



TESIS DOCTORAL

**Aproximación genómica al
diagnóstico genético de las distrofias
hereditarias de retina y búsqueda de
nuevos genes relacionados**

MARÍA GONZÁLEZ DEL POZO

SEVILLA, 2014



Memoria realizada en la Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal del Hospital Universitario Virgen del Rocío bajo la dirección de D. Guillermo Antiñolo Gil, Doctor en Medicina y Cirugía, y Profesor Titular del Departamento de Cirugía de la Universidad de Sevilla, que presenta la Licenciada en Farmacia MARÍA GONZÁLEZ DEL POZO para optar al grado de Doctor.

El Director,

La Doctoranda,

Fdo. Guillermo Antiñolo Gil
Doctor en Medicina y Cirugía
Profesor Titular
Universidad de Sevilla

Fdo. María González del Pozo

A mis padres, Jesús y Olga, y
a Jose,

AGRADECIMIENTOS

Llegado este momento me gustaría agradecer a todas aquellas personas que, de un modo u otro, han colaborado en la realización de esta tesis doctoral.

A Guillermo Antiñolo, gracias por dirigir esta tesis y por toda la confianza que has depositado en mí estos años. Es una suerte para mí formar parte de tu equipo. Es admirable ver la constancia, la entrega y el entusiasmo con los que luchas cada día para que jóvenes como yo vean cumplidos sus objetivos.

A Salud Borrego, te agradezco mucho el continuo apoyo que me has mostrado en este trabajo. Gracias por estar siempre dispuesta a aclarar mis dudas sobre el estudio genético de las familias y por transmitirnos que, en este trabajo, lo más importante son los pacientes.

A todos mis compañeros de la unidad: técnicos, facultativos, administrativos y personal de enfermería, gracias a todos por vuestra ayuda.

A los “erreperos” que ya no están: Juancho, Marcela, Nerea y Belén, muchas gracias por vuestra colaboración en mis primeros años de tesis y por estar siempre dispuestos a echarme una mano, y en especial

A Isa, porque desde el primer día hasta el último aprendí cosas de tí. Gracias por tu ayuda, por tu constancia, por tu perseverancia y sobre todo por no perder nunca la sonrisa. Nunca olvidaré el tiempo que trabajamos juntas.

A las “erreperas” que siguen a pie del cañón, y que sin ellas esta tesis no hubiera visto la luz: Nereida y Cristina. Gracias Nereida por tus ganas de trabajar, de ayudar y de aprender cosas nuevas. Gracias Cristina por tu apoyo, tus consejos, tu visión amplia de las cosas y sobre todo, por tu buen humor. Me siento muy afortunada de poder trabajar con vosotras.

A las “hirschsprunianas”: Ana, Berta, Maca y Laura, muchas gracias por ayudarme siempre en todo lo que necesité. Gracias Ana por todo tu apoyo y cariño de corazón. Siempre recordaré los buenos momentos que compartimos, codo con codo, en ese pequeño espacio de la 4ª planta.

A María, gracias una y mil veces por escuchar con paciencia todas mis quejas, por aguantarme en los momentos de desesperación y por alegrarte por cada uno de mis logros. Tu empeño en intentar escaparte siempre del molde hace del laboratorio un sitio mucho mejor. En definitiva, gracias por tu amistad más allá de la ciencia.

A la Dra. Ana Ilundáin, por ayudarme con cariño con las correcciones de la tesis.

Al personal del GBPA y bioinformáticos, Javier, Alicia, etc, que han trabajado intensamente en el análisis y procesamiento de las muestras de megasecuenciación.

A los TRH por hacer de mi tiempo de ocio un espacio mucho más divertido. Gracias Alberto por tu apoyo y por ser cada año que pasa mejor amigo. A Víctor y a Ana, gracias por vuestra amistad y cariño.

A José Manuel y Mercedes, por todo el apoyo y amor que me brindáis cada día. Gracias por darme siempre lo mejor, por sentirnos orgullosos de mí y por tratarme como a una hija.

A Merche gracias por el entusiasmo que muestras y transmites por las pequeñas cosas. Gracias por admirar lo que hago y por apoyarme tanto durante estos años de tesis.

A Ale y a Elia gracias a los dos por vuestro cariño sincero y por tener siempre palabras de ánimo para mí.

A mis hermanos, a Alicia por tu optimismo contagioso y a Javi por ser un ejemplo de que no hay que tirar nunca la toalla. A mi cuñado Miguel por tu apoyo y a mi sobrino Xabi, que aunque él aún no lo sepa, me ha ayudado mucho. Gracias por estar siempre ahí al otro lado del teléfono cuando os necesito, sintiéndoos cerca aunque estéis lejos.

A mis padres porque de ellos aprendo cada día. A mi madre Olga por transmitirme tu visión inconformista de las cosas y por enseñarme a no callar ante las injusticias. A mi padre Jesús por tu curiosidad, por el entusiasmo que pones en lo que haces y por tu entrega constante. Gracias a los dos por todo lo que habéis hecho para que yo pueda llegar hasta aquí.

A mi marido Jose, por tu apoyo incondicional, por compartir conmigo sueños e ilusiones. Gracias por darme lo mejor de tí, por estar ahí siempre, por tu paciencia, por tu comprensión, por tu generosidad, pero sobre todo, gracias por animarme a cumplir mis sueños. El mérito de esta tesis te lo debo en gran parte a tí, que siempre creíste en mí, incluso cuando ni siquiera yo misma lo hacía.

En último lugar quiero dar las gracias de manera muy especial a las familias afectadas de distrofias hereditarias de retina que esperan pacientemente muchos años hasta ser diagnosticadas. Ellas hacen que el esfuerzo diario merezca la pena.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS VII

ÍNDICE XIII

 ÍNDICE DE CONTENIDO.....XV

 ÍNDICE DE FIGURAS..... XVIII

 ÍNDICE DE TABLAS XX

ABREVIATURASXXV

 CLAVE DE ABREVIATURAS..... XXVII

 NOMENCLATURA DE LOS AMINOÁCIDOS.....XXXI

I INTRODUCCIÓN..... I

 I.1 LA VISIÓN 3

 I.1.1 La retina.....3

 I.1.2 Los fotorreceptores.....6

 I.1.3 Cascada de la fototransducción 10

 I.1.4 El ciclo visual..... 12

 I.2 DISTROFIAS HEREDITARIAS DE RETINA 14

 I.2.1 Retinosis Pigmentaria..... 16

 I.2.2 Síndromes asociados a RP 21

 I.3 GENES ANALIZADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO 28

 I.3.1 Genes asociados a DHR no sindrómicas 28

 I.3.2 Genes asociados tanto a DHR sindrómicas como no sindrómicas .. 40

 I.3.3 Genes asociados a DHR sindrómicas 41

 I.3.4 Genes candidatos de DHR..... 42

 I.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS DHR 44

 I.4.1 Importancia del diagnóstico genético..... 44

 I.4.2 Técnicas empleadas en el diagnóstico genético de las DHR 45

 I.4.3 Panorama actual en la búsqueda de nuevos genes y mutaciones de
DHR 48

2 OBJETIVOS..... 53

OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	55
3 PACIENTES Y MÉTODOS	57
3.1 PACIENTES Y CONTROLES.....	59
3.1.1 Familias en estudio	59
3.1.2 Individuos control.....	60
3.2 MÉTODOS.....	60
3.2.1 Técnicas generales utilizadas.....	60
3.2.2 Evaluación de grandes deleciones y duplicaciones mediante MLPA .	68
3.2.3 Micromatriz de genotipado específica para RPar de Asper Biotech.	70
3.2.4 Micromatriz de resecuenciación de diseño personalizado para RPar71	
3.2.5 Secuenciación del exoma completo en familias RPar para la identificación de variantes asociadas a enfermedad.....	80
3.2.6 Evaluación de la patogenicidad de las variantes	82
3.2.7 Secuenciación directa de los nuevos genes candidatos identificados en nuestra cohorte de pacientes afectos de distintas DHR	84
3.2.8 PCR cuantitativa.....	85
4 RESULTADOS.....	87
4.1 RASTREO MUTACIONAL.....	89
4.1.1 Micromatriz de genotipado específica para RPar	89
4.1.2 Micromatriz de resecuenciación de diseño personalizado.	95
4.1.3 Análisis por Multiplex-Ligation Probe Amplification del gen <i>EYS</i>	107
4.1.4 Secuenciación del exoma completo en familias RPar	109
4.1.5 Rastreo mutacional del exón I del gen <i>PCDHA1</i> en pacientes DHR124	
4.2 CORRELACIONES GENOTIPO-FENOTIPO	125
4.3 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN.....	132
4.3.1 Cuantificación de la expresión en ADNc de retina humana del gen <i>PCDHA1</i> mediante tecnología taqman.....	132
5 DISCUSIÓN.....	135
5.1 CAPACIDAD DIAGNÓSTICA DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS...	137
5.1.1 Micromatriz de genotipado específica para RPar	137
5.1.2 Micromatriz de resecuenciación de diseño personalizado	138
5.1.3 Multiplex-Ligation Probe Amplification (MLPA) del gen <i>EYS</i>	139

5.1.4	Secuenciación del exoma completo en familias RPar	140
5.2	ESPECTRO DE GENES Y MUTACIONES CAUSALES EN NUESTRA COHORTE DE PACIENTES.....	142
5.2.1	Mutaciones en genes asociados al fenotipo en estudio. Correlaciones Genotipo-Fenotipo.	142
5.2.2	Mutaciones en genes no asociados previamente al fenotipo en estudio	153
5.2.3	Mutaciones en genes nuevos de DHR.....	155
5.2.4	Rastreo mutacional del exón I del gen <i>PCDHA1</i> en pacientes DHR	157
5.2.5	Prevalencia de cada uno de los genes en nuestra cohorte	157
5.2.6	Categorización funcional de los genes responsables de la enfermedad en nuestra cohorte de pacientes.	158
5.2.7	Mutaciones frecuentes	159
5.3	ESTUDIOS DE EXPRESIÓN.....	159
5.4	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS GLOBALES OBTENIDOS	160
6	CONCLUSIONES.....	163
7	BIBLIOGRAFÍA	169
8	ANEXOS	207
	ANEXO I: CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	209
	ANEXO II: PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO.....	209

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1– Estructura del ojo. 3

Figura 1.2 – Representación esquemática de una sección transversal de la retina mostrando su estructura laminar. 5

Figura 1.3 – Estructura de los fotorreceptores de la retina. 6

Figura 1.4 – Estructura del segmento externo de los conos y bastones. 7

Figura 1.5 – Gráfica de distribución de cada tipo de fotorreceptores a lo largo del meridiano horizontal de la retina humana. 9

Figura 1.6 – Cascada de fototransducción en el segmento externo de los bastones. 11

Figura 1.7 – El ciclo visual. 13

Figura 1.8 – Solapamiento fenotípico entre DHR. 14

Figura 1.9 – Solapamiento genético entre las distintas DHR. 15

Figura 1.10 – Imagen del fondo de ojo. 18

Figura 1.11 – Representación esquemática del gen *CRB1* y sus dominios proteicos. 31

Figura 1.12 - Representación esquemática del gen *EYS*. 32

Figura 1.13 – Representación de la estructura de la rodopsina. 37

Figura 1.14 – Clúster de genes de las alfa-protocadherinas. 43

Figura 1.15 – Representación de los dominios proteicos de las alfa-protocadherinas. 43

Figura 1.16 – Genes DHR mapeados e identificados en las últimas tres décadas. 49

Figura 3.1 – Fundamento del MLPA. 69

Figura 3.2 – Esquema de funcionamiento de la micromatriz basada en la tecnología APEX. 70

Figura 3.3 – Estructura de una micromatriz o *microarray*. 72

Figura 3.4 – Visión general del protocolo de resecuenciación. 74

Figura 3.5 – Esquema del protocolo de resecuenciación. 79

Figura 4.1 – Resultados obtenidos tras el análisis con la micromatriz de genotipado. 89

Figura 4.2 – Segregación familiar de los cambios homocigotos hallados mediante la micromatriz de genotipado.	91
Figura 4.3 – Segregación familiar de las variantes en heterocigosis compuesta identificadas mediante la micromatriz de genotipado.	92
Figura 4.4 – Segregación familiar de los cambios en posible digenismo identificados mediante la micromatriz de genotipado.	93
Figura 4.5 – Análisis del exón 7 del gen <i>TULPI</i> en el control positivo de la familia RP 21 usando el software GSEQ (v.4.1).	96
Figura 4.6 – Análisis del exón 4 del gen <i>EYS</i> en control positivo de la familia RP60 usando el software GSEQ (v.4.1).	97
Figura 4.7 – Cambio detectado en la familia RP 76.	98
Figura 4.8 – Segregación familiar de los cambios homocigotos encontrados mediante la micromatriz de resecuenciación.	100
Figura 4.9 – Alineamiento múltiple de las proteínas ortólogas en diferentes especies.	105
Figura 4.10 – Mutaciones identificadas en la familia RP 234.	107
Figura 4.11 – Estructura de la familia RP 234.	108
Figura 4.12 – Análisis de la secuencia flanqueante al nucleótido mutado mediante el programa GSEQ.	108
Figura 4.13 – Segregación familiar de la familia RP429.	110
Figura 4.14 – Representación esquemática de la proteína usherina y los residuos mutados.	111
Figura 4.15 – Segregación familiar de la familia RP 19 de las mutaciones en <i>ABCA4</i>	112
Figura 4.16 – Segregación familiar de la familia RP 255.	112
Figura 4.17 – Mutaciones en el exón I de <i>C2ORF71</i>	113
Figura 4.18 – Árbol familiar de la familia RP 15.	114
Figura 4.19 – Segregación familiar de la familia RP 368.	114
Figura 4.20 – Detección de mutaciones nuevas en el gen <i>MKKS</i>	115
Figura 4.21 – Segregación familiar de las variantes identificadas en la familia RP 42.	115
Figura 4.22 – Estructura proteica de la chaperona <i>MKKS</i>	117

Figura 4.23 – Análisis indirecto de los miembros de la familia RP258 mediante marcadores microsatélites localizados en el cromosoma 5 en la región cercana al gen *GPR98*. 122

Figura 4.24 – Segregación familiar de la familia RPI84..... 123

Figura 4.25 – Representación de los dominios proteicos de *PCDHA1*..... 123

Figura 4.26. Predicción de los puentes disulfuro en la proteína *PCDHA*..... 124

Figura 4.27 – Porcentaje de expresión de *Pcdha1* en ADNc de cerebro y de retina humanos..... 132

Figura 5.1 – Contribución parcial de cada uno de los genes en nuestra cohorte. 157

Figura 5.2 – Clasificación funcional de los genes que se encuentran mutados en nuestra cohorte..... 158

Figura 5.3 – Familias analizadas y resultados obtenidos..... 160

Figura 5.4 – Resultados obtenidos tras el análisis con las diversas técnicas empleadas. 161

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 – Genes implicados en la RP..... 22

Tabla 3.1 – Clasificación de las familias estudiadas. 60

Tabla 3.2 – Reactivos empleados en la extracción de ADN a partir de una muestra de sangre periférica..... 61

Tabla 3.3 – Reactivos empleados en la extracción manual de ADN..... 62

Tabla 3.4 – Cantidades variables de reactivos que hay que añadir para digerir las proteínas en función del tamaño del precipitado. 63

Tabla 3.5 – Reactivos utilizados en la PCR estándar..... 65

Tabla 3.6 – Condiciones generales de amplificación. 65

Tabla 3.7 – Reactivos utilizados en la PCR de largo alcance (LR-PCR). 65

Tabla 3.8 – Condiciones de amplificación por LR-PCR..... 66

Tabla 3.9 – Reactivos utilizados en la reacción de secuenciación..... 67

Tabla 3.10 – Condiciones de la secuenciación por el método Sanger..... 67

Tabla 3.11 – Condiciones de la reacción de MLPA..... 69

Tabla 3.12 – Número de variantes genotipadas en la micromatriz de Asper Biotech de RPar..... 71

Tabla 3.13 – Genes incluidos en la micromatriz de resecuenciación de diseño personalizado.....	73
Tabla 3.14 – Cebadores del gen <i>CERKL</i>	75
Tabla 3.15 – Cebadores del gen <i>CNGA1</i>	75
Tabla 3.16 – Cebadores del gen <i>CRB1</i>	75
Tabla 3.17 – Cebadores del gen <i>EYS</i>	76
Tabla 3.18 – Cebadores del gen <i>IDH3B</i>	76
Tabla 3.19 – Cebadores del gen <i>LRAT</i>	77
Tabla 3.20 – Cebadores del gen <i>MERTK</i>	77
Tabla 3.21 – Cebadores del gen <i>NR2E3</i>	77
Tabla 3.22 – Cebadores del gen <i>PDE6B</i>	77
Tabla 3.23 – Cebadores del gen <i>PRCD</i>	77
Tabla 3.24 – Cebadores del gen <i>PROM1</i>	78
Tabla 3.25 – Cebadores del gen <i>RGR</i>	78
Tabla 3.26 – Cebadores del gen <i>RHO</i>	78
Tabla 3.27 – Cebadores del gen