the RP1 protein in human and mouse photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 22-32.

Liu, Q., Zuo, J. and Pierce, E.A. (2004) The retinitis pigmentosa 1 protein is a photoreceptor microtubule-associated protein. *J Neurosci*, 24, 6427-36.

Liu, X.Z., Hope, C., Liang, C.Y., Zou, J.M., Xu, L.R., Cole, T., Mueller, R.F., Bundey, S., Nance, W., Steel, K.P. et al. (1999) A mutation (2314delG) in the Usher syndrome type IIA gene: high prevalence and phenotypic variation. *Am J Hum Genet*, 64, 1221-5.

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. et al. (2001) Mutations in the CRB1 gene cause Leber congenital amaurosis. *Arch Ophthalmol*, 119, 415-20.

Louie, C.M., Caridi, G., Lopes, V.S., Brancati, F., Kispert, A., Lancaster, M.A., Schlossman, A.M., Otto, E.A., Leitges, M., Grone, H.J. et al. AHI1 is required for photoreceptor outer segment development and is a modifier for retinal degeneration in nephronophthisis. *Nat Genet*, 42, 175-80.

M

MacDonald, I.M., Sauve, Y. and Sieving, P.A. (2007) Preventing blindness in retinal disease: ciliary neurotrophic factor intraocular implants. *Can J Ophthalmol*, 42, 399-402.

Mackay, D.S., Henderson, R.H., Sergouniotis, P.I., Li, Z., Moradi, P., Holder, G.E., Waseem, N., Bhattacharya, S.S., Aldahmesh, M.A., Alkuraya, F.S. et al. Novel mutations in MERTK associated with childhood onset rod-cone dystrophy. *Mol Vis*, 16, 369-77.

Maerker, T., van Wijk, E., Overlack, N., Kersten, F.F., McGee, J., Goldmann, T., Sehn, E., Roepman, R., Walsh, E.J., Kremer, H. et al. (2008) A novel Usher protein network at the periciliary reloading point between molecular transport machineries in vertebrate photoreceptor cells. *Hum Mol Genet*, 17, 71-86.

Maia-Lopes, S., Aguirre-Lamban, J., Castelo-Branco, M., Riveiro-Alvarez, R., Ayuso, C. and Silva, E.D. (2009) ABCA4 mutations in Portuguese Stargardt patients: identification of new mutations and their phenotypic analysis. *Mol Vis*, 15, 584-91.

Makino, E.R., Handy, J.W., Li, T. and Arshavsky, V.Y. (1999) The GTPase activating factor for transducin in rod photoreceptors is the complex between RGS9 and type 5 G protein beta subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 1947-52.

Mandal, M.N., Heckenlively, J.R., Burch, T., Chen, L., Vasireddy, V., Koenekoop, R.K., Sieving, P.A. and Ayyagari, R. (2005) Sequencing arrays for screening multiple genes associated with early-onset human retinal degenerations on a high-throughput platform. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 3355-62.

Marcos, I., Ruiz, A., Borrego, S., Ayuso, C., Baiget, M. and Antinolo, G. (2001) [Molecular analysis of the RPE65 gene in 72 Spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa]. *Med Clin (Barc)*, 117, 121-3.

Marlhens, F., Bareil, C., Griffoin, J.M., Zrenner, E., Amalric, P., Eliaou, C., Liu, S.Y., Harris, E., Redmond, T.M., Arnaud, B. et al. (1997) Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet*, 17, 139-41.

Maw, M.A., Kennedy, B., Knight, A., Bridges, R., Roth, K.E., Mani, E.J., Mukkadan, J.K., Nancarrow, D., Crabb, J.W. and Denton, M.J. (1997) Mutation of the gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 17, 198-200.

Maxam AM., Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci* USA. 1977 Feb;74(2):560-4.

McGee, T.L., Seyedahmadi, B.J., Sweeney, M.O., Dryja, T.P. and Berson, E.L. Novel mutations in the long isoform of the USH2A gene in patients with Usher syndrome type II or non-syndromic retinitis pigmentosa. *J Med Genet*, 47, 499-506.

McHenry, C.L., Liu, Y., Feng, W., Nair, A.R., Feathers, K.L., Ding, X., Gal, A., Vollrath, D., Sieving, P.A. and 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, 1456-63.

McKay, G.J., Clarke, S., Davis, J.A., Simpson, D.A. and Silvestri, G. (2005) Pigmented paravenous chorioretinal atrophy is associated with a mutation within the crumbs homolog 1 (CRB1) gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 322-8.

McLaughlin, M.E., Ehrhart, T.L., Berson, E.L. and 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 U S A*, 92, 3249-53.

McLaughlin, M.E., Sandberg, M.A., Berson, E.L. and Dryja, T.P. (1993) Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 4, 130-4.

McQuillan, R., Leutenegger, A.L., Abdel-Rahman, R., Franklin, C.S., Pericic, M., Barac-Lauc, L., Smolej-Narancic, N., Janicijevic, B., Polasek, O., Tenesa, A. et al. (2008) Runs of homozygosity in European populations. *Am J Hum Genet*, 83, 359-72.

Mendes, H.F. and Cheetham, M.E. (2008) Pharmacological manipulation of gain-of-function and dominant-negative mechanisms in rhodopsin retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet*, 17, 3043-54.

Millan, J.M., Aller, E., Jaijo, T., Blanco-Kelly, F., Gimenez-Pardo, A. and Ayuso, C. An update on the genetics of usher syndrome. *J Ophthalmol*, 2011, 417217.

Moiseyev, G., Chen, Y., Takahashi, Y., Wu, B.X. and Ma, J.X. (2005) RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. Proc Natl Acad Sci U S A, 102, 12413-8.

Mooney, I. and LaMotte, J. (2008) A review of the potential to restore vision with stem cells. *Clin Exp Optom*, 91, 78-84.

Morimura, H., Berson, E.L. and Dryja, T.P. (1999) Recessive mutations in the RLBP1 gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in a form of retinitis punctata albescens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40, 1000-4.

Morimura, H., Saindelle-Ribeaudeau, F., Berson, E.L. and Dryja, T.P. (1999) Mutations in RGR, encoding a light-sensitive opsin homologue, in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 23, 393-4.

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring HarbSymp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-73.

N

Nakamura, M., Lin, J., Ito, Y. and Miyake, Y. (2005) Novel mutation in RLBP1 gene in a Japanese patient with retinitis punctata albescens. *Am J Ophthalmol*, 139, 1133-5.

Nakazawa, M., Wada, Y. and Tamai, M. (1998) Arrestin gene mutations in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*, 116, 498-501.

Nathans, J. (1992) Rhodopsin: structure, function, and genetics. Biochemistry, 31, 4923-31.

Ngo, J.T., Klisak, I., Sparkes, R.S., Mohandas, T., Yamaki, K., Shinohara, T. and Bateman, J.B. (1990) Assignment of the S-antigen gene (SAG) to human chromosome 2q24-q37. *Genomics*, 7, 84-7.

Nicoletti, A., Wong, D.J., Kawase, K., Gibson, L.H., Yang-Feng, T.L., Richards, J.E. and Thompson, D.A. (1995) Molecular characterization of the human gene encoding an abundant 61 kDa protein specific to the retinal pigment epithelium. *Hum Mol Genet*, 4, 641-9.

North, M.A., Naggert, J.K., Yan, Y., Noben-Trauth, K. and 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 U S A*, 94, 3128-33.

O

Ostergaard, E., Batbayli, M., Duno, M., Vilhelmsen, K. and Rosenberg, T. Mutations in PCDH21 cause autosomal recessive cone-rod dystrophy. *J Med Genet*, 47, 665-9.

Otterstedde, C.R., Spandau, U., Blankenagel, A., Kimberling, W.J. and Reisser, C. (2001) A new clinical classification for Usher's syndrome based on a new subtype of Usher's syndrome type I. *Laryngoscope*, 111, 84-6.

Ovchinnikov Iu, A., Gubanov, V.V., Khramtsov, N.V., Akhmedov, N.B. and Ishchenko, K.A. (1987) [Cyclic GMP phosphodiesterase from the bovine retina. Amino acid sequence of the alpha-subunit and nucleotide sequence of corresponding cDNA]. *Dokl Akad Nauk SSSR*, 296, 487-91.

P

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E. et al. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, 289, 739-45.

Paloma, E., Martinez-Mir, A., Garcia-Sandoval, B., Ayuso, C., Vilageliu, L., Gonzalez-Duarte, R. and Balcells, S. (2002) 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.

Pellikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C.J., Ready, D.F. and Tepass, U. (2002) Crumbs, the Drosophila homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature*, 416, 143-9.

Peng, G.H., Ahmad, O., Ahmad, F., Liu, J. and Chen, S. (2005) The photoreceptor-specific nuclear receptor Nr2e3 interacts with Crx and exerts opposing effects on the transcription of rod versus cone genes. *Hum Mol Genet*, 14, 747-64.

Pennings, R.J., Huygen, P.L. and Cremers, W.R. (2003) Hearing impairment in Usher syndrome type II. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 112, 825.

Perrault, I., Delphin, N., Hanein, S., Gerber, S., Dufier, J.L., Roche, O., Defoort-Dhellemmes, S., Dollfus, H., Fazzi, E., Munnich, A. et al. (2007) Spectrum of NPHP6/CEP290 mutations in Leber congenital amaurosis and delineation of the associated phenotype. *Hum Mutat*, 28, 416.

Perrault, I., Hanein, S., Gerard, X., Delphin, N., Fares-Taie, L., Gerber, S., Pelletier, V., Merce, E., Dollfus, H., Puech, B. et al. Spectrum of SPATA7 mutations in Leber congenital amaurosis and delineation of the associated phenotype. *Hum Mutat*, 31, E1241-50.

Pierce, E.A., Quinn, T., Meehan, T., McGee, T.L., Berson, E.L. and Dryja, T.P. (1999) Mutations in a gene encoding a new oxygen-regulated photoreceptor protein cause dominant retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 22, 248-54.

Piriev, N.I., Viczian, A.S., Ye, J., Kerner, B., Korenberg, J.R. and Farber, D.B. (1995) Gene structure and amino acid sequence of the human cone photoreceptor cGMP-phosphodiesterase alpha' subunit (PDEA2) and its chromosomal localization to 10q24. *Genomics*, 28, 429-35.

Pittler, S.J., Baehr, W., Wasmuth, J.J., McConnell, D.G., Champagne, M.S., vanTuinen, P., Ledbetter, D. and 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, 272-83.

Pittler, S.J., Lee, A.K., Altherr, M.R., Howard, T.A., Seldin, M.F., Hurwitz, R.L., Wasmuth, J.J. and Baehr, W. (1992) Primary structure and chromosomal localization of human and mouse rod photoreceptor cGMP-gated cation channel. *J Biol Chem*, 267, 6257-62.

Pomares, E., Riera, M., Permanyer, J., Mendez, P., Castro-Navarro, J., Andres-Gutierrez, A., Marfany, G. and Gonzalez-Duarte, R. (2010) Comprehensive SNP-chip for retinitis pigmentosa-Leber congenital amaurosis diagnosis: new mutations and detection of mutational founder effects. *Eur J Hum Genet*, 18, 118-24.

Pugh, E.N., Jr., Nikonov, S. and Lamb, T.D. (1999) Molecular mechanisms of vertebrate photoreceptor light adaptation. *Curr Opin Neurobiol*, 9, 410-8.

R

Radu, R.A., Yuan, Q., Hu, J., Peng, J.H., Lloyd, M., Nusinowitz, S., Bok, D. and Travis, G.H. (2008) Accelerated accumulation of lipofuscin pigments in the RPE of a mouse model for ABCA4-mediated retinal dystrophies following Vitamin A supplementation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49, 3821-9.

Rattner, A., Smallwood, P.M., Williams, J., Cooke, C., Savchenko, A., Lyubarsky, A., Pugh, E.N. and Nathans, J. (2001) A photoreceptor-specific cadherin is essential for the structural integrity of the outer segment and for photoreceptor survival. *Neuron*, 32, 775-86.

Riazuddin, S.A., Zulfiqar, F., Zhang, Q., Yao, W., Li, S., Jiao, X., Shahzadi, A., Amer, M., Iqbal, M., Hussnain, T. et al. (2006) Mutations in the gene encoding the alpha-subunit of rod phosphodiesterase in consanguineous Pakistani families. *Mol Vis*, 12, 1283-91.

Rivolta, C., Sharon, D., DeAngelis, M.M. and Dryja, T.P. (2002) Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Hum Mol Genet*, 11, 1219-27.

Rivolta, C., Sweklo, E.A., Berson, E.L. and Dryja, T.P. (2000) Missense mutation in the USH2A gene: association with recessive retinitis pigmentosa without hearing loss. *Am J Hum Genet*, 66, 1975-8.

Roux, A.F., Faugere, V., Le Guedard, S., Pallares-Ruiz, N., Vielle, A., Chambert, S., Marlin, S., Hamel, C., Gilbert, B., Malcolm, S. et al. (2006) Survey of the frequency of USH1 gene mutations in a cohort of Usher patients shows the importance of cadherin 23 and protocadherin 15 genes and establishes a detection rate of above 90%. *J Med Genet*, 43, 763-8.

Ruiz, A., Borrego, S., Marcos, I. and Antinolo, G. (1998) A major locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa on 6q, determined by homozygosity mapping of chromosomal regions that contain gamma-aminobutyric acid-receptor clusters. *Am J Hum Genet*, 62, 1452-9.

Ruiz, A., Winston, A., Lim, Y.H., Gilbert, B.A., Rando, R.R. and Bok, D. (1999) Molecular and biochemical characterization of lecithin retinol acyltransferase. *J Biol Chem*, 274, 3834-41.

S

Sandoval, N., Platzer, M., Rosenthal, A., Dork, T., Bendix, R., Skawran, B., Stuhrmann, M., Wegner, R.D., Sperling, K., Banin, S. et al. (1999) Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia telangiectasia families. *Hum Mol Genet*, 8, 69-79.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74 (12): 5463–5467.

Schatz, P., Preising, M., Lorenz, B., Sander, B., Larsen, M. and Rosenberg, T. Fundus Albipunctatus Associated with Compound Heterozygous Mutations in RPE65. *Ophthalmology*.

Schorderet, D.F. and Escher, P. (2009) NR2E3 mutations in enhanced S-cone sensitivity syndrome (ESCS), Goldmann-Favre syndrome (GFS), clumped pigmentary retinal degeneration (CPRD), and retinitis pigmentosa (RP). *Hum Mutat*, 30, 1475-85.

Schraders, M., Lee, K., Oostrik, J., Huygen, P.L., Ali, G., Hoefsloot, L.H., Veltman, J.A., Cremers, F.P., Basit, S., Ansar, M. et al. Homozygosity mapping reveals mutations of GRXCR1 as a cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment. *Am J Hum Genet*, 86, 138-47.

Schuster, A., Janecke, A.R., Wilke, R., Schmid, E., Thompson, D.A., Utermann, G., Wissinger, B., Zrenner, E. and Gal, A. (2007) The phenotype of early-onset retinal degeneration in persons with RDH12 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 1824-31.

Senechal, A., Humbert, G., Surget, M.O., Bazalgette, C., Bazalgette, C., Arnaud, B., Arndt, C., Laurent, E., Brabet, P. and Hamel, C.P. (2006) Screening genes of the retinoid metabolism: novel LRAT mutation in leber congenital amaurosis. *Am J Ophthalmol*, 142, 702-4.

Seyedahmadi, B.J., Rivolta, C., Keene, J.A., Berson, E.L. and 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, 167-73.

Simonelli, F., Ziviello, C., Testa, F., Rossi, S., Fazzi, E., Bianchi, P.E., Fossarello, M., Signorini, S., Bertone, C., Galantuomo, S. et al. (2007) Clinical and molecular genetics of Leber's congenital amaurosis: a multicenter study of Italian patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 4284-90.

Simpson, D.A., Clark, G.R., Alexander, S., Silvestri, G. and Willoughby, C.E. Molecular diagnosis for heterogeneous genetic diseases with targeted high-throughput DNA sequencing applied to retinitis pigmentosa. *J Med Genet*.

Singh, H.P., Jalali, S., Narayanan, R. and Kannabiran, C. (2009) Genetic analysis of Indian families with autosomal recessive retinitis pigmentosa by homozygosity screening. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 4065-71.

Singh, HP., Jalali, S., Narayanan, R., Kannabiran, C (2009). Genetic analysis of Indian families with autosomal recessive retinitis pigmentosa by homozygosity screening. Invest *Ophthalmol Vis Sci.* Sep;50(9):4065-71

Smith, A.J., Bainbridge, J.W. and Ali, R.R. (2009) Prospects for retinal gene replacement therapy. *Trends Genet*, 25, 156-65.

Stenirri, S., Alaimo, G., Manitto, M.P., Brancato, R., Ferrari, M. and Cremonesi, L. (2008) Are microarrays useful in the screening of ABCA4 mutations in Italian patients affected by macular degenerations? *Clin Chem Lab Med*, 46, 1250-5.

Stryer, L. (1986) Cyclic GMP cascade of vision. *Annu Rev Neurosci*, 9, 87-119.

Sullivan, L.S., Heckenlively, J.R., Bowne, S.J., Zuo, J., Hide, W.A., Gal, A., Denton, M., Inglehearn, C.F., Blanton, S.H. and Daiger, S.P. (1999) Mutations in a novel retina-specific gene cause autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 22, 255-9.

T

Takahara, K., Schwarze, U., Imamura, Y., Hoffman, G.G., Toriello, H., Smith, L.T., Byers, P.H. and Greenspan, D.S. (2002) Order of intron removal influences multiple splice outcomes, including a two-exon skip, in a COL5A1 acceptor-site mutation that results in abnormal pro-alpha1(V) N-propeptides and Ehlers-Danlos syndrome type I. *Am J Hum Genet*, 71, 451-65.

Tang, Z., Wang, Z., Wang, Z., Ke, T., Wang, Q.K. and Liu, M. (2009) Novel compound heterozygous mutations in CERKL cause autosomal recessive retinitis pigmentosa in a nonconsanguineous Chinese family. *Arch Ophthalmol*, 127, 1077-8.

Thiadens, A.A., den Hollander, A.I., Roosing, S., Nabuurs, S.B., Zekveld-Vroon, R.C., Collin, R.W., De Baere, E., Koenekoop, R.K., van Schooneveld, M.J., Strom, T.M. et al. (2009) Homozygosity mapping reveals PDE6C mutations in patients with early-onset cone photoreceptor disorders. *Am J Hum Genet*, 85, 240-7.

Thompson, D.A., Janecke, A.R., Lange, J., Feathers, K.L., Hubner, C.A., McHenry, C.L., Stockton, D.W., Rammesmayer, G., Lupski, J.R., Antinolo, G. et al. (2005) Retinal degeneration associated with RDH12 mutations results from decreased 11-cis retinal synthesis due to disruption of the visual cycle. *Hum Mol Genet*, 14, 3865-75.

Thompson, D.A., Li, Y., McHenry, C.L., Carlson, T.J., Ding, X., Sieving, P.A., Apfelstedt-Sylla, E. and Gal, A. (2001) Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet*, 28, 123-4.

Trudeau, M.C. and Zagotta, W.N. (2002) Mechanism of calcium/calmodulin inhibition of rod cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8424-9.

Tsang, S.H., Tsui, I., Chou, C.L., Zernant, J., Haamer, E., Iranmanesh, R., Tosi, J. and Allikmets, R. (2008) A Novel Mutation and Phenotypes in Phosphodiesterase 6 Deficiency. *Am J Ophthalmol*.

Tschernutter, M., Jenkins, S.A., Waseem, N.H., Saihan, Z., Holder, G.E., Bird, A.C., Bhattacharya, S.S., Ali, R.R. and Webster, A.R. (2006) Clinical characterisation of a family with retinal dystrophy caused by mutation in the Mertk gene. *Br J Ophthalmol*, 90, 718-23.

Tuson, M., Garanto, A., Gonzalez-Duarte, R. and Marfany, G. (2009) Overexpression of CERKL, a gene responsible for retinitis pigmentosa in humans, protects cells from apoptosis induced by oxidative stress. *Mol Vis*, 15, 168-80.

Tuson, M., Marfany, G. and Gonzalez-Duarte, R. (2004) Mutation of CERKL, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26). *Am J Hum Genet*, 74, 128-38.

U

Usher CH (1935). Bowman´s lecture: on a few hereditary eye affections. *Trans Ophthal Soc*, 55, 164-245.

V

Vallespin, E., Cantalapiedra, D., Riveiro-Alvarez, R., Wilke, R., Aguirre-Lamban, J., Avila-Fernandez, A., Lopez-Martinez, M.A., Gimenez, A., Trujillo-Tiebas, M.J., Ramos, C. et al. (2007) Mutation screening of 299 Spanish families with retinal dystrophies by Leber congenital amaurosis genotyping microarray. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 5653-61.

Vallespin, E., Lopez-Martinez, M.A., Cantalapiedra, D., Riveiro-Alvarez, R., Aguirre-Lamban, J., Avila-Fernandez, A., Villaverde, C., Trujillo-Tiebas, M.J. and Ayuso, C. (2007) Frequency of CEP290 c.2991_1655A>G mutation in 175 Spanish families affected with Leber congenital amaurosis and early-onset retinitis pigmentosa. *Mol Vis*, 13, 2160-2.

Valverde, D., Pereiro, I., Vallespin, E., Ayuso, C., Borrego, S. and Baiget, M. (2009) Complexity of phenotype-genotype correlations in Spanish patients with RDH12 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 1065-8.

Valverde, D., Riveiro-Alvarez, R., Aguirre-Lamban, J., Baiget, M., Carballo, M., Antinolo, G., Millan, J.M., Garcia Sandoval, B. and Ayuso, C. (2007) Spectrum of the ABCA4 gene mutations implicated in severe retinopathies in Spanish patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 985-90.

van Wijk, E., Kersten, F.F., Kartono, A., Mans, D.A., Brandwijk, K., Letteboer, S.J., Peters, T.A., Marker, T., Yan, X., Cremers, C.W. et al. (2009) Usher syndrome and

Leber congenital amaurosis are molecularly linked via a novel isoform of the centrosomal ninein-like protein. *Hum Mol Genet*, 18, 51-64.
van Wijk, E., Pennings, R.J., te Brinke, H., Claassen, A., Yntema, H.G., Hoefsloot, L.H., Cremers, F.P., Cremers, C.W. and Kremer, H. (2004) Identification of 51 novel exons of the Usher syndrome type 2A (USH2A) gene that encode multiple conserved functional domains and that are mutated in patients with Usher syndrome type II. *Am J Hum Genet*, 74, 738-44.

Vastinsalo, H., Jalkanen, R., Dinculescu, A., Isosomppi, J., Geller, S., Flannery, J.G., Hauswirth, W.W. and Sankila, E.M. Alternative splice variants of the USH3A gene Clarin 1 (CLRN1). *Eur J Hum Genet*, 19, 30-5.

W

Wang, DY., Chan, WM., Tam, PO., Baum, L., Lam, DS., Chong, KK., Fan, BJ., Pang, CP. Gene mutations in retinitis pigmentosa and their clinical implications. *Clin Chim Acta*. 2005 Jan;351(1-2):5-16. Review.

Wang, H., den Hollander, A.I., Moayedi, Y., Abulimiti, A., Li, Y., Collin, R.W., Hoyng, C.B., Lopez, I., Bray, M., Lewis, R.A. et al. (2009) Mutations in SPATA7 cause Leber congenital amaurosis and juvenile retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet*, 84, 380-7.

Wang, N.K., Tosi, J., Kasanuki, J.M., Chou, C.L., Kong, J., Parmalee, N., Wert, K.J., Allikmets, R., Lai, C.C., Chien, C.L. et al. Transplantation of reprogrammed embryonic stem cells improves visual function in a mouse model for retinitis pigmentosa. *Transplantation*, 89, 911-9.

Weier, H.U., Fung, J. and 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, 91-2.
Weiss, A.H. and Biersdorf, W.R. (1989) Visual sensory disorders in congenital nystagmus. *Ophthalmology*, 96, 517-23.

Weitz, D., Zoche, M., Muller, F., Beyermann, M., Korschen, H.G., Kaupp, U.B. and Koch, K.W. (1998) Calmodulin controls the rod photoreceptor CNG channel through an unconventional binding site in the N-terminus of the beta-subunit. *Embo J*, 17, 2273-84.

Wenzel, A., Oberhauser, V., Pugh, E.N., Jr., Lamb, T.D., Grimm, C., Samardzija, M., Fahl, E., Seeliger, M.W., Reme, C.E. and von Lintig, J. (2005) The retinal G protein-coupled receptor (RGR) enhances isomerohydrolase activity independent of light. *J Biol Chem*, 280, 29874-84.

Weston, M.D., Eudy, J.D., Fujita, S., Yao, S., Usami, S., Cremers, C., Greenberg, J., Ramesar, R., Martini, A., Moller, C. et al. (2000) Genomic structure and identification of novel mutations in usherin, the gene responsible for Usher syndrome type IIa. *Am J Hum Genet*, 66, 1199-210.

Wissinger, B., Gamer, D., Jagle, H., Giorda, R., Marx, T., Mayer, S., Tippmann, S., Broghammer, M., Jurklies, B., Rosenberg, T. et al. (2001) CNGA3 mutations in hereditary cone photoreceptor disorders. *Am J Hum Genet*, 69, 722-37.

Woods, C.G., Cox, J., Springell, K., Hampshire, D.J., Mohamed, M.D., McKibbin, M., Stern, R., Raymond, F.L., Sandford, R., Malik Sharif, S. et al. (2006) Quantification of homozygosity in consanguineous individuals with autosomal recessive disease. *Am J Hum Genet*, 78, 889-96.

Wright, A.F., Chakarova, C.F., Abd El-Aziz, M.M. and Bhattacharya, S.S. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat Rev Genet*, 11, 273-284.

Y

Yamaki, K., Tsuda, M., Kikuchi, T., Chen, K.H., Huang, K.P. and Shinohara, T. (1990) Structural organization of the human S-antigen gene. cDNA, amino acid, intron, exon, promoter, in vitro transcription, retina, and pineal gland. *J Biol Chem*, 265, 20757-62.

Yang, Y., Mohand-Said, S., Danan, A., Simonutti, M., Fontaine, V., Clerin, E., Picaud, S., Leveillard, T. and Sahel, J.A. (2009) Functional cone rescue by RdCVF protein in a dominant model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther*, 17, 787-95.

Yau, K.W. (1994) Cyclic nucleotide-gated channels: an expanding new family of ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 3481-3.

Yau, K.W. and Baylor, D.A. (1989) Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. *Annu Rev Neurosci*, 12, 289-327.

Yzer, S., Leroy, B.P., De Baere, E., de Ravel, T.J., Zonneveld, M.N., Voesenek, K., Kellner, U., Ciriano, J.P., de Faber, J.T., Rohrschneider, K. et al. (2006) Microarray-based mutation detection and phenotypic characterization of patients with Leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 1167-76.

Z

Zernant, J., Kulm, M., Dharmaraj, S., den Hollander, A.I., Perrault, I., Preising, M.N., Lorenz, B., Kaplan, J., Cremers, F.P., Maumenee, I. et al. (2005) Genotyping microarray (disease chip) for Leber congenital amaurosis: detection of modifier alleles. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 3052-9.

Zhang, Q., Zulfiqar, F., Riazuddin, S.A., Xiao, X., Ahmad, Z., Riazuddin, S. and Hejtmancik, J.F. (2004) Autosomal recessive retinitis pigmentosa in a Pakistani family mapped to CNGA1 with identification of a novel mutation. *Mol Vis*, 10, 884-9.

Zhang, X., Liu, H., Zhang, Y., Qiao, Y., Miao, S., Wang, L., Zhang, J., Zong, S. and Koide, S.S. (2003) A novel gene, RSD-3/HSD-3.1, encodes a meiotic-related protein expressed in rat and human testis. *J Mol Med*, 81, 380-7.

ANEXOS

ANEXO I
Consentimiento informado pacientes
Consentimiento informado donantes voluntarios

HOJA DE INFORMACIÓN PARA DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN DE PATOLOGÍAS OCULARES

ETIQUETA IDENTIFICATIVA PACIENTE

En caso de no poseer Etiqueta identificativa
Nombre y Apellidos:

DNI:
Nº Familia (si lo conoce):
Nº de ADN (si lo conoce):

SERVICIO: GENÉTICA
MEDICO RESPONSABLE:
INVESTIGADOR PRINCIPAL:
PROPORCIONA ESTE CONSENTIMIENTO:

DIAGNÓSTICO:
PROCEDIMIENTO DIAGNÓSTICO PROPUESTO: ☐ Estudio Genético ☐ Investigación

ESTUDIO GENÉTICO DE PATOLOGÍAS OCULARES

- OBJETIVOS Y FINALIDAD DEL ESTUDIO:

Las distrofias de Retina (DR) hereditarias, entre otras patologías oculares, son enfermedades genéticas que provocan ceguera y discapacidad.

El Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz-Capio pertenece a grupos de investigación internacionales (EVI-Genoret (http://www.evi-genoret.org/), CIBERER, E-Rare, Genoptics y otros) que se dedican al estudio de las enfermedades oculogenéticas: DR y DMAE. El Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz-Capio participa en esta investigación realizando los estudios genéticos que permitirán conocer mejor el posible papel de los genes relacionados con su enfermedad.

Su colaboración puede ayudar a mejorar el conocimiento sobre estas enfermedades. Los resultados contribuirán de forma global a conocer sus causas, mejorar la información a las familias afectadas y a posibilitar una prevención, diagnóstico y tratamiento más rápido y eficaz disminuyendo la frecuencia y gravedad de las mismas.

- DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO:

El procedimiento a seguir es el habitual para el diagnóstico y el consejo genético, solicitados por Vd., su familiar o su médico, para la evaluación clínica de la enfermedad:

A) Una consulta para recoger sus antecedentes personales y familiares.

B) La obtención de una muestra biológica (de 5 a 15 ml de sangre venosa o el cepillado del interior de la mejilla/saliva para la obtención de células bucales).

MUESTRAS BIOLÓGICAS

A partir de las muestras biológicas, se extraerá el material genético necesario para el estudio (ADN y/o ARN) y/o se cultivarán los linfocitos (células existentes en la sangre) para la obtención de cromosomas.

Nosotros protegeremos la confidencialidad de las muestras asignándoles un código específico. Su muestra solo será identificada a través del código que la ligará a usted. La decodificación solo podrá ser llevada a cabo por el investigador principal o la persona autorizada por él.

1.- Una pequeña parte de este material se utilizará para el análisis diagnóstico de los genes en estudio, relacionados con las patologías oculares.

Si Vd. acepta sólo los estudios genéticos descritos en este punto, su muestra se destruirá después de completar las pruebas.

2.- Es probable que en un futuro se descubran más genes que puedan estar también involucrados en el desarrollo de estas enfermedades. Por ello se le solicita que autorice al Investigador a almacenar su muestra para el estudio de otros genes que se puedan descubrir en un futuro.

Si autoriza el almacenamiento, la muestra codificada se guardará de forma adecuada durante un periodo de hasta 20 años, en nuestro banco de ADN, en la Fundación Jiménez Díaz-Capio.

3.- Vd. debe decidir el destino que debemos dar a su muestra al término de esta investigación (puntos 1 y 2) y comunicárnoslo mediante el Consentimiento Informado.

Su muestra podría ser destruida, ser anonimizada (perderá los identificadores que la ligan a Vd. y por tanto no podrá ser localizada ni destruida) o ser almacenada hasta su posible incorporación a un nuevo estudio, para lo que necesariamente nuestro equipo tendría que ponerse en contacto con Vd., informarle y solicitarle un nuevo consentimiento.

ATENCIÓN: Todo documento del sistema de Gestión de la Calidad obtenido de la Intranet tiene consideración de copia no controlada. Únicamente se considera documentación controlada la residente en la Intranet del Portal de Calidad de Capio Sanidad. CÓDIGO: EDICIÓN:

BENEFICIOS QUE SE ESPERAN ALCANZAR:

La información que se produzca podría ser útil para su salud y la de su familia. Nosotros también esperamos que los resultados obtenidos nos permitan ampliar nuestros conocimientos en las enfermedades de base genética y posiblemente contribuir al beneficio de la sociedad en general.

Tiene Vd. derecho a conocer los resultados genéticos individuales y/o generales confirmados que se obtengan del análisis de las muestras donadas y las repercusiones clínicas conocidas que ello conlleva.

RIESGOS Y ALTERNATIVAS:

Aun cuando la toma de la muestra de sangre no cause problemas serios, ésta puede ocasionar un poco de sangrado, magulladura, desvanecimiento, vértigo, infección y/o molestia en el sitio de la inyección.

Es posible que se obtenga información relativa a su salud, en ese caso se le entregaría un informe genético explicándole la implicación clínica que tiene la alteración genética identificada, en una consulta de "Consejo Genético".

Vd. debe advertir a los investigadores en caso de NO QUERER ser informado.

La información obtenida podría tener consecuencias para sus familiares. En ese caso sería conveniente que Vd. mismo les trasmitiera dicha información.

FUENTE DE FINANCIACIÓN

El proyecto de investigación está financiado con fondos españoles del Ministerio de Ciencia e Innovación español (ISCIII) y/u otros (Mutua Madrileña, Merck Serono, etc.). Ni los investigadores ni los participantes en el estudio percibirán remuneración económica alguna por su participación.

CONFIDENCIALIDAD Y DERECHOS DE ACCESO Y RECTIFICACIÓN

Toda la información (datos personales, clínicos, genéticos, etc.) será recogida y tratada de forma estrictamente confidencial por todo el personal y, respetará en todo momento lo establecido por la legislación aplicable y regulaciones vigentes en materia de, protección de datos de carácter personal y principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas. (Entre otras: Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos, Ley 41/2002 de Autonomía del Paciente, Ley 14/1986 General de Sanidad y Ley 14/2007 de Investigación Biomédica). Únicamente el código permitirá a los investigadores responsables de la Fundación Jiménez Díaz hacer corresponder las muestras biológicas y los datos con las personas participantes.

Estos datos formarán parte de un fichero automatizado y/o manual cuya finalidad es la de gestionar su historia clínica y que estará ubicado en la Fundación Jiménez Díaz. El responsable del fichero es la Dirección Médica de la Fundación Jiménez Díaz con domicilio en la Avda/ Reyes Católicos nº 2 Madrid (28040), dónde podrá ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición que en aplicación de la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos legalmente le asisten.

Ninguno de sus datos personales será transferido, únicamente algunos de los datos clínicos, codificados y sin ninguna identificación personal serán introducidos en bases de datos restringidas a la que sólo los investigadores (de EVI-GENORET, CIBERER, E-Rare, Genoptics u otros) pueden acceder.

Los resultados del estudio podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones científicas, manteniendo una estricta confidencialidad sobre la identidad de los pacientes.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Teniendo en cuenta que el estudio utiliza muestras para el estudio de genes, se respetarán los principios de la Declaración de Helsinki, los contenidos de la Declaración Universal de la UNESCO, y la ratificación del Convenio para la Protección de los Derechos Humanos y la Dignidad del Ser Humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina (Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina; BOE n. 251 de 20/10/1999).

Su participación en este estudio es completamente libre y voluntaria. Vd. puede decidir no participar y, estará en libertad de retirarse del estudio en cualquier momento. Para ello deberá contactar con algún miembro del equipo investigador e indicar su decisión acerca del destino de sus muestras/datos personales.

Tómese el tiempo necesario para reflexionar sobre su decisión y discuta su participación en el proyecto con personas cercanas a Vd. antes de darnos su respuesta.

Le comunicamos que su decisión, sea cual sea, no afectará a su atención médica o la de sus familiares.

Si se dispone de nueva información que pueda ser relevante para su decisión de participar en el estudio, Vd. será informado.

Tal como exige la ley, para participar deberá firmar y fechar el documento de Consentimiento Informado.

COPIA PARA EL PACIENTE

CONSENTIMIENTO

Proporciona la información y este consentimiento:…….

Yo, D./Dª …… con DNI ……
como (marcar lo que proceda):

□ PACIENTE/PARTICIPANTE
□ REPRESENTANTE LEGAL:……..de….....
□ TESTIGO DEL CONSENTIMIENTO ORAL de….....…

Declaro bajo mi responsabilidad que:
- He/ha recibido una copia de la Hoja de Información al Participante y una copia firmada de este Consentimiento Informado.

- He/ha leído la Hoja de Información que se me/le ha entregado sobre el estudio.
- He/ha podido hacer preguntas sobre el estudio, he/ha recibido suficiente información sobre el estudio y la he/ha comprendido.
- Comprendo/e que la participación es voluntaria.
- He/ha tenido tiempo para reflexionar sobre mi/su decisión antes de dar el consentimiento.
- Comprendo/e que puedo/e retirarme/se del estudio:
  1) Cuando quiera.
  2) Sin tener que dar explicaciones.
  3) Sin que esto repercuta en mis/sus cuidados médicos.

Presto/a libremente mi/su conformidad para que (Marque con una X la parte del estudio a la que dé consentimiento):

Punto 1.- □ se pueda realizar el análisis diagnóstico en relación con las Enfermedades Oculogenéticas en mi/su muestra de ADN.

- □ SI / □ NO deseo/a ser informado/a.

Punto 2.- □ se guarde mi/su muestra de ADN, durante al menos 20 años, permitiendo la realización de investigación en el futuro cuando se tengan más conocimientos sobre los genes relacionados con las Enfermedades Oculogenéticas.

- En caso de obtenerse de esta investigación resultados individuales y relevantes para mi salud,

□ SI / □ NO deseo/a ser informado/a.

Punto 3.- □ mis/sus datos clínicos, sin identificación personal, sean introducidos en las bases de datos europeas de acceso restringido para los investigadores y colaboradores.

Punto 4. – al término de esta investigación, mis/sus muestras:

□ sean almacenadas hasta que decida, por medio de un nuevo Consentimiento Informado, su inclusión en un nuevo proyecto.

□ sean anonimizadas, por lo tanto no podrán localizarse ni ser destruidas.

□ sean destruidas.

Firma del paciente/Representante legal o tutor/Testigo del consentimiento oral	Firma del médico responsable **Nombre y Apellidos:** Nº Colegiado:
Fecha:	Fecha:

ATENCIÓN: Todo documento del sistema de Gestión de la Calidad obtenido de la Intranet tiene consideración de copia no controlada. Únicamente se considera documentación controlada la residente en la Intranet del Portal de Calidad de Capio Sanidad. CÓDIGO: EDICIÓN:

REVOCACION DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, D./Dª ……como (marcar lo que proceda):□ PACIENTE/ □ REPRESENTANTE LEGAL O TUTOR/ □ TESTIGO DEL CONSENTIMIENTO ORAL DEL PACIENTE revoco/a libremente el consentimiento informado firmado en el presente documento para:

Punto 1.- □ se pueda realizar el análisis diagnóstico en relación con las Enfermedades Oculogenéticas en mi/su muestra de ADN.

- □ ser informado/a del resultado del diagnóstico genético.

Punto 2.- □ se guarde mi/su muestra de ADN, durante al menos 20 años, permitiendo la realización de investigación en el futuro cuando se tengan más conocimientos sobre los genes relacionados con las Enfermedades Oculogenéticas.

- En caso de obtenerse de esta investigación resultados individuales y relevantes para mi salud,

□ SI / □ NO deseo/a ser informado/a.

Punto 3.- □ mis/sus datos clínicos, sin identificación personal, sean introducidos en las bases de datos europeas de acceso restringido para los investigadores y colaboradores.

Punto 4. – al término de esta investigación, mis/sus muestras:

□ sean almacenadas hasta que decida, por medio de un nuevo Consentimiento Informado, su inclusión en un nuevo proyecto.

Por ello deseo que mis muestras:

□ sean anonimizadas, por lo tanto no podrán localizarse ni ser destruidas.

□ sean destruidas.

Firma del paciente/Representante legal o tutor/Testigo de la revocación oral	Firma del médico responsable **Nombre y Apellidos:** Nº Colegiado:
Fecha:	Fecha:

CAMBIO DE MÉDICO

Yo, D./Dª ……como (marcar lo que proceda):□ PACIENTE/ □ REPRESENTANTE LEGAL O TUTOR/ □ TESTIGO DEL CONSENTIMIENTO ORAL manifiesto/a conocer y autorizo/a que el médico designado para realizar el procedimiento que me ha sido propuesto sea el Dr:……

Manifiesto mi autorización al cambio de médico propuesto, Firma del paciente/Representante legal o tutor/Testigo del consentimiento oral	Firma del médico que va a realizar el procedimiento **Nombre y Apellidos:** Nº Colegiado:
Fecha:	Fecha:

COPIA PARA EL SERVICIO DE GENÉTICA

CONSENTIMIENTO

Proporciona la información y este consentimiento:…….

Yo, D./Dª …… con DNI ……. como (marcar lo que proceda):

□ PACIENTE/PARTICIPANTE
□ REPRESENTANTE LEGAL:……..de….....
□ TESTIGO DEL CONSENTIMIENTO ORAL de….....…

Declaro bajo mi responsabilidad que:
- He/ha recibido una copia de la Hoja de Información al Participante y una copia firmada de este Consentimiento Informado.

- He/ha leído la Hoja de Información que se me/le ha entregado sobre el estudio.
- He/ha podido hacer preguntas sobre el estudio, he/ha recibido suficiente información sobre el estudio y la he/ha comprendido.
- Comprendo/e que la participación es voluntaria.
- He/ha tenido tiempo para reflexionar sobre mi/su decisión antes de dar el consentimiento.
- Comprendo/e que puedo/e retirarme/se del estudio:
  1) Cuando quiera.
  2) Sin tener que dar explicaciones.
  3) Sin que esto repercuta en mis/sus cuidados médicos.

Presto/a libremente mi/su conformidad para que (Marque con una X la parte del estudio a la que dé consentimiento):

Punto 1.- □ se pueda realizar el análisis diagnóstico en relación con las Enfermedades Oculogenéticas en mi/su muestra de ADN.

- □ SI / □ NO deseo/a ser informado/a.

Punto 2.- □ se guarde mi/su muestra de ADN, durante al menos 20 años, permitiendo la realización de investigación en el futuro cuando se tengan más conocimientos sobre los genes relacionados con las Enfermedades Oculogenéticas.

- En caso de obtenerse de esta investigación resultados individuales y relevantes para mi salud,

□ SI / □ NO deseo/a ser informado/a.

Punto 3.- □ mis/sus datos clínicos, sin identificación personal, sean introducidos en las bases de datos europeas de acceso restringido para los investigadores y colaboradores.

Punto 4. – al término de esta investigación, mis/sus muestras:

□ sean almacenadas hasta que decida, por medio de un nuevo Consentimiento Informado, su inclusión en un nuevo proyecto.

□ sean anonimizadas, por lo tanto no podrán localizarse ni ser destruidas.

□ sean destruidas.

Firma del paciente/Representante legal o tutor/Testigo del consentimiento oral	Firma del médico responsable **Nombre y Apellidos:** Nº Colegiado:
Fecha:	Fecha:

REVOCACION DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, D./Dª ……como (marcar lo que proceda):□ PACIENTE/ □ REPRESENTANTE LEGAL O TUTOR/ □ TESTIGO DEL CONSENTIMIENTO ORAL DEL PACIENTE revoco/a libremente el consentimiento informado firmado en el presente documento para:

Punto 1.- □ se pueda realizar el análisis diagnóstico en relación con las Enfermedades Oculogenéticas en mi/su muestra de ADN.

- □ ser informado/a del resultado del diagnóstico genético.

Punto 2.- □ se guarde mi/su muestra de ADN, durante al menos 20 años, permitiendo la realización de investigación en el futuro cuando se tengan más conocimientos sobre los genes relacionados con las Enfermedades Oculogenéticas.

- En caso de obtenerse de esta investigación resultados individuales y relevantes para mi salud,

□ SI / □ NO deseo/a ser informado/a.

Punto 3.- □ mis/sus datos clínicos, sin identificación personal, sean introducidos en las bases de datos europeas de acceso restringido para los investigadores y colaboradores.

Punto 4. – al término de esta investigación, mis/sus muestras:

□ sean almacenadas hasta que decida, por medio de un nuevo Consentimiento Informado, su inclusión en un nuevo proyecto.

Por ello deseo que mis muestras:

□ sean anonimizadas, por lo tanto no podrán localizarse ni ser destruidas.

□ sean destruidas.

Firma del paciente/Representante legal o tutor/Testigo de la revocación oral	Firma del médico responsable **Nombre y Apellidos:** Nº Colegiado:
Fecha:	Fecha:

CAMBIO DE MÉDICO

Yo, D./Dª ……como (marcar lo que proceda):□ PACIENTE/ □ REPRESENTANTE LEGAL O TUTOR/ □ TESTIGO DEL CONSENTIMIENTO ORAL manifiesto/a conocer y autorizo/a que el médico designado para realizar el procedimiento que me ha sido propuesto sea el Dr:……

Manifiesto mi autorización al cambio de médico propuesto, Firma del paciente/Representante legal o tutor/Testigo del consentimiento oral	Firma del médico que va a realizar el procedimiento **Nombre y Apellidos:** Nº Colegiado:
Fecha:	Fecha:

ATENCIÓN: Todo documento del sistema de Gestión de la Calidad obtenido de la Intranet tiene consideración de copia no controlada. Únicamente se considera documentación controlada la residente en la Intranet del Portal de Calidad de Capio Sanidad. CÓDIGO: EDICIÓN:

CONSENTIMIENTO INFORMADO
PARA DONAR MUESTRA CONTROL PARA ESTUDIOS DE ADN

Por favor, lea con atención este documento y formule las preguntas que quiera

OBJETIVOS

Nuestro equipo pertenece a un grupo de investigación internacional para el estudio de las enfermedades genéticas.
Su objetivo es obtener nuevos conocimientos para resolver los problemas médicos de estas enfermedades (prevención, diagnostico y tratamiento).
En el Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz estamos realizando la investigación arriba mencionada, para conocer mejor el posible papel de los genes relacionados con las enfermedades.
La participación en este proyecto es voluntaria y no supone ningún riesgo para usted. Su colaboración puede ayudar a mejorar el conocimiento sobre estas enfermedades.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

La confidencialidad de los datos personales y genéticos obtenidos estará asegurada, respetando en todo momento los principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas, y lo establecido por la legislación aplicable (Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos, Ley 41/2002 de Autonomía del Paciente y Sanitaria y Ley 14/1986, General de Sanidad.,
Teniendo en cuenta que el estudio utiliza muestras para estudio de genes, se respetarán los principios de la Declaración de Helsinki y los contenidos en la Declaración Universal de la UNESCO referentes al genoma humano.
Usted es donante de sangre, en su caso se procederá a poner un códigp numérico sin ningún dato personal (proceso de anonimización) inmediatamente después de tomar su muestra.

¿EN QUÉ CONSISTIRÁ SU PARTICIPACIÓN?

En el presente estudio le pedimos su colaboración en los siguientes aspectos**:**
Extracción de una muestra de sangre periférica de unos 5cc.
Su participación en el estudio es totalmente voluntaria y si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que usted precise y la relación con el Equipo Médico que le atiende no va a verse afectada.

RIESGOS

Si usted decide participar, se le extraerá un tubo adicional de sangre, lo que no supone ningún riesgo adicional para usted. Con ello habrá concluído su participación en el estudio y no se reexigirá que dedique un tiempo extra al mismo.

BENEFICIOS QUE SE ESPERAN ALCANZAR

Los resultados de dichos estudios contribuirán de forma global a conocer la causa de estas enfermedades, a mejorar la información a las familias afectadas y a posibilitar el diagnóstico y tratamiento precoces

CONFIDENCIALIDAD Y DERECHOS DE ACCESO Y RECTIFICACIÓN

Toda la información será recogida y tratada de forma confidencial por todo el personal. **Proceso de anonimización: Su muestra no contendrá ningún dato que permita identificar ni relacionar su muestra con los resultados. No es posible para nadie hacer corresponder las muestras biológicas y los datos con las personas participantes. Por ello y en consucuencia es imposible obtener ningún resulatdo que pueda ser entregado**.
Dichas muestras serán almacenadas de forma adecuada, durante el tiempo que dure la investigación.

EN CASO DE HABER DONADO YA MUESTRA PARA EL ESTUDIO, POR FAVOR, ADVIÉRTALO.

Yo, (nombre y apellidos) _____

- Declaro bajo mi responsabilidad que he leído la Hoja de Información que se me ha entregado sobre el estudio genético y que se me han explicado las características y el objetivo del estudio genético y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar.

y acepto participar en él.

- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido suficiente información sobre el estudio y la he comprendido
- He hablado con: (nombre del investigador)

Punto 1.- Yo DOY □ **/** No DOY □ mi consentimiento voluntariamente para que se puedan realizar estudios genéticos en mi muestra de ADN anonimizada.

Consiento en participar voluntariamente en el apartado marcado de este estudio.

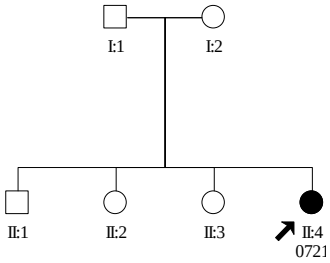
Año de nacimiento:
Sexo: hombre □ mujer □
Nacionalidad:

Donante Firma del investigador o persona autorizada

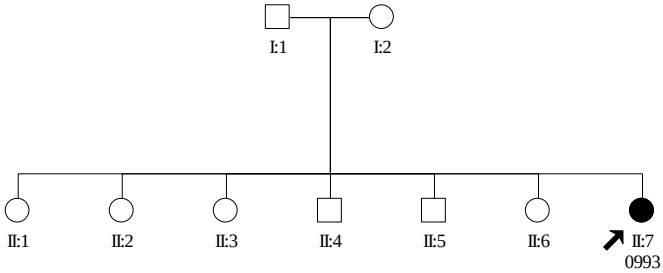
ANEXO II
Estructura de las familias estudiadas

86 familias RP Juvenil

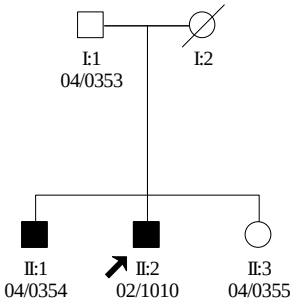
RP-0003



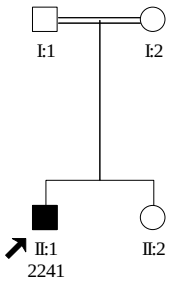
RP-0017



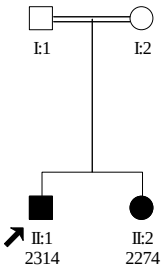
RP-0021



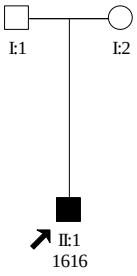
RP-0029



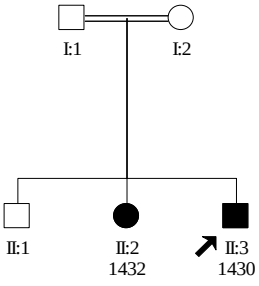
RP-0043



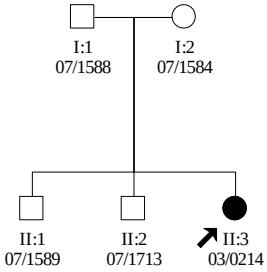
RP-0050



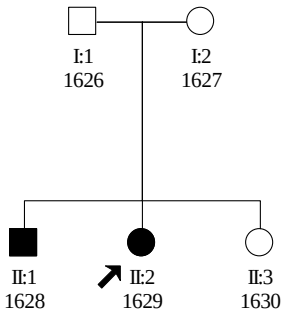
RP-0052



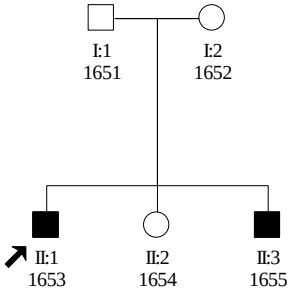
RP-0054



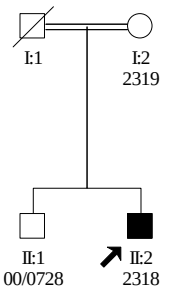
RP-0056

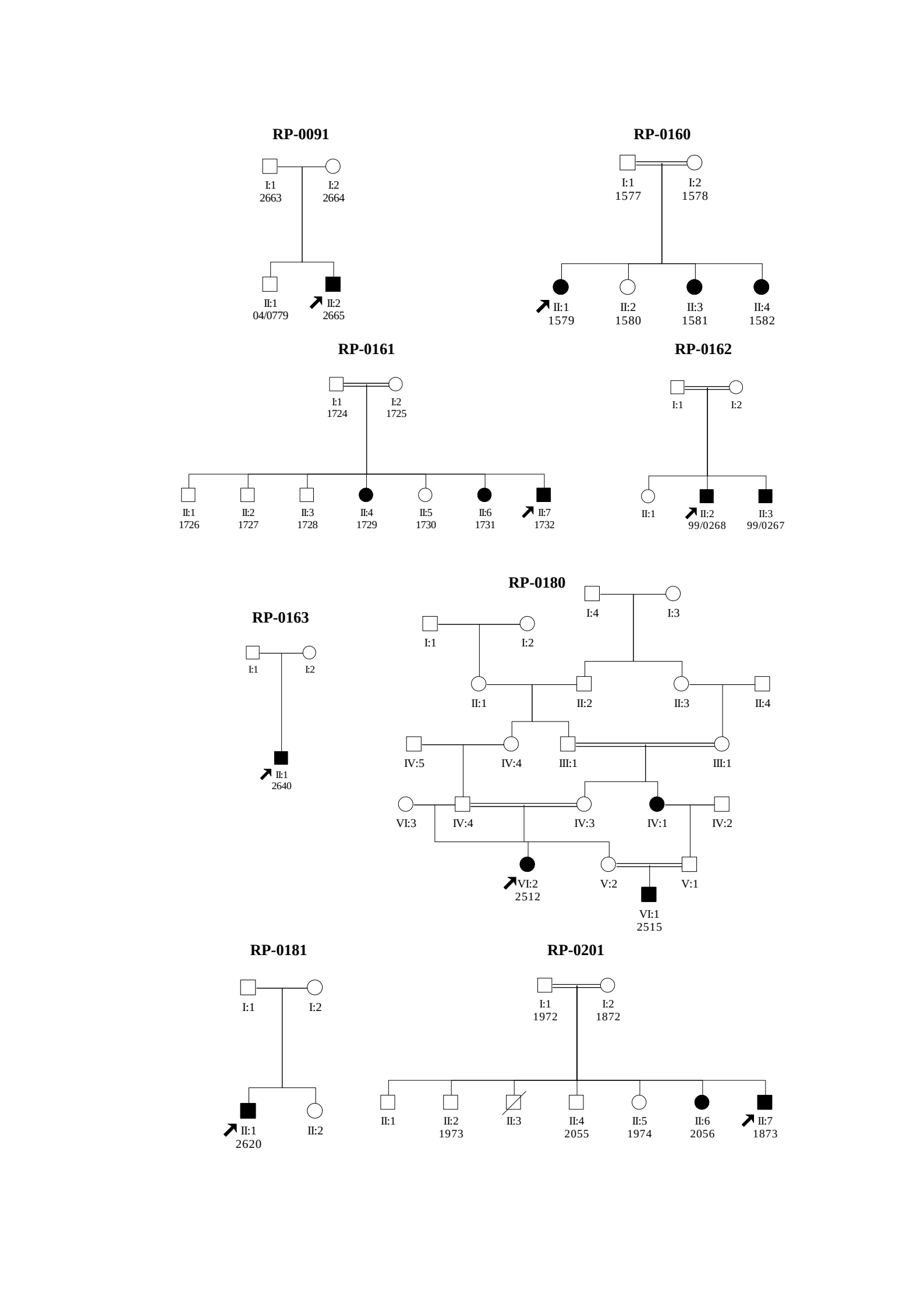


RP-0071

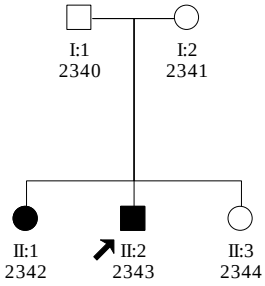


RP-0082

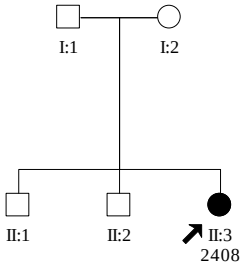



RP-0091
I:1
2663
I:2
2664
II:1
04/0779
II:2
2665
RP-0160
I:1
1577
I:2
1578
II:1
1579
II:2
1580
II:3
1581
II:4
1582
RP-0161
I:1
1724
I:2
1725
II:1
1726
II:2
1727
II:3
1728
II:4
1729
II:5
1730
II:6
1731
II:7
1732
RP-0162
I:1
I:2
II:1
II:2
99/0268
II:3
99/0267
RP-0163
I:1
I:2
II:1
2640
RP-0180
I:4
I:3
I:1
I:2
II:1
II:2
II:3
II:4
IV:5
IV:4
III:1
III:1
VI:3
IV:4
IV:3
IV:1
IV:2
VI:2
2512
V:2
V:1
VI:1
2515
RP-0181
I:1
I:2
II:1
2620
II:2
RP-0201
I:1
1972
I:2
1872
II:1
II:2
1973
II:3
II:4
2055
II:5
1974
II:6
2056
II:7
1873

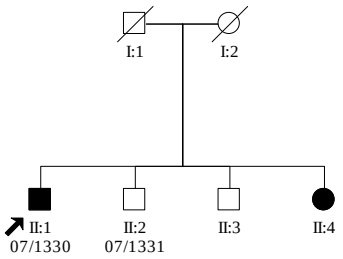
RP-0235



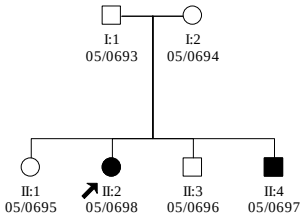
RP-0255



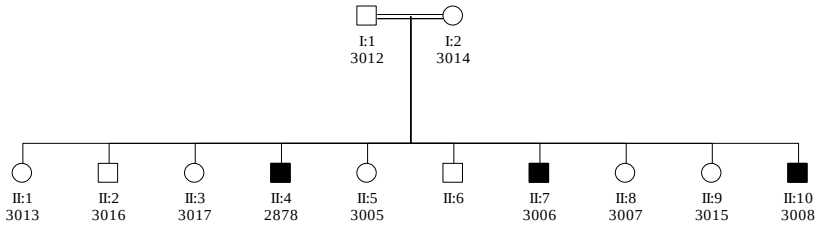
RP-0261



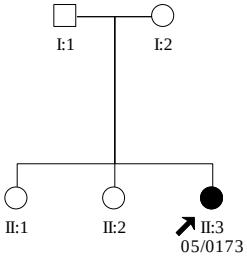
RP-0267



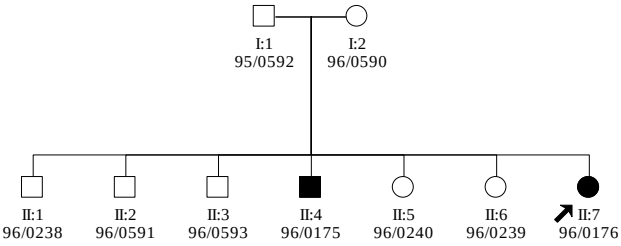
RP-0285



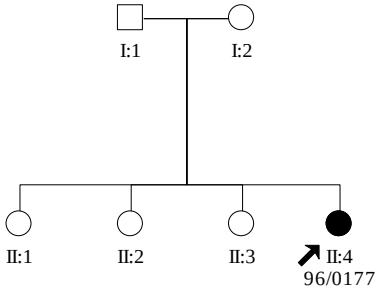
RP-0305



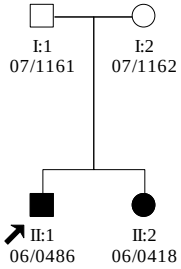
RP-0337



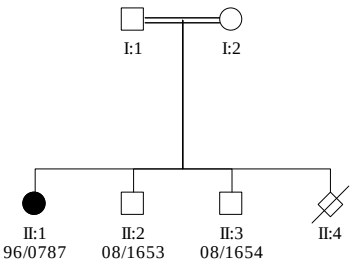
RP-0340



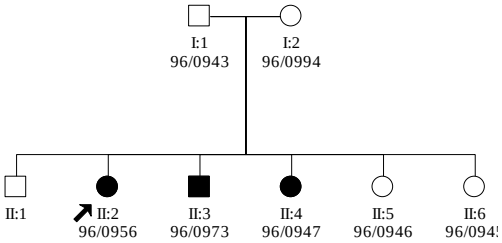
RP-0341



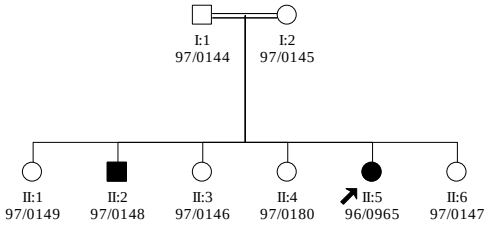
RP-0360



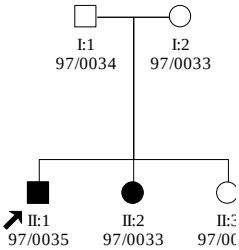
RP-0370



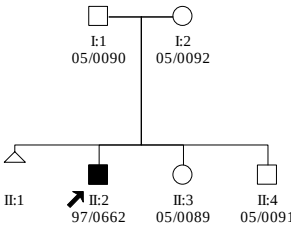
RP-0371



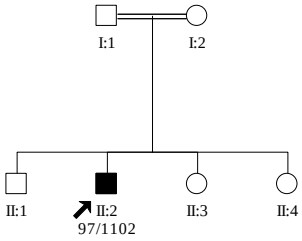
RP-0372



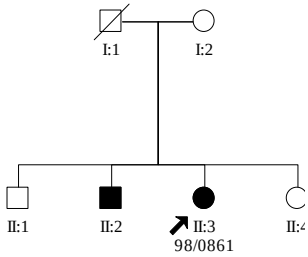
RP-0379



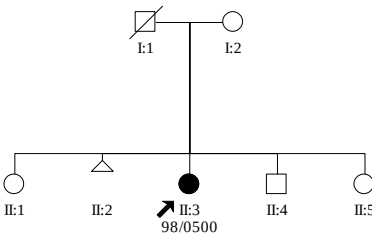
RP-0432



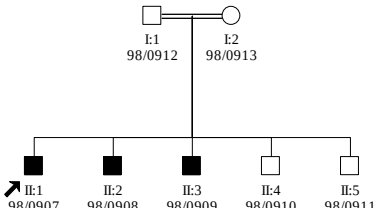
RP-0460



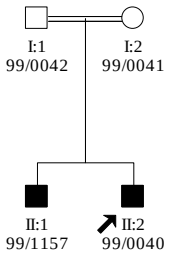
RP-0480



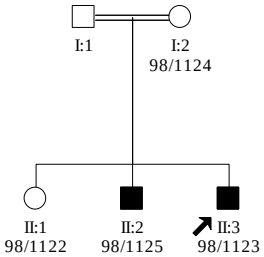
RP-0503



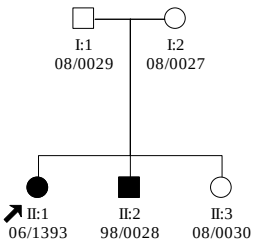
RP-0509



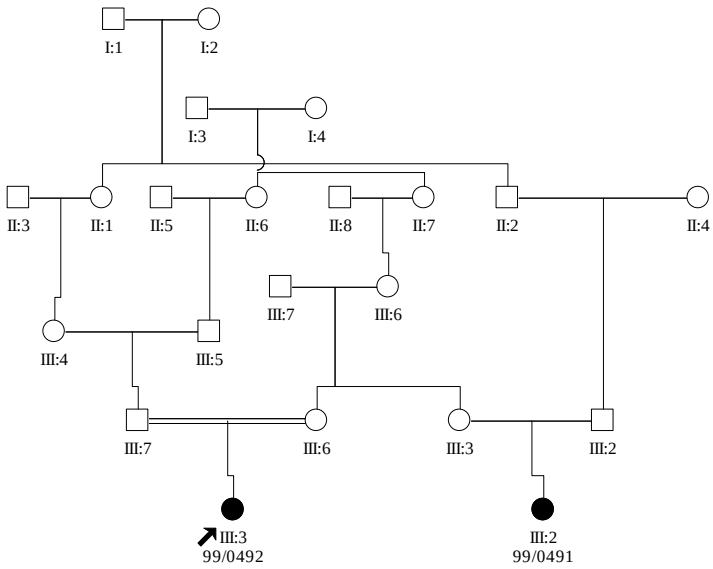
RP-0531



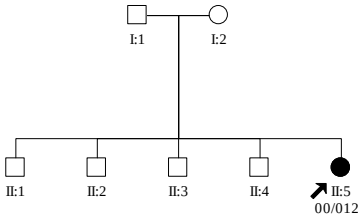
RP-0561



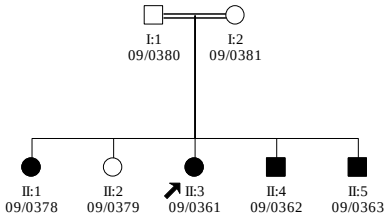
RP-0565



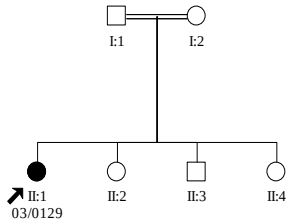
RP-0572



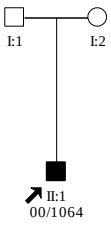
RP-0573



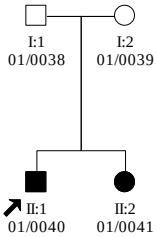
RP-0575



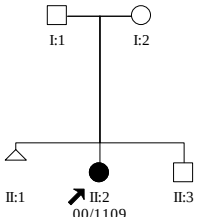
RP-0628



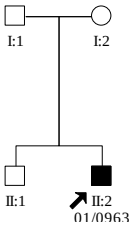
RP-0630



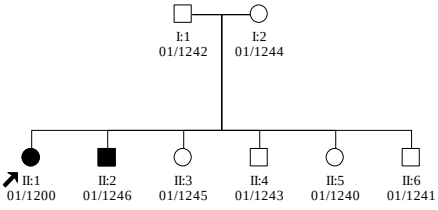
RP-0632



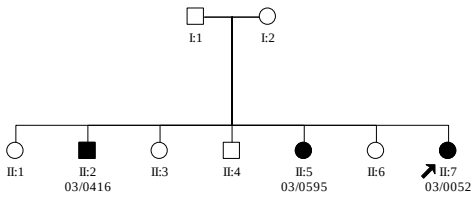
RP-0684

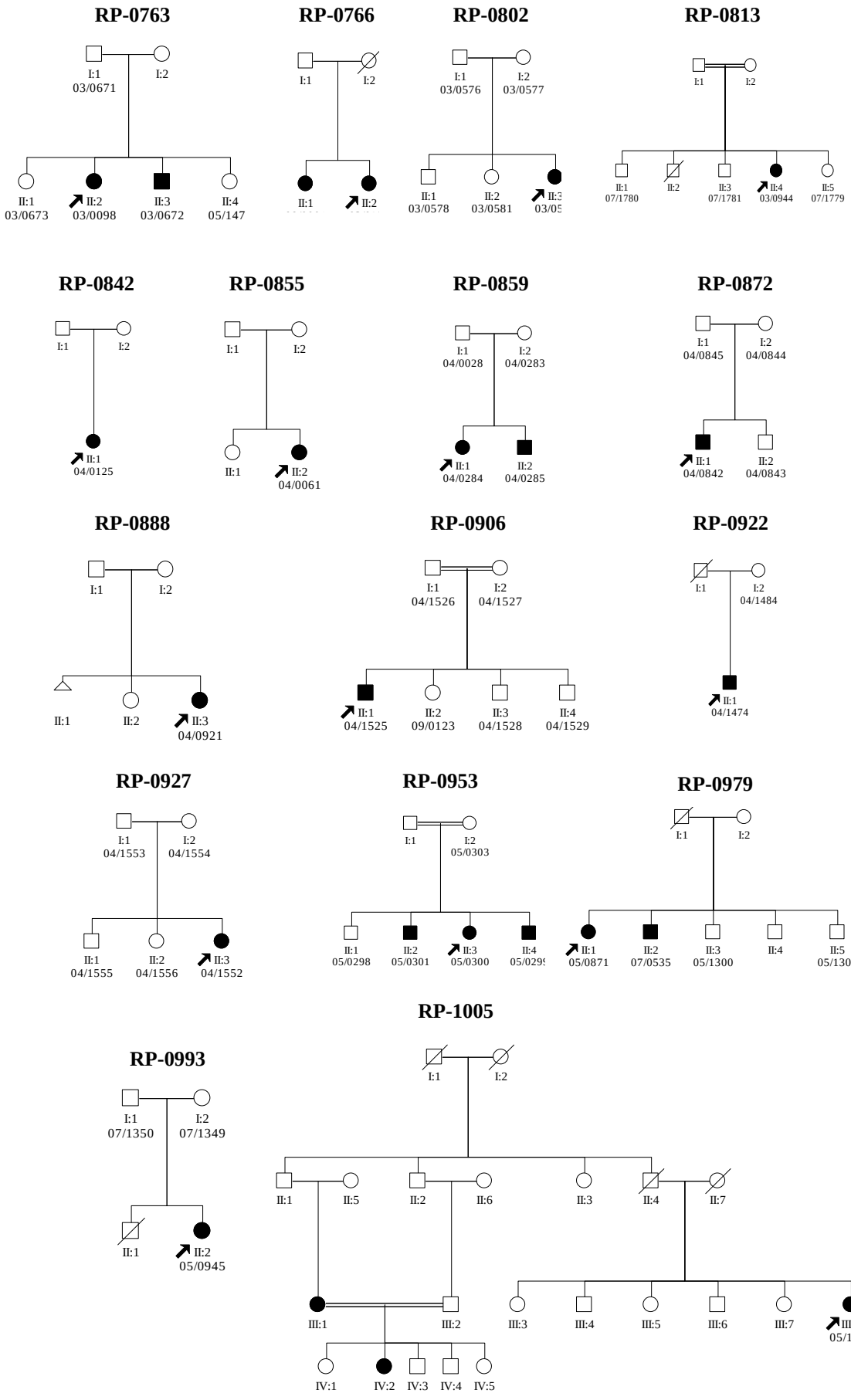


RP-0700

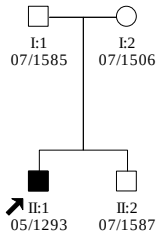


RP-0751

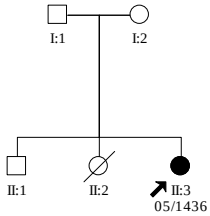



RP-0763
I:1
03/0671
I:2
II:1
03/0673
II:2
03/0098
II:3
03/0672
II:4
05/147
RP-0766
I:1
I:2
II:1
II:2
RP-0802
I:1
03/0576
I:2
03/0577
II:1
03/0578
II:2
03/0581
RP-0813
I:1
I:2
II:1
07/1780
II:2
II:3
07/1781
II:4
03/0944
II:5
07/1779
RP-0842
I:1
I:2
II:1
04/0125
RP-0855
I:1
I:2
II:1
II:2
04/0061
RP-0859
I:1
04/0028
I:2
04/0283
II:1
04/0284
II:2
04/0285
RP-0872
I:1
04/0845
I:2
04/0844
II:1
04/0842
II:2
04/0843
RP-0888
I:1
I:2
II:1
II:2
II:3
04/0921
RP-0906
I:1
04/1526
I:2
04/1527
II:1
04/1525
II:2
09/0123
II:3
04/1528
II:4
04/1529
RP-0922
I:1
I:2
04/1484
II:1
04/1474
RP-0927
I:1
04/1553
I:2
04/1554
II:1
04/1555
II:2
04/1556
II:3
04/1552
RP-0953
I:1
I:2
05/0303
II:1
05/0298
II:2
05/0301
II:3
05/0300
II:4
RP-0979
I:1
I:2
II:1
05/0871
II:2
07/0535
II:3
05/1300
II:4
II:5
05/1301
RP-1005
I:1
I:2
II:1
II:5
II:2
II:6
II:3
II:4
II:7
III:1
III:2
III:3
III:4
III:5
III:6
III:7
III:8
05/1061
IV:1
IV:2
IV:3
IV:4
IV:5
RP-0993
I:1
07/1350
I:2
07/1349
II:1
II:2
05/0945

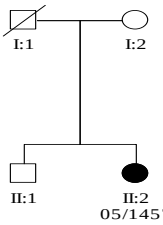
RP-1015



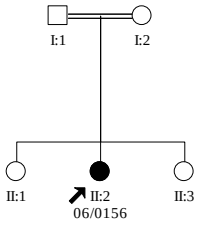
RP-1030



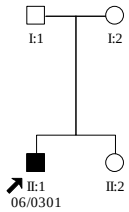
RP-1036



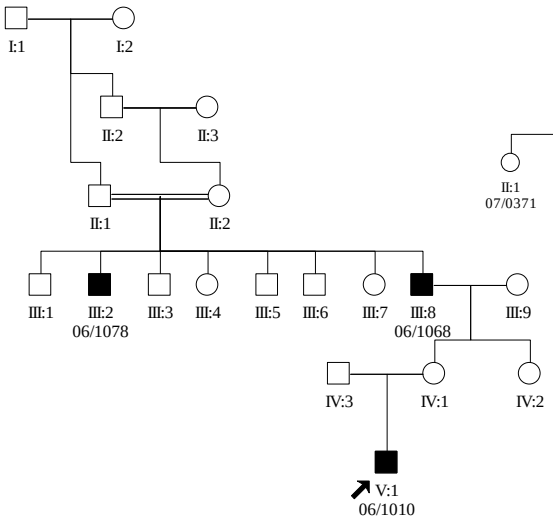
RP-1057



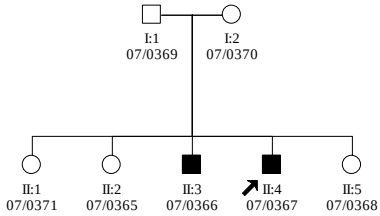
RP-1061



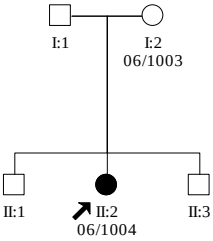
RP-1073



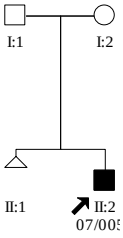
RP-1102



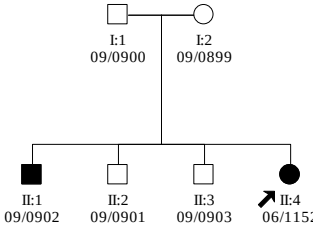
RP-1107



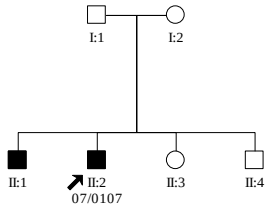
RP-1110



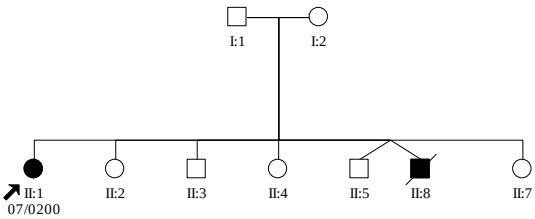
RP-1115



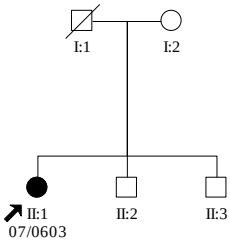
RP-1126



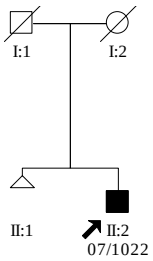
RP-1154



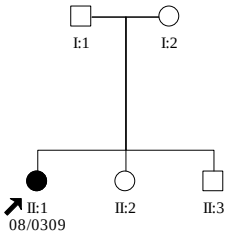
RP-1167



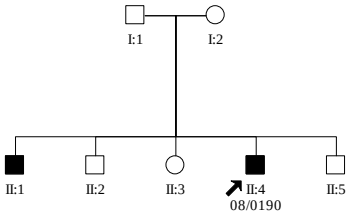
RP-1206



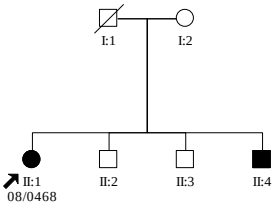
RP-1254



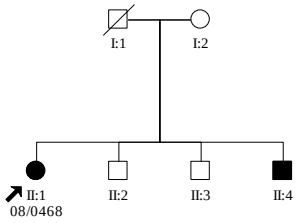
RP-1262



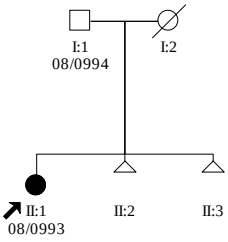
RP-1275



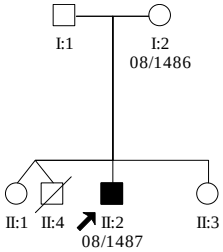
RP-1275



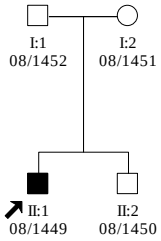
RP-1311



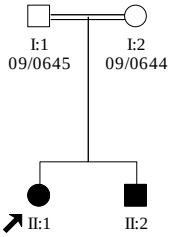
RP-1338



RP-1339

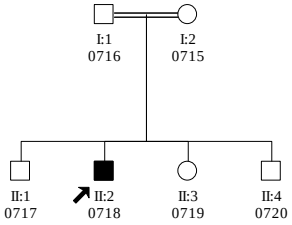


RP-1411

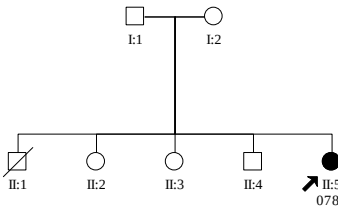


186 familias RP Típica

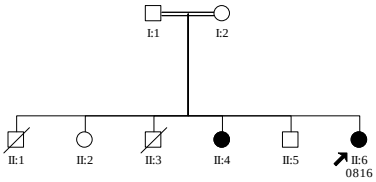
RP-0002



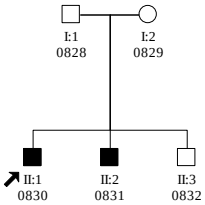
RP-0008



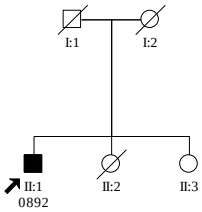
RP-0010



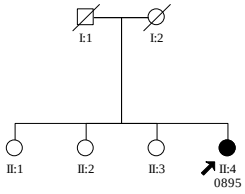
RP-0012



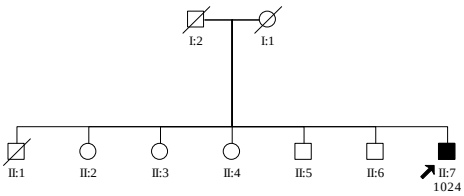
RP-0013



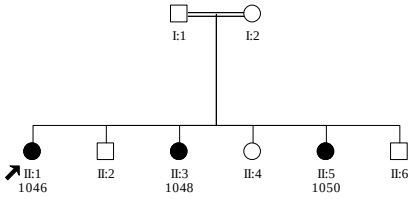
RP-0014



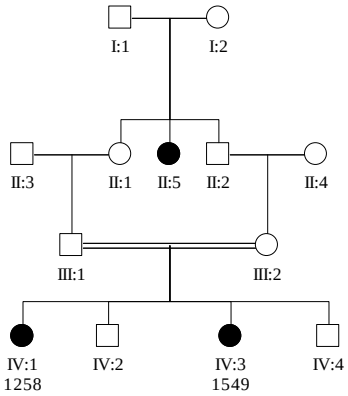
RP-0018



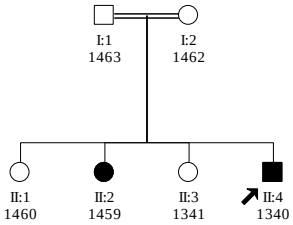
RP-0024



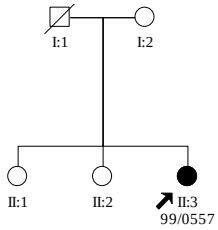
RP-0035



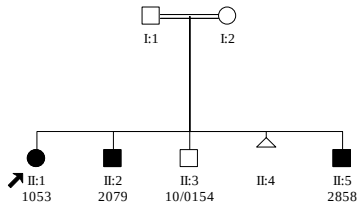
RP-0042



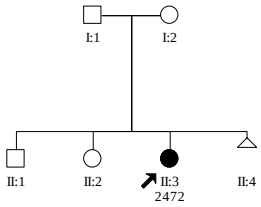
RP-0048



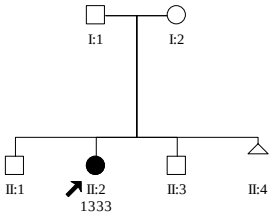
RP-0055



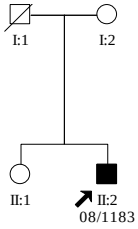
RP-0058



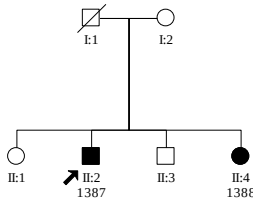
RP-0087



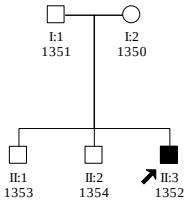
RP-0088



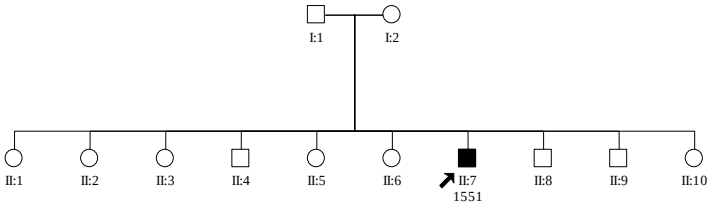
RP-0094



RP-0125

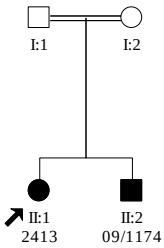


RP-0134

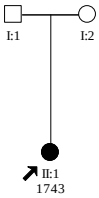


RP-0154

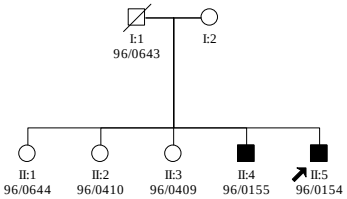
RP-0159



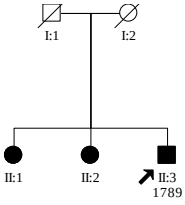
RP-0183



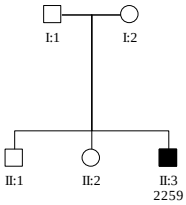
RP-184-6



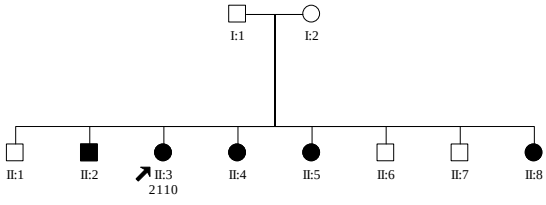
RP-0199



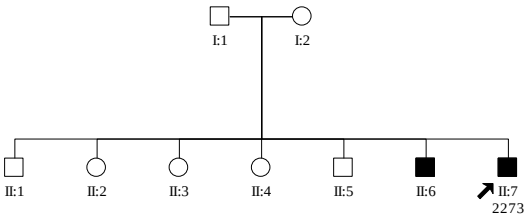
RP-0204



RP-0205

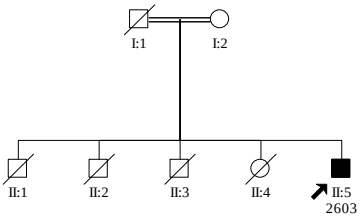


RP-0208

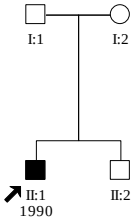


RP-0211

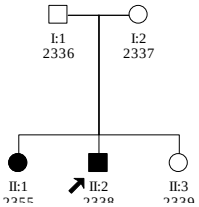
RP-0218



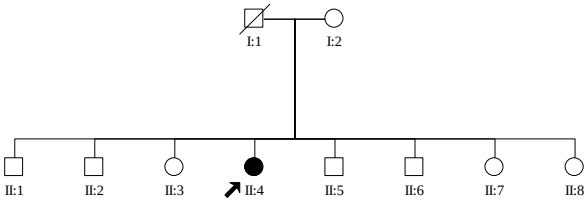
RP-0228



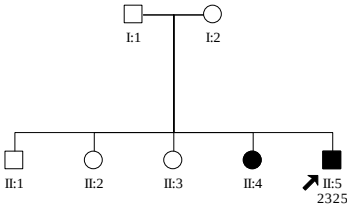
RP-0231



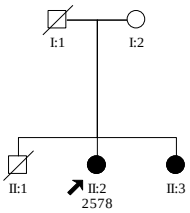
RP-0241



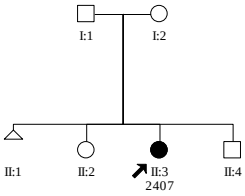
RP-0246



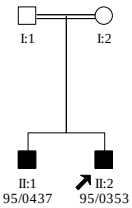
RP-0254



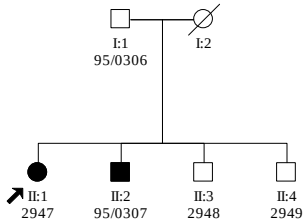
RP-0260



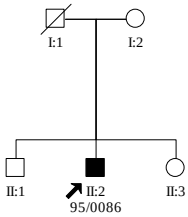
RP-0268



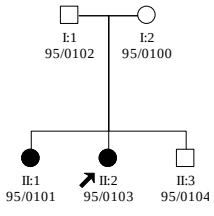
RP-0289



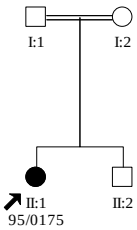
RP-0297



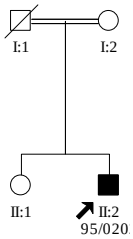
RP-0298



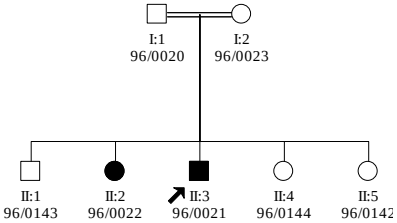
RP-0306



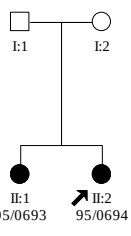
RP-0311



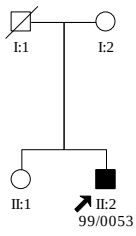
RP-0320



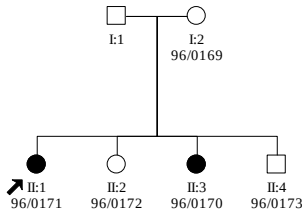
RP-0322



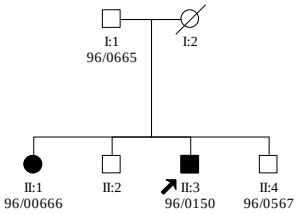
RP-0325



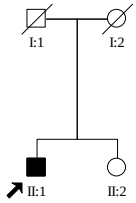
RP-0332



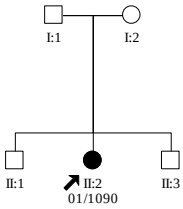
RP-0338



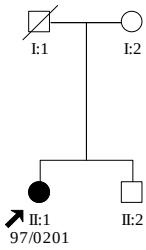
RP-0334



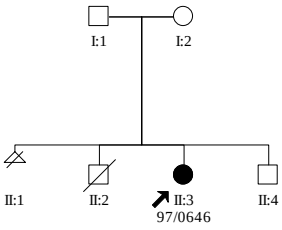
RP-0356



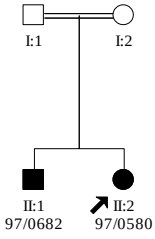
RP-0384



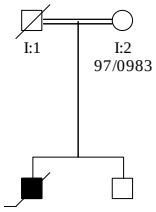
RP-0398



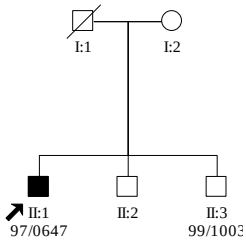
RP-0399



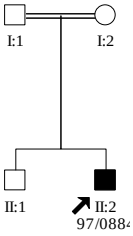
RP-0404



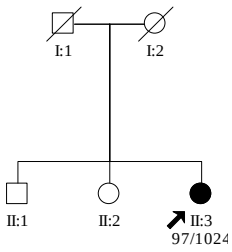
RP-0407



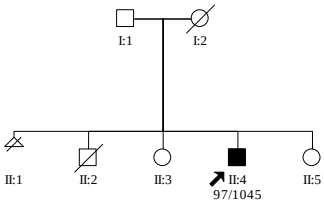
RP-0417



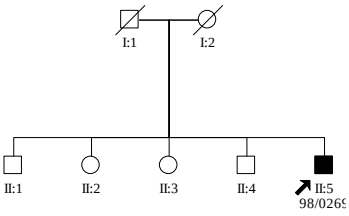
RP-0421



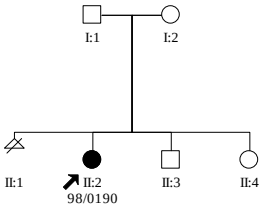
RP-0423



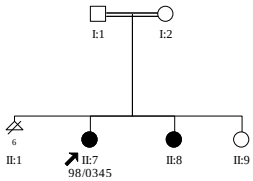
RP-0450



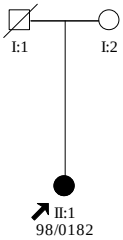
RP-0451



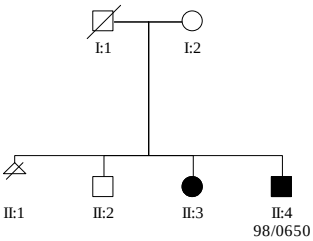
RP-0452



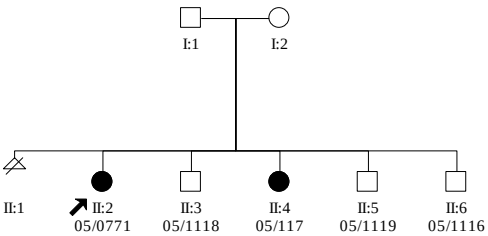
RP-0453

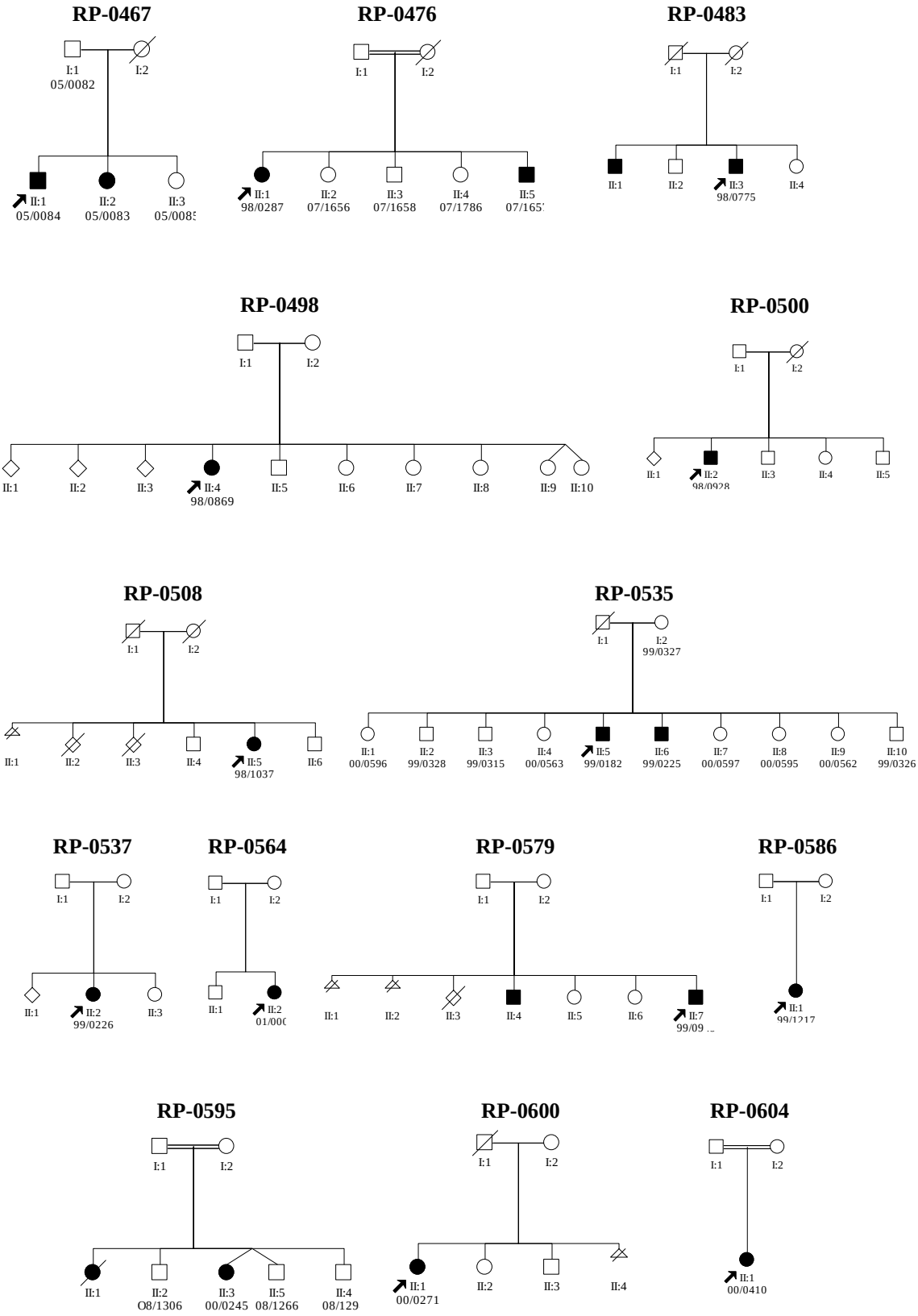


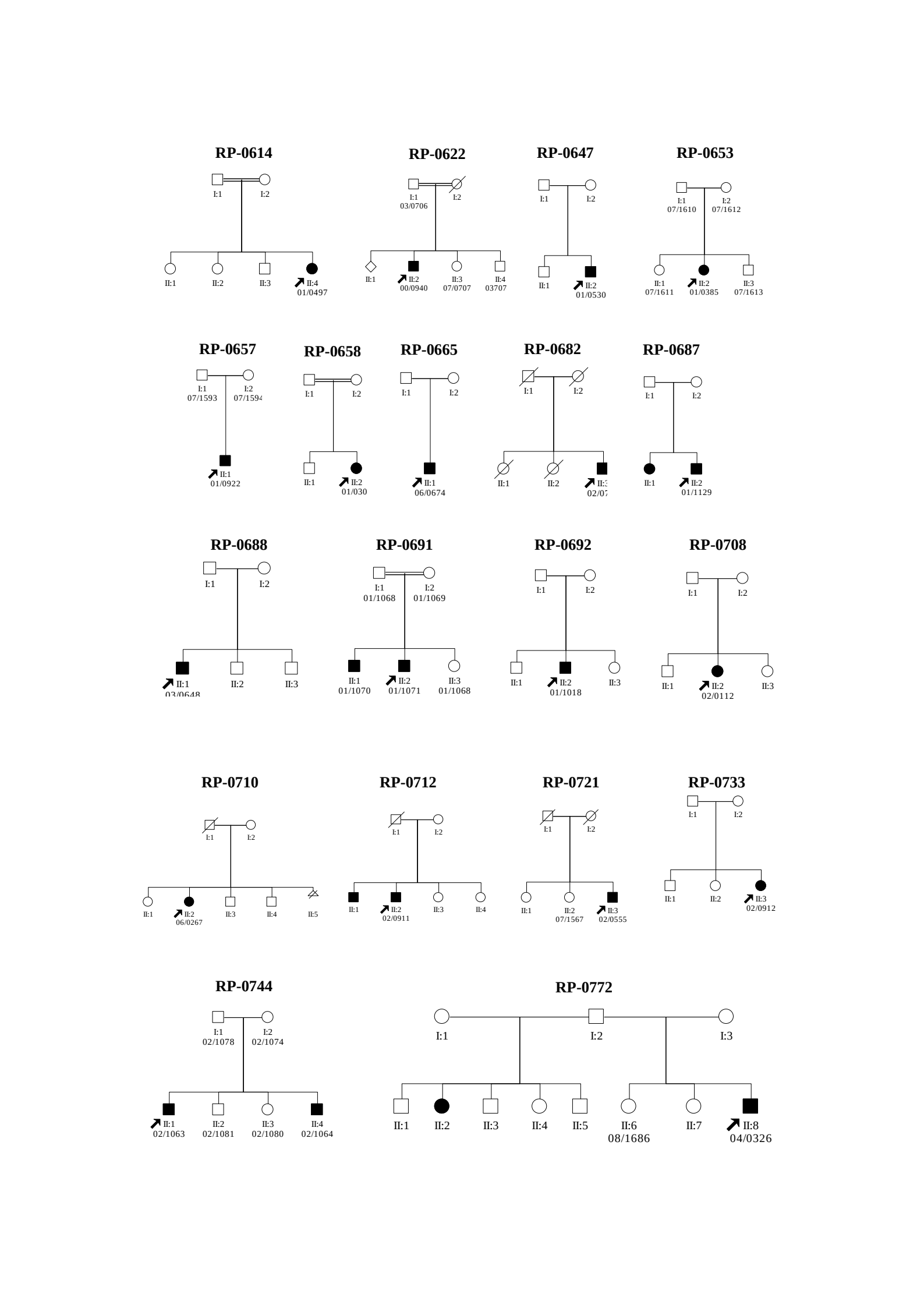
RP-0456

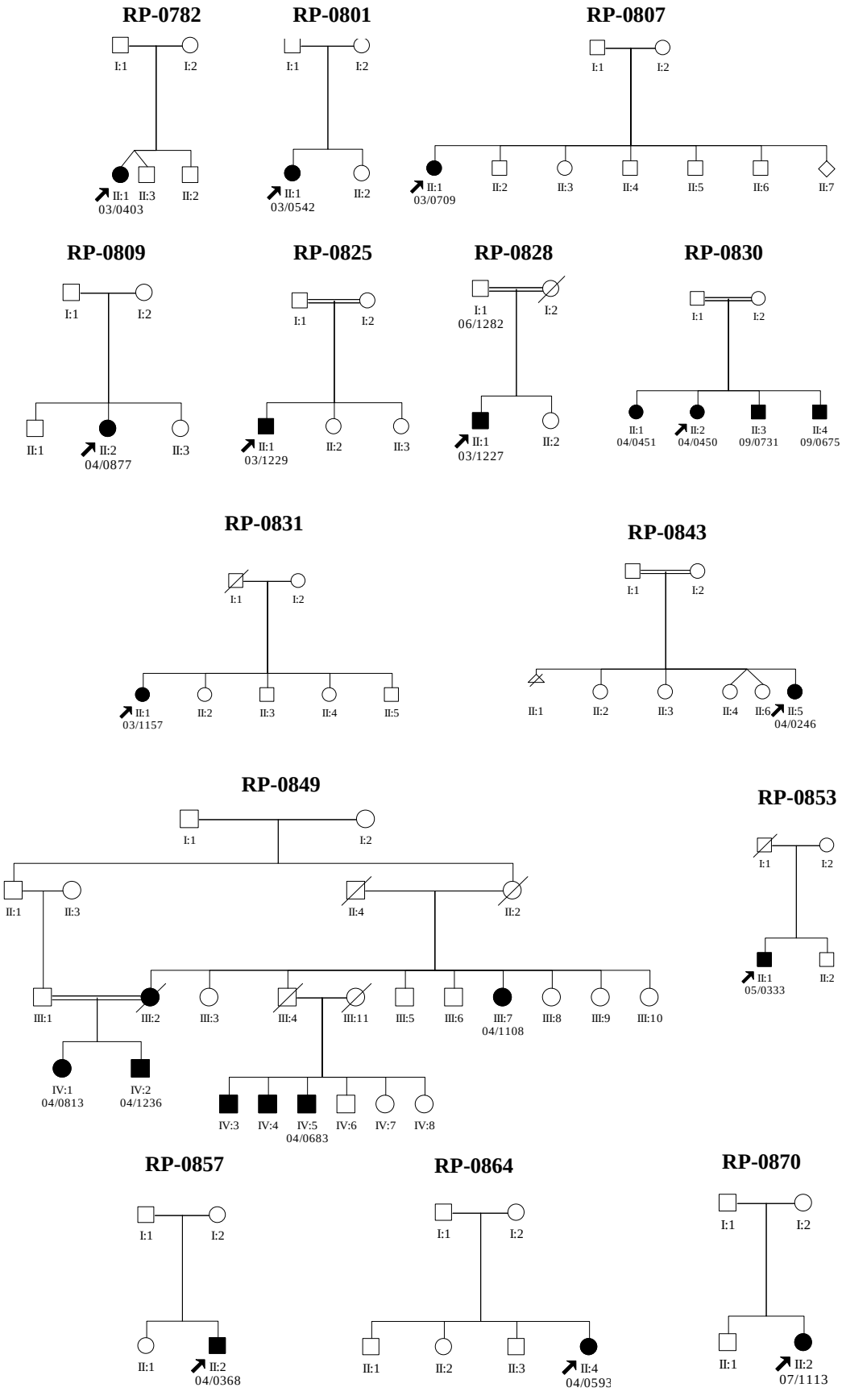


RP-0461

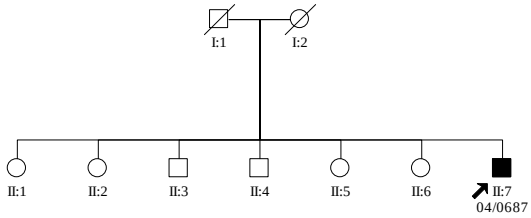



RP-0467
I:1
05/0082
I:2
II:1
05/0084
II:2
05/0083
II:3
05/0085
RP-0476
I:1
I:2
II:1
98/0287
II:2
07/1656
II:3
07/1658
II:4
07/1786
II:5
07/1657
RP-0483
I:1
I:2
II:1
II:2
II:3
98/0775
II:4
RP-0498
I:1
I:2
II:1
II:2
II:3
II:4
98/0869
II:5
II:6
II:7
II:8
II:9
II:10
RP-0500
I:1
I:2
II:1
II:2
98/0928
II:3
II:4
II:5
RP-0508
I:1
I:2
II:1
II:2
II:3
II:4
II:5
98/1037
II:6
RP-0535
I:1
I:2
99/0327
II:1
00/0596
II:2
99/0328
II:3
99/0315
II:4
00/0563
II:5
99/0182
II:6
99/0225
II:7
00/0597
II:8
00/0595
II:9
00/0562
II:10
99/0326
RP-0537
I:1
I:2
II:1
II:2
99/0226
II:3
RP-0564
I:1
I:2
II:1
II:2
01/000
RP-0579
I:1
I:2
II:1
II:2
II:3
II:4
II:5
II:6
II:7
99/09
RP-0586
I:1
I:2
II:1
99/1217
RP-0595
I:1
I:2
II:1
II:2
08/1306
II:3
00/0245
II:5
08/1266
II:4
08/129
RP-0600
I:1
I:2
II:1
00/0271
II:2
II:3
II:4
RP-0604
I:1
I:2
II:1
00/0410

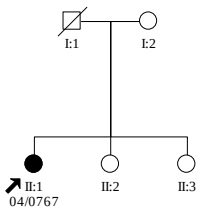

RP-0614
I:1
I:2
II:1
II:2
II:3
II:4
01/0497
RP-0622
I:1
03/0706
I:2
II:1
II:2
00/0940
II:3
07/0707
II:4
03707
RP-0647
I:1
I:2
II:1
II:2
01/0530
RP-0653
I:1
07/1610
I:2
07/1612
II:1
07/1611
II:2
01/0385
II:3
07/1613
RP-0657
I:1
07/1593
I:2
07/1594
II:1
01/0922
RP-0658
I:1
I:2
II:1
II:2
01/030
RP-0665
I:1
I:2
II:1
06/0674
RP-0682
I:1
I:2
II:1
II:2
02/07
RP-0687
I:1
I:2
II:1
II:2
01/1129
RP-0688
I:1
I:2
II:1
03/0648
II:2
II:3
RP-0691
I:1
01/1068
I:2
01/1069
II:1
01/1070
II:2
01/1071
II:3
01/1068
RP-0692
I:1
I:2
II:1
II:2
01/1018
II:3
RP-0708
I:1
I:2
II:1
II:2
02/0112
II:3
RP-0710
I:1
I:2
II:1
II:2
06/0267
II:3
II:4
II:5
RP-0712
I:1
I:2
II:1
II:2
02/0911
II:3
II:4
RP-0721
I:1
I:2
II:1
II:2
07/1567
II:3
02/0555
RP-0733
I:1
I:2
II:1
II:2
II:3
02/0912
RP-0744
I:1
02/1078
I:2
02/1074
II:1
02/1063
II:2
02/1081
II:3
02/1080
II:4
02/1064
RP-0772
I:1
I:2
I:3
II:1
II:2
II:3
II:4
II:5
II:6
08/1686
II:7
II:8
04/0326


RP-0782
I:1
I:2
II:1
03/0403
II:3
II:2
RP-0801
I:1
I:2
II:1
03/0542
II:2
RP-0807
I:1
I:2
II:1
03/0709
II:2
II:3
II:4
II:5
II:6
II:7
RP-0809
I:1
I:2
II:1
II:2
04/0877
II:3
RP-0825
I:1
I:2
II:1
03/1229
II:2
II:3
RP-0828
I:1
06/1282
I:2
II:1
03/1227
II:2
RP-0830
I:1
I:2
II:1
04/0451
II:2
04/0450
II:3
09/0731
II:4
09/0675
RP-0831
I:1
I:2
II:1
03/1157
II:2
II:3
II:4
II:5
RP-0843
I:1
I:2
II:1
II:2
II:3
II:4
II:6
II:5
04/0246
RP-0849
I:1
I:2
II:1
II:3
II:4
II:2
III:1
III:2
III:3
III:4
III:11
III:5
III:6
III:7
04/1108
III:8
III:9
III:10
IV:1
04/0813
IV:2
04/1236
IV:3
IV:4
IV:5
04/0683
IV:6
IV:7
IV:8
RP-0853
I:1
I:2
II:1
05/0333
II:2
RP-0857
I:1
I:2
II:1
II:2
04/0368
RP-0864
I:1
I:2
II:1
II:2
II:3
II:4
04/0593
RP-0870
I:1
I:2
II:1
II:2
07/1113

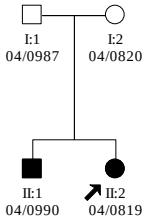
RP-0881



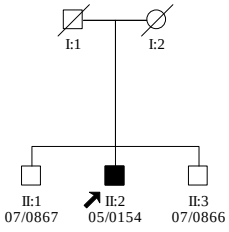
RP-0885



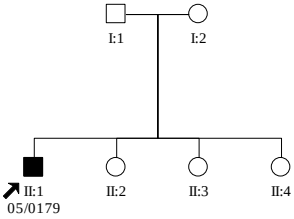
RP-0897



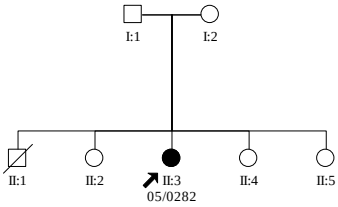
RP-0930



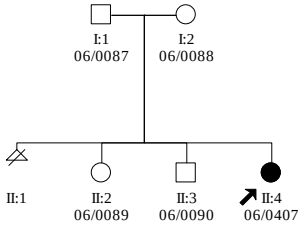
RP-0931



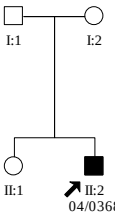
RP-0950



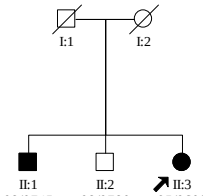
RP-0955



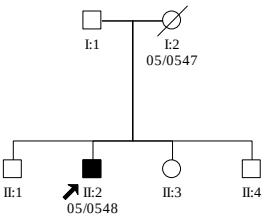
RP-0957



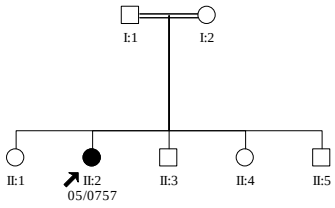
RP-0966



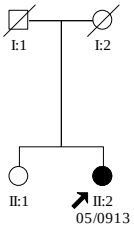
RP-0971



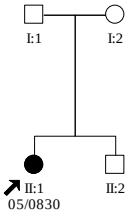
RP-0985



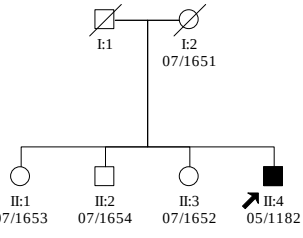
RP-0988



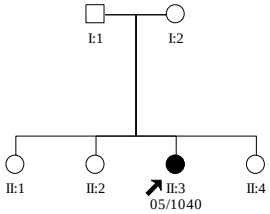
RP-0991



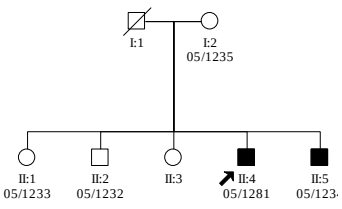
RP-1000



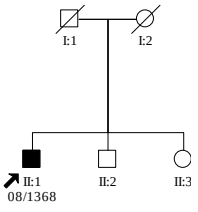
RP-1004



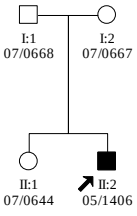
RP-1016

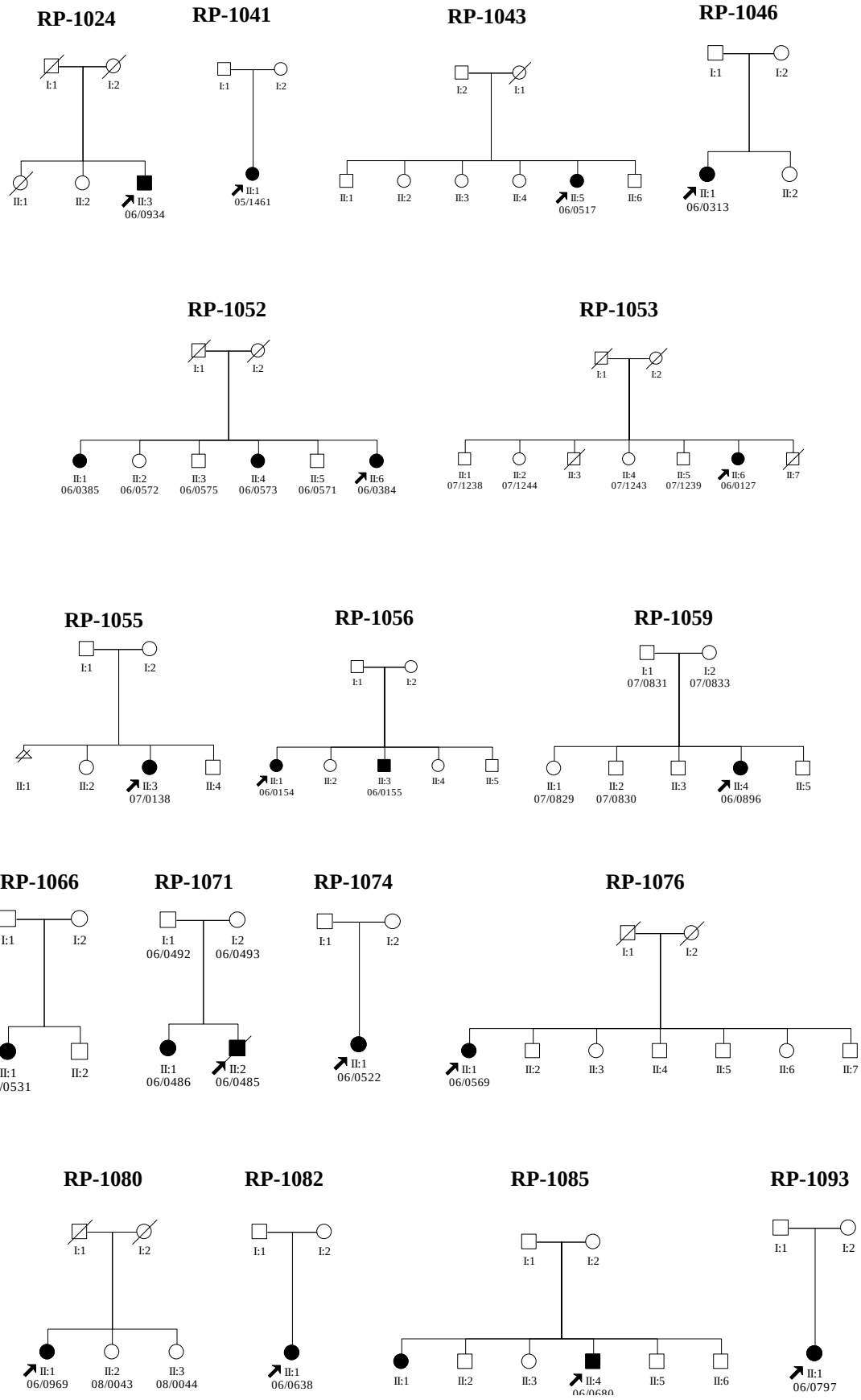


RP-1018

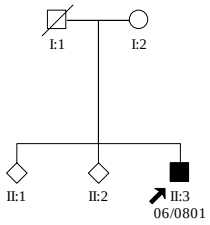


RP-1023

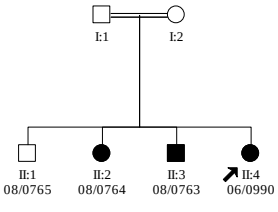



RP-1024
I:1
I:2
II:1
II:2
II:3
06/0934
RP-1041
I:1
I:2
II:1
05/1461
RP-1043
I:2
I:1
II:1
II:2
II:3
II:4
II:5
06/0517
II:6
RP-1046
I:1
I:2
II:1
06/0313
II:2
RP-1052
I:1
I:2
II:1
06/0385
II:2
06/0572
II:3
06/0575
II:4
06/0573
II:5
06/0571
II:6
06/0384
RP-1053
I:1
I:2
II:1
07/1238
II:2
07/1244
II:3
II:4
07/1243
II:5
07/1239
II:6
06/0127
II:7
RP-1055
I:1
I:2
II:1
II:2
II:3
07/0138
II:4
RP-1056
I:1
I:2
II:1
06/0154
II:2
II:3
06/0155
II:4
II:5
RP-1059
I:1
07/0831
I:2
07/0833
II:1
07/0829
II:2
07/0830
II:3
II:4
06/0896
II:5
RP-1066
I:1
I:2
II:1
06/0531
II:2
RP-1071
I:1
06/0492
I:2
06/0493
II:1
06/0486
II:2
06/0485
RP-1074
I:1
I:2
II:1
06/0522
RP-1076
I:1
I:2
II:1
06/0569
II:2
II:3
II:4
II:5
II:6
II:7
RP-1080
I:1
I:2
II:1
06/0969
II:2
08/0043
II:3
08/0044
RP-1082
I:1
I:2
II:1
06/0638
RP-1085
I:1
I:2
II:1
II:2
II:3
II:4
II:5
II:6
RP-1093
I:1
I:2
II:1
06/0797

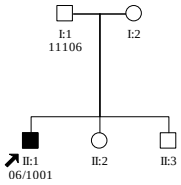
RP-1096



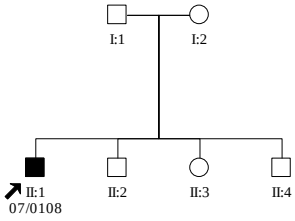
RP-1105



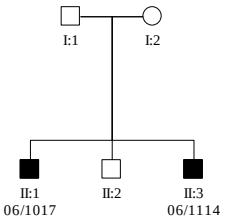
RP-1106



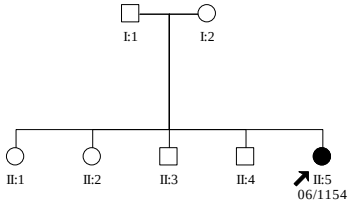
RP-1108



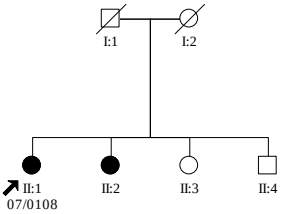
RP-1109



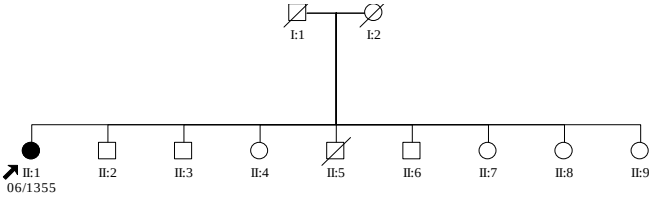
RP-1119



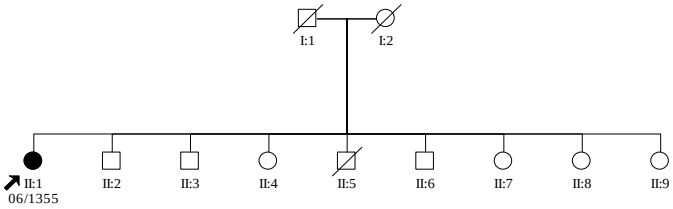
RP-1131



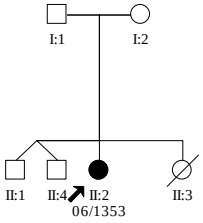
RP-1135



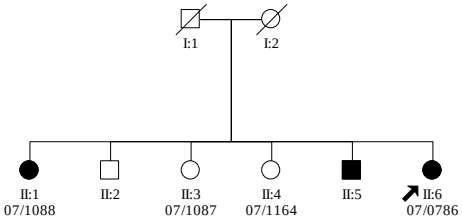
RP-1135



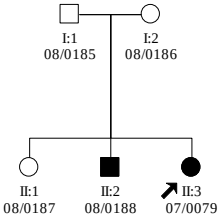
RP-1138



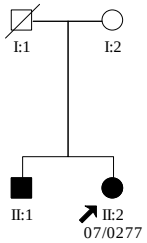
RP-1142



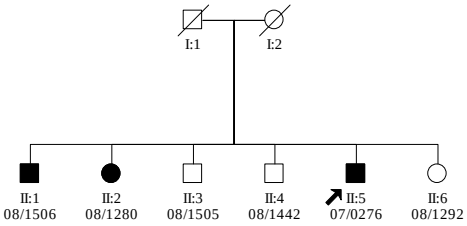
RP-1147



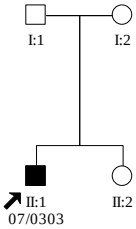
RP-1156



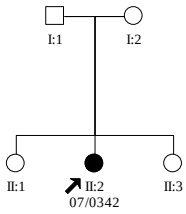
RP-1159



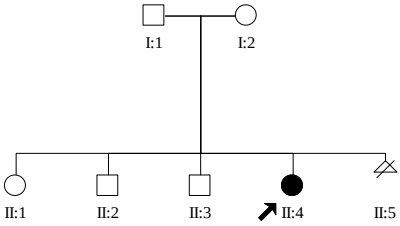
RP-1160



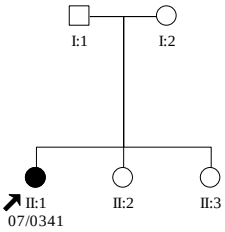
RP-1161



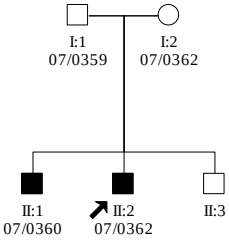
RP-1162



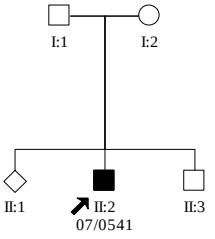
RP-1163



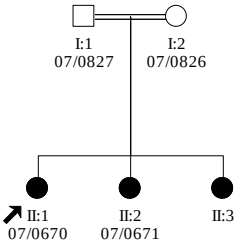
RP-1164



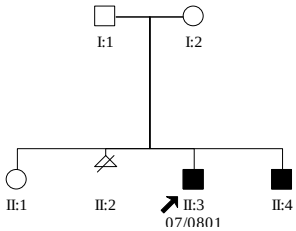
RP-1186



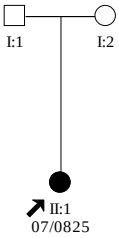
RP-1190



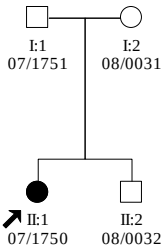
RP-1201



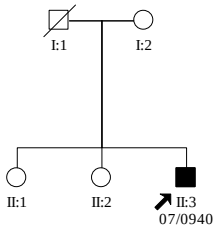
RP-1202



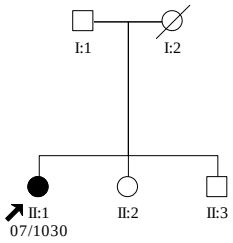
RP-1207



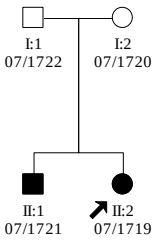
RP-1208



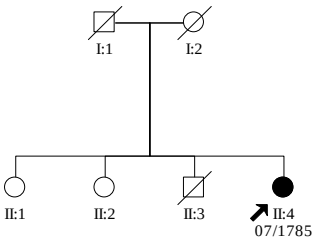
RP-1216



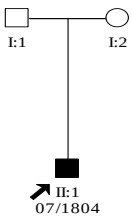
RP-1237



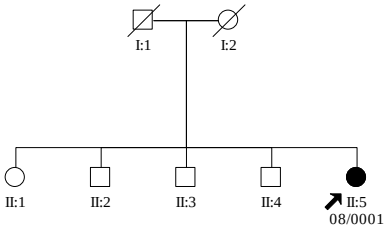
RP-1240



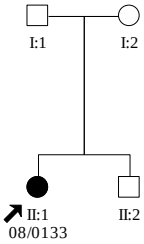
RP-1241



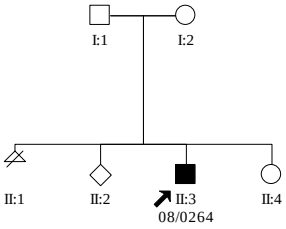
RP-1244



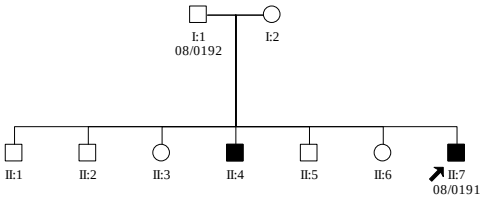
RP-1253



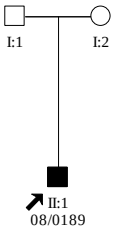
RP-1256



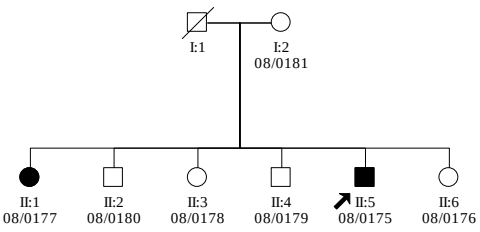
RP-1260



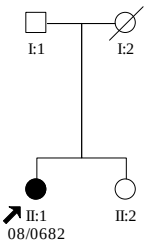
RP-1261



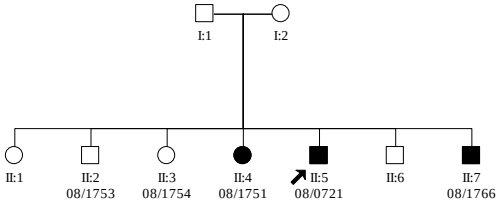
RP-1263



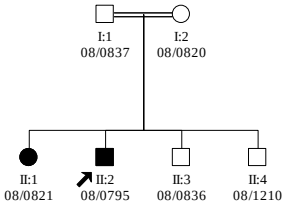
RP-1280



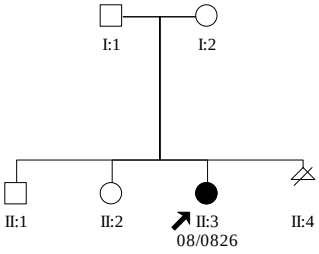
RP-1292



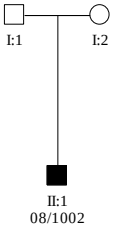
RP-1296



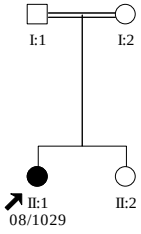
RP-1299



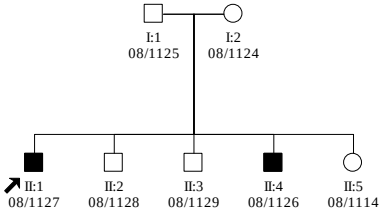
RP-1305



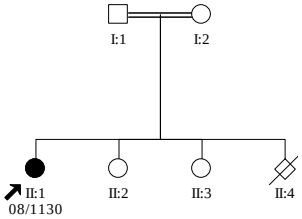
RP-1307



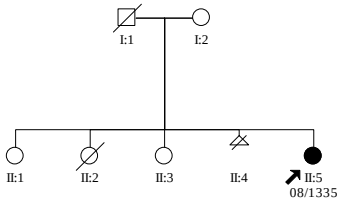
RP-1315



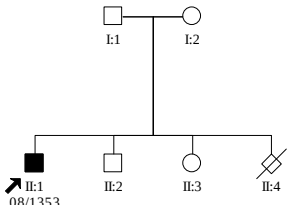
RP-1316



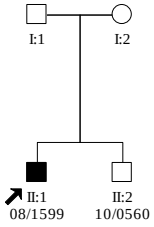
RP-1331



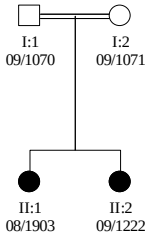
RP-1333



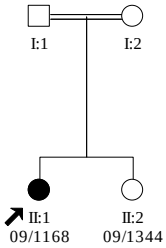
RP-1345



RP-1374



RP-1451



ANEXO V
Regiones de ligamiento

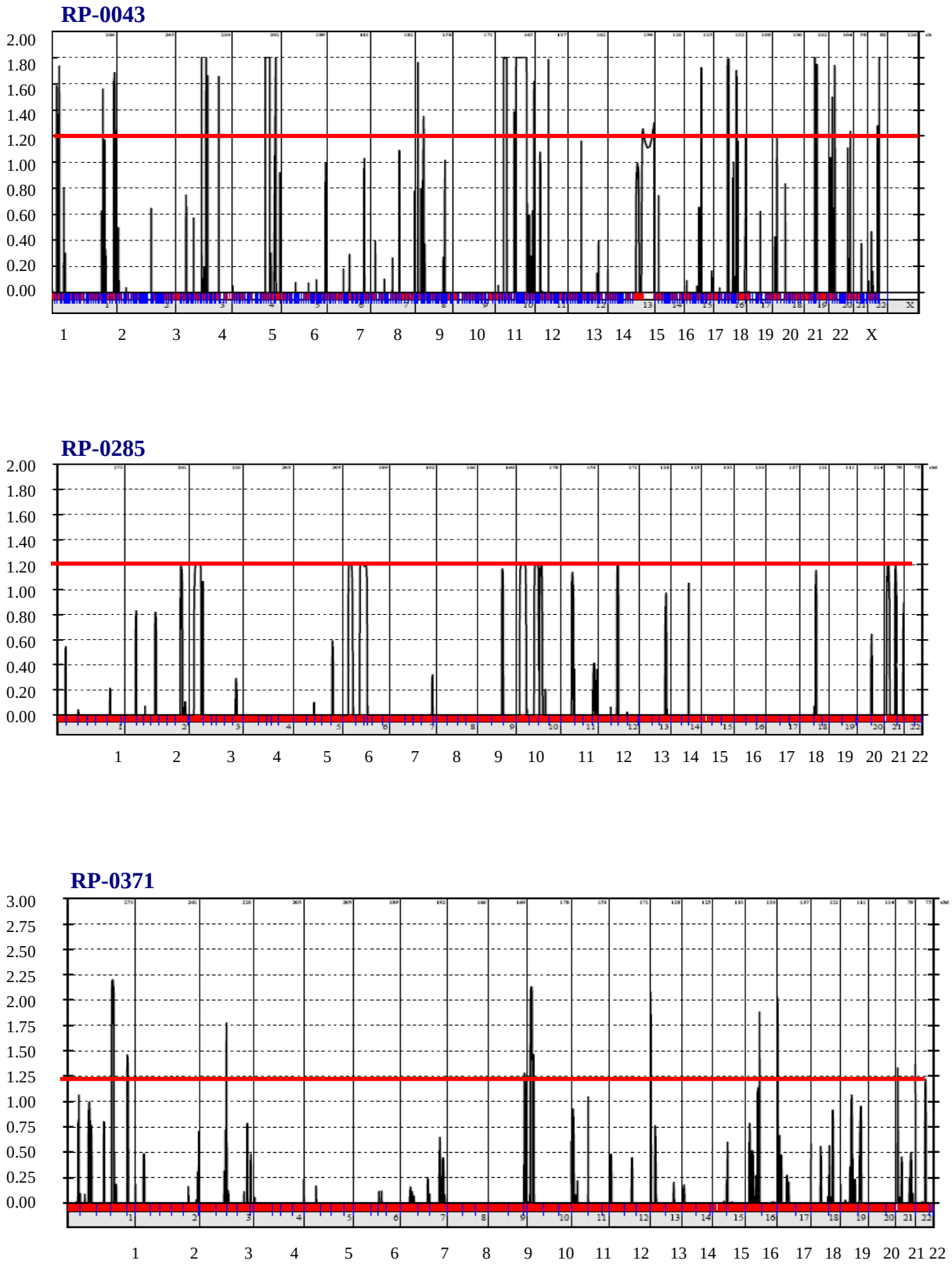
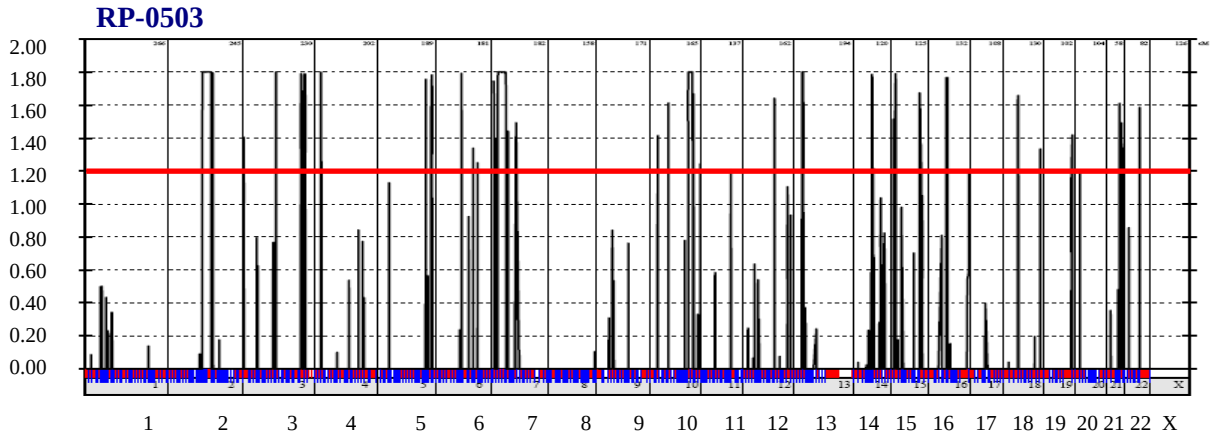
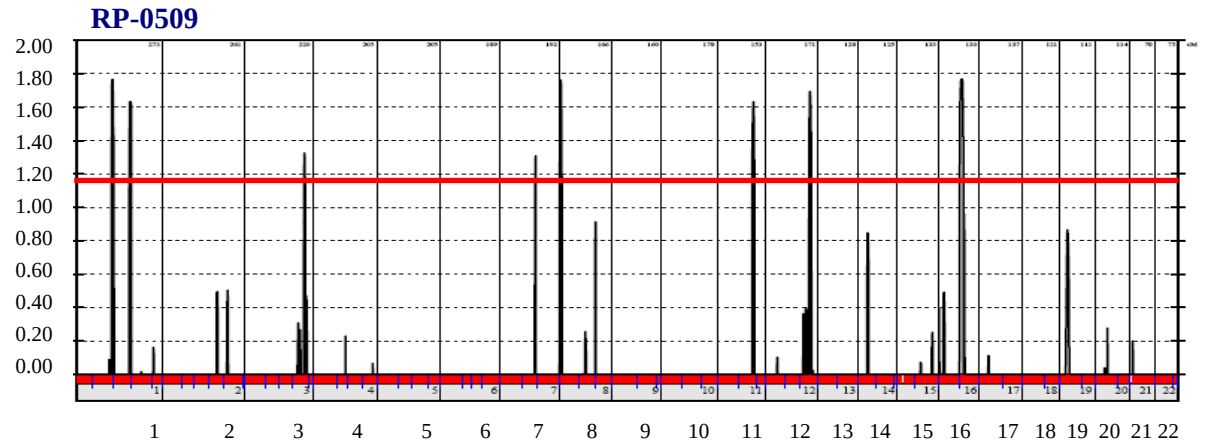


Figura 1. Regiones de ligamiento para las familias RP-0043, RP-0285 y RP-0371 obtenidas con el programa *EasyLinkage Plus v5.08*. Se representan los cromosomas (eje de abcisas) frente al *LOD-Score* (eje de ordenadas). La línea roja indica el *LOD-Score* considerado como significativo según los individuos analizados y la estructura familiar.





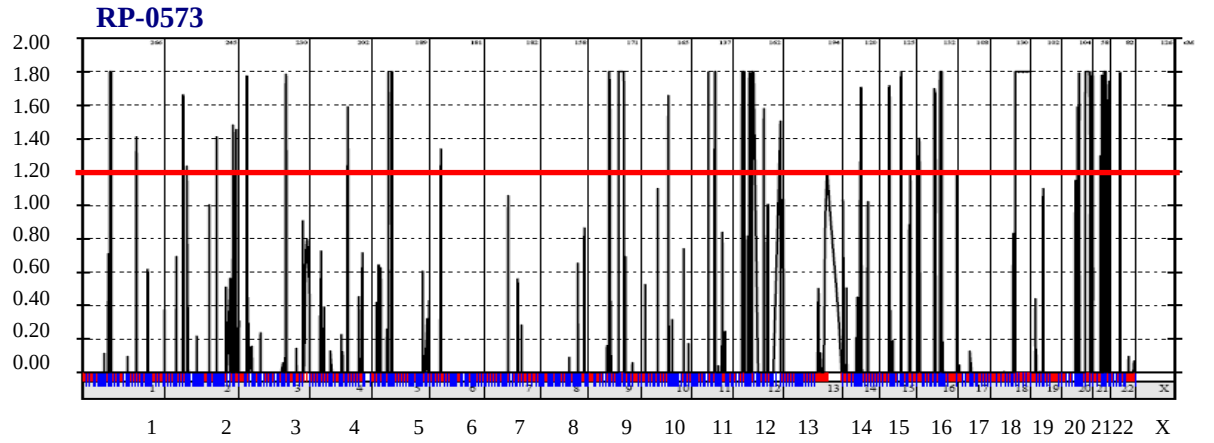
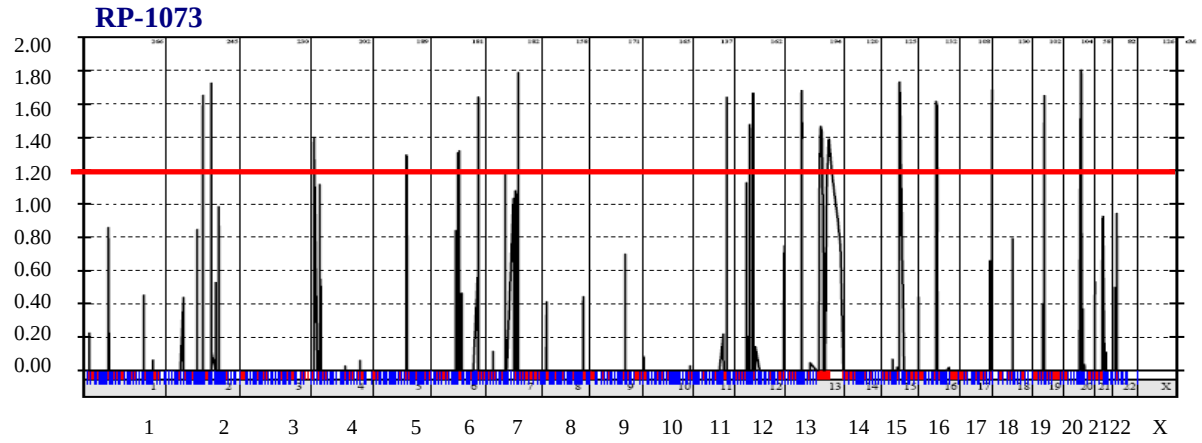
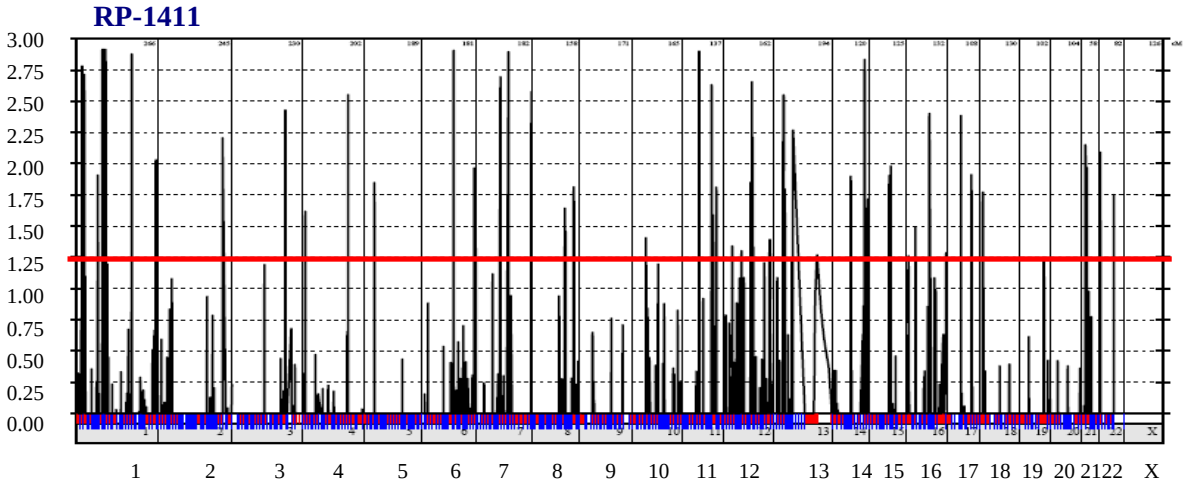


Figura 2. Regiones de ligamiento para las familias RP-0503, RP-0509 y RP-0573 obtenidas con el programa *EasyLinkage Plus v5.08*. Se representan los cromosomas (eje de abcisas) frente al *LOD-Score* (eje de ordenadas). La línea roja indica el *LOD-Score* considerado como significativo según los individuos analizados y la estructura familiar





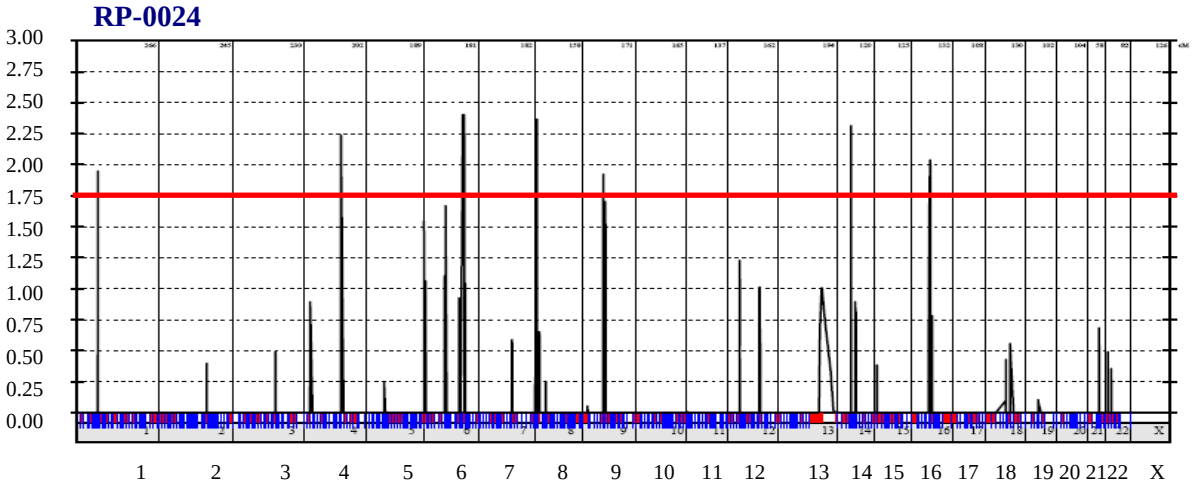


Figura 3. Regiones de ligamiento para las familias RP-1073, RP-1411 y RP-0024 obtenidas con el programa *EasyLinkage Plus v5.08*. Se representan los cromosomas (eje de abcisas) frente al *LOD-Score* (eje de ordenadas). La línea roja indica el *LOD-Score* considerado como significativo según los individuos analizados y la estructura familiar.

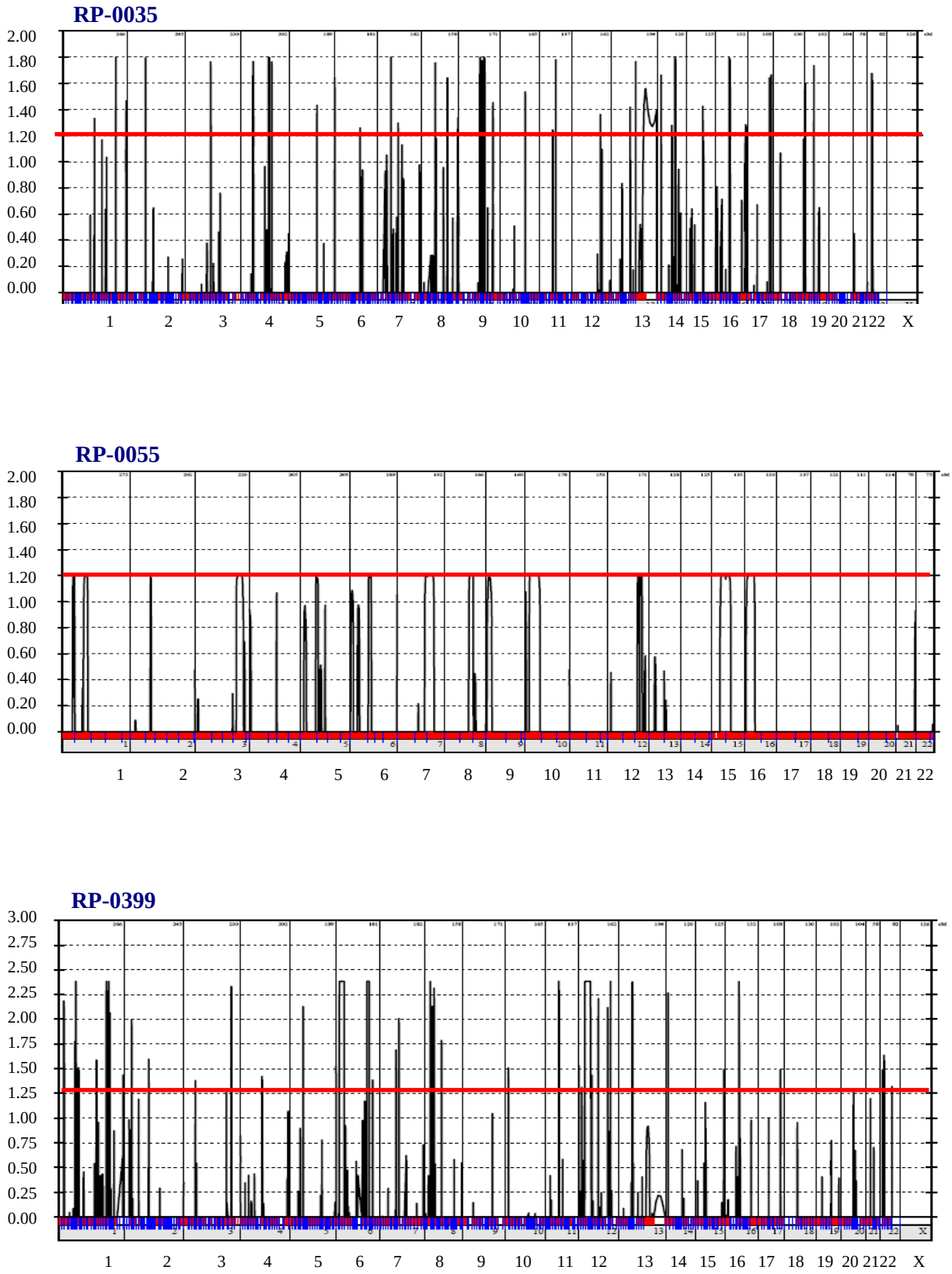
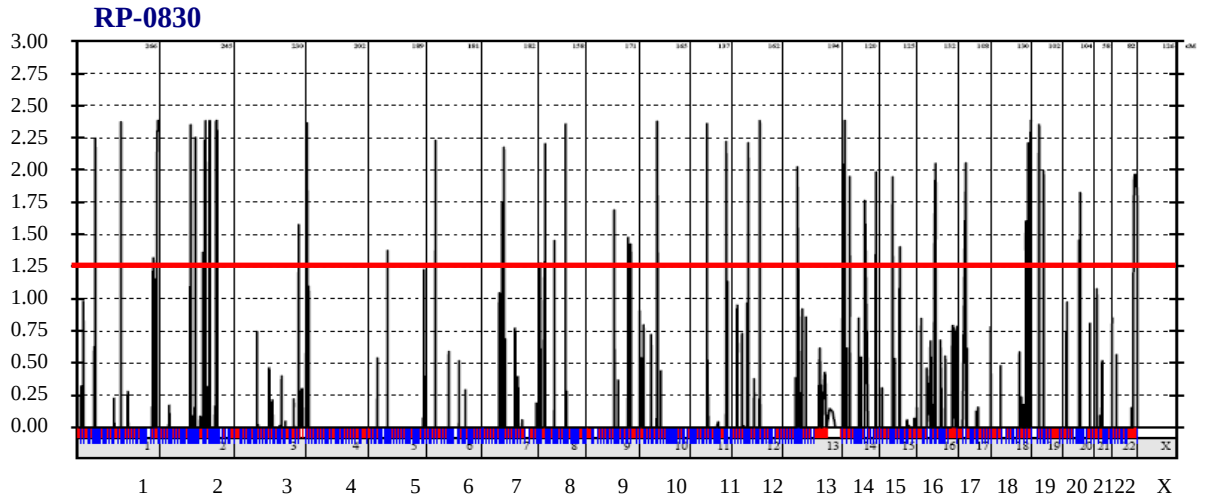
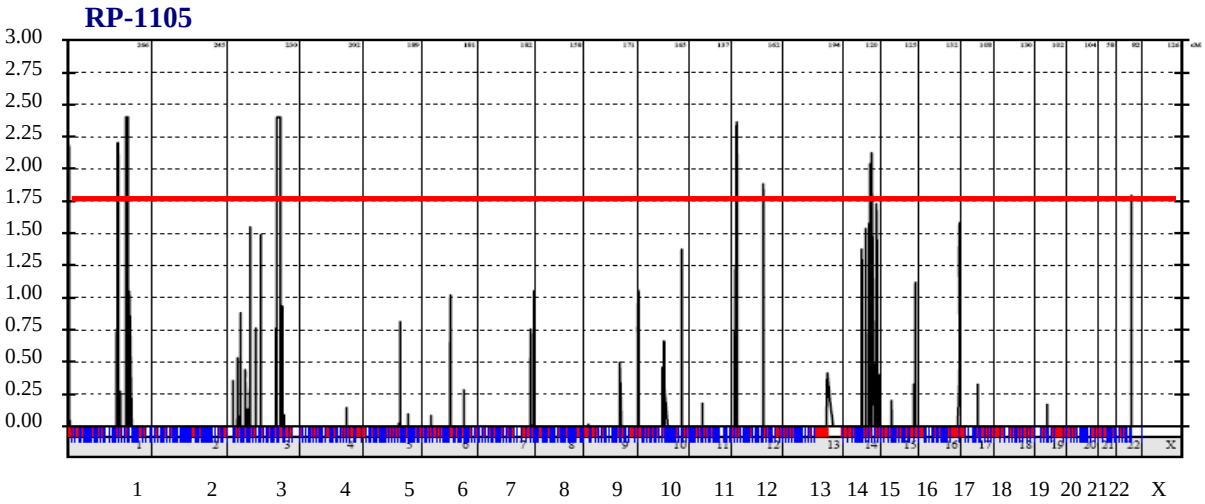


Figura 4. Regiones de ligamiento para las familias RP-0035, RP-0055 y RP-0399 obtenidas con el programa *EasyLinkage Plus v5.08*. Se representan los cromosomas (eje de abcisas) frente al *LOD-Score* (eje de ordenadas). La línea roja indica el *LOD-Score* considerado como significativo según los individuos analizados y la estructura familiar





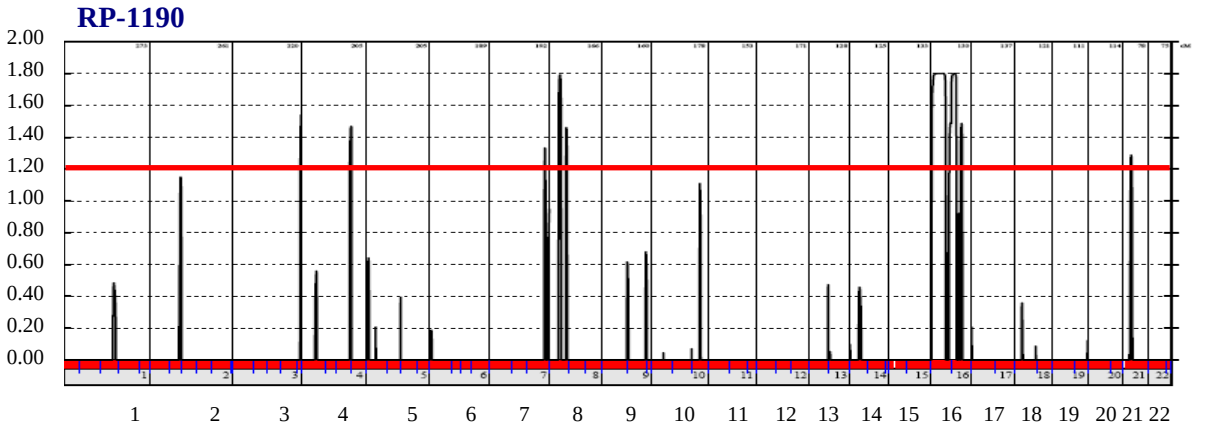


Figura 5. Regiones de ligamiento para las familias RP-0830, RP-1105 y RP-1190 obtenidas con el programa *EasyLinkage Plus v5.08*. Se representan los cromosomas (eje de abcisas) frente al *LOD-Score* (eje de ordenadas). La línea roja indica el *LOD-Score* considerado como significativo según los individuos analizados y la estructura familiar.

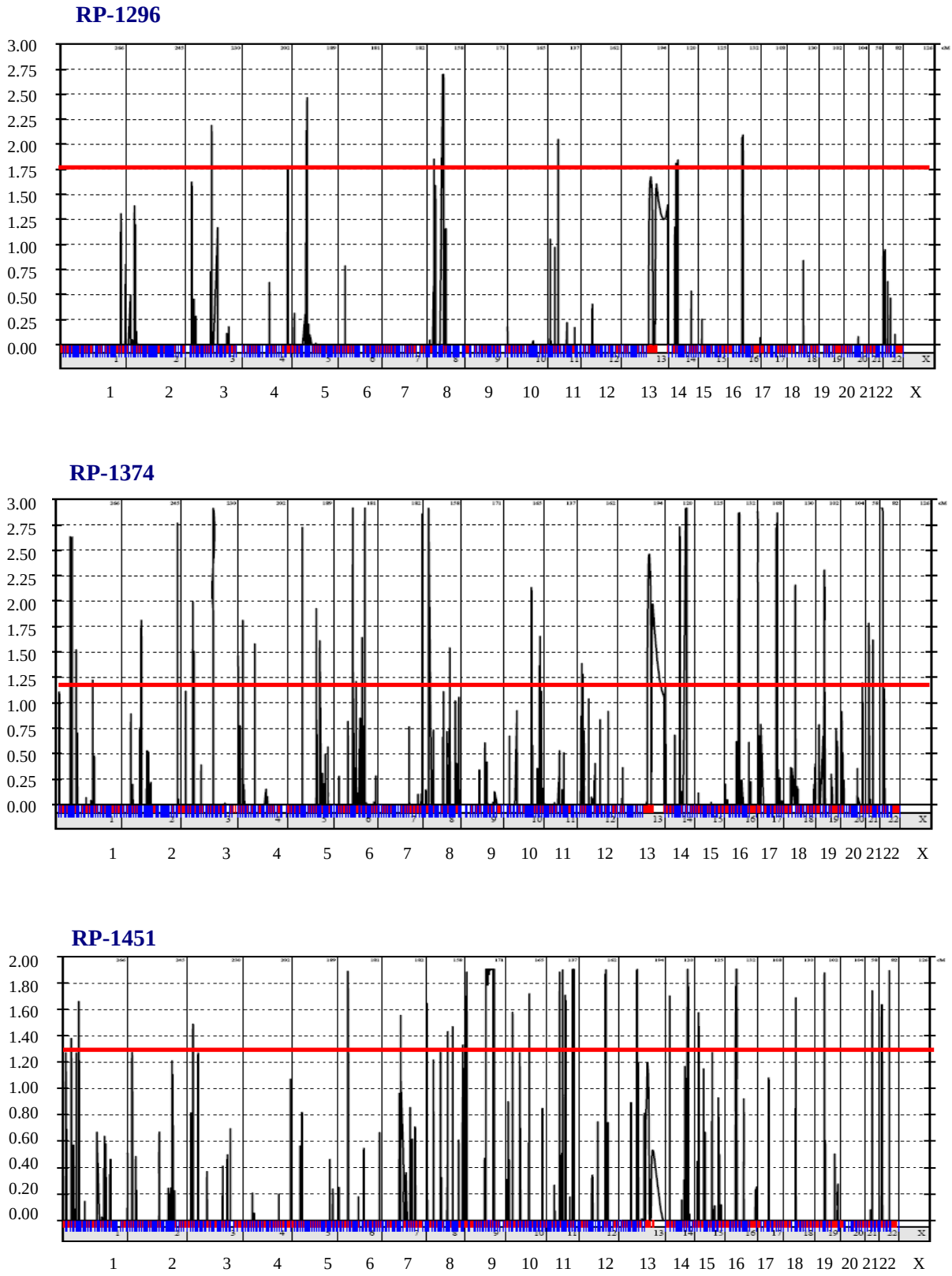


Figura 6. Regiones de ligamiento para las familias RP-1296, RP-1374 y RP-1451 obtenidas con el programa *EasyLinkage Plus v5.08*. Se representan los cromosomas (eje de abcisas) frente al *LOD-Score* (eje de ordenadas). La línea roja indica el *LOD-Score* considerado como significativo según los individuos analizados y la estructura familiar.

ANEXO IV
Publicaciones derivadas de este trabajo

Molecular Vision 2010; 16:2550-2558 <http://www.molvis.org/molvis/v16/a272>
Received 21 July 2010 | Accepted 28 November 2010 | Published 3 December 2010

© 2010 Molecular Vision

Mutation analysis of 272 Spanish families affected by autosomal recessive retinitis pigmentosa using a genotyping microarray

Almudena Ávila-Fernández,[1,2] Diego Cantalapiedra,[1,2] Elena Aller,[2,3] Elena Vallespín,[1,2] Jana Aguirre-Lambán,[1,2] Fiona Blanco-Kelly,[1,2] M. Corton,[1,2] Rosa Riveiro-Álvarez,[1,2] Rando Allikmets,[4,5] María José Trujillo-Tiebas,[1,2] José M. Millán,[2,3] Frans P.M. Cremers,[6,7] Carmen Ayuso[1,2]

[1]Genetics Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain; [2]Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Spain; [3]Fundación para la Investigación, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain; [4]Department of Ophthalmology, Columbia University, New York, NY; [5]Department of Pathology and Cell Biology, Columbia University, New York, NY; [6]Department of Human Genetics, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands; [7]Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

Purpose: Retinitis pigmentosa (RP) is a genetically heterogeneous disorder characterized by progressive loss of vision. The aim of this study was to identify the causative mutations in 272 Spanish families using a genotyping microarray.
Methods: 272 unrelated Spanish families, 107 with autosomal recessive RP (arRP) and 165 with sporadic RP (sRP), were studied using the APEX genotyping microarray. The families were also classified by clinical criteria: 86 juveniles and 186 typical RP families. Haplotype and sequence analysis were performed to identify the second mutated allele.
Results: At least one-gene variant was found in 14% and 16% of the juvenile and typical RP groups respectively. Further study identified four new mutations, providing both causative changes in 11% of the families. Retinol Dehydrogenase 12 (*RDH12*) was the most frequently mutated gene in the juvenile RP group, and Usher Syndrome 2A (USH2A) and Ceramide Kinase-Like (*CERKL*) were the most frequently mutated genes in the typical RP group. The only variant found in *CERKL* was p.Arg257Stop, the most frequent mutation.
Conclusions: The genotyping microarray combined with segregation and sequence analysis allowed us to identify the causative mutations in 11% of the families. Due to the low number of characterized families, this approach should be used in tandem with other techniques.

Retinitis pigmentosa (RP, OMIM 268000) is an inherited retinal dystrophy caused by a progressive loss of photoreceptors. Typically, the first symptom of the disease is night blindness, which is followed by a loss of peripheral vision and, in most cases, cone degeneration in the late stage. Its prevalence is approximately 1/4000 worldwide [1]. RP may be transmitted in all inheritance patterns. In addition, sporadic cases (sRP) have been described, representing 40%–50% of non-syndromic RP cases [1]. To date, 49 genes have been associated with RP, 32 of which are associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa (see arRP at RetNet). However, only a little more than 50% of RP cases can be explained by mutations in these genes [2]. Due to arRP's phenotypic and genetic heterogeneity, its molecular diagnosis is highly complex and time-consuming.

Currently, different genotyping techniques, such as single-strand conformation analysis [3], denaturing high-performance liquid chromatography (HPLC) [4], arrayed primer extension (APEX) analysis [5], and resequencing microarrays [6], are employed for the detection of mutations associated with disorders showing high genetic and allelic heterogeneity.

Several APEX arrays (Asper Biotech Ltd.; Tartu, Estonia) have been designed for syndromic and non-syndromic retinal dystrophies (e.g., Leber congenital amaurosis, Stargardt disease, Usher syndrome, Bardet-Biedl syndrome, and autosomal recessive and autosomal dominant retinitis pigmentosa) to identify the genetic cause of the disease.

The aim of this work was to identify the causative mutations in a panel of Spanish subjects affected by autosomal recessive RP (arRP) or sporadic juvenile RP and typical RP. A complete and efficient characterization of these patients would allow each patient to receive a more accurate prognosis and affected families to receive appropriate genetic counseling. Additionally, these individuals might benefit from upcoming therapeutic methods.

We studied a cohort of 272 unrelated Spanish families affected by autosomal recessive or sporadic juvenile RP, and typical RP. All cases were tested using the arRP-specific APEX genotyping microarray, followed by haplotype and sequence analysis.

METHODS

Patients: A total of 272 unrelated Spanish families affected by autosomal recessive and sporadic non-syndromic retinal

Correspondence to: Carmen Ayuso, Genetics Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz Avenida Reyes Católicos, 2 28040 Madrid, Spain; Phone: 0034 915504872; FAX: 0034 915504 849; email: cayuso@fjd.es; ayusog@gmail.com

CERKL Mutations and Associated Phenotypes in Seven Spanish Families with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa

Almudena Avila-Fernandez,[1] *Rosa Riveiro-Alvarez,*[1] *Elena Vallespin,*[1] *Robert Wilke,*[2] *Ignacio Tapias,*[3] *Diego Cantalapiedra,*[1] *Jana Aguirre-Lamban,*[1] *Ascension Gimenez,*[1] *Maria-Jose Trujillo-Tiebas,*[1] *and Carmen Ayuso*[1]

Purpose. Retinitis pigmentosa (RP) is a genetically heterogeneous group of inherited retinopathies. Up to now, 39 genes and loci have been implicated in nonsyndromic RP, yet the genetic bases of >50% of the cases, particularly of the recessive forms, remain unknown. A novel gene (*CERKL*) has been described as associated with RP26. It encodes a ceramide kinase that is assumed to be involved in sphingolipid-mediated apoptosis in the retina. This is a report of the phenotypes and genotypes of persons carrying disease-causing mutations in *CERKL*.

Methods. Two hundred ten unrelated Spanish families with nonsyndromic autosomal recessive RP were analyzed for sequence variations. Seven of these families presented a mutation in *CERKL*. Nine affected persons of these families were clinically investigated, including visual field, electrophysiology, and fundus examination.

Results. The mutation p.Arg257ter was identified in the homozygous state in all seven affected families. The patients with this variation in *CERKL* presented a common phenotype with characteristic macular and peripheral lesions.

Conclusions. This study presents the first genotype–phenotype correlation for persons carrying p.Arg257ter mutation and provides clues for a characteristic phenotype of these mutations among persons with autosomal recessive cases. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:2709–2713) DOI:10.1167/iovs.07-0865

Retinitis pigmentosa (RP) is a heterogeneous group of inherited retinal dystrophies caused by the loss of photoreceptors and clinically characterized by retinal pigment deposits at the mid periphery that are visible on fundus examination. Prevalence of nonsyndromic RP is approximately 1 in 4000. The most common form of RP is rod–cone dystrophy, in which the first symptom is night blindness, followed by the constriction of the visual field and progressive loss of visual acuity, leading to blindness after several decades.[1] The condition may segregate as an autosomal dominant, autosomal recessive, or an X-linked recessive trait, and it may also occur on a sporadic basis in up to 50% of cases.[2] All genes identified to date are believed to account for roughly 50% of all retinal dystrophy cases.[3] A new gene encoding for a ceramide kinase–like protein (*CERKL*) was identified and described to be associated with RP26.[4,5]

CERKL is assumed to be involved in sphingolipid-mediated apoptosis in the retina. This gene is composed of a diacylglycerol kinase catalytic domain and two nuclear localization signal domains, which are thought to be responsible for nucleolar retention of the protein. In fact, *CERKL* could be demonstrated to be localized in the nucleolus, nucleus, and cytosol. *CERKL* is moderately expressed in different tissues, including retina, kidney, lung, and pancreas and weakly in brain, placenta, and liver.[5]

Although *CERKL* has been reported to be a homologue of *CERK*, two studies have demonstrated that *CERKL* has no CERK activity. In fact, it has been shown that *CERKL* does not phosphorylate either ceramide or diacylglycerol.[6,7]

Proteins encoded by four recently identified RP genes corresponding to loci RP 9, 11, 13, and 18 are transported into the nucleus and involved in pre-mRNA splicing, acting as splicing factors.[8–11] Proteins encoded by RP1 and RP14 are known to be localized in the nucleolus.[12,13] Therefore, one could hypothesize that *CERKL* also plays a similar important role for retinal functions by its action in the nucleus and nucleolus.[6]

Tuson et al.[5] identified a homozygous nonsense mutation, p.Arg257ter (c.769C>T), in exon 5 of the *CERKL* gene, which introduced a stop codon, causing a prematurely truncated protein (position 257 of 532 amino acids) within the presumed catalytic domain. The homozygous mutation in the gene was shown to cause retinal degeneration; however, the molecular mechanisms by which this mutated protein causes retinal degeneration remain unknown.

In the present study, we investigated the retinal phenotypes of persons with nonsyndromic autosomal recessive RP (arRP) due to the p.Arg257ter mutation.

Patients and Methods

Patients

A total of 210 unrelated Spanish families affected with arRP were clinically examined at the Fundacion Jimenez Diaz Hospital (Madrid, Spain). Informed consent was obtained from all persons involved in the molecular study or from their legal guardians in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki (Edinburgh, 2000).

In addition, 100 randomly selected DNA samples (200 chromosomes) from a healthy Spanish control population were analyzed to

From the Departments of [1]Genetics and [3]Ophthalmology, Fundacion Jimenez Diaz-CIBERER, Madrid, Spain; and the [2]Department for Pathophysiology of Vision and Neuro-Ophthalmology, University Eye Hospital of Tübingen, Tübingen, Germany.

Supported by FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias) Grants 04/0193 and 06/0027, Fundacion Mutua Madrileña, and EviGenoRet Grant LSHG-CT-2005-512036. AA-F was supported by a fellowship from the Fundacion Conchita Rabago de Jimenez Diaz.

Submitted for publication July 10, 2007; revised October 2, 2007; accepted April 17, 2008.

Disclosure: **A. Avila-Fernandez**, None; **R. Riveiro-Alvarez**, None; **E. Vallespin**, None; **R. Wilke**, None; **I. Tapias**, None; **D. Cantalapiedra**, None; **J. Aguirre-Lamban**, None; **A. Gimenez**, None; **M.-J. Trujillo-Tiebas**, None; **C. Ayuso**, None

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Carmen Ayuoso, Genetics Department, Fundacion Jimenez Diaz-CIBERER, Avd. Reyes Catolicos 2, 28.040 Madrid, Spain; cayuso@fjd.es.

Copyright © Association for Research in Vision and Ophthalmology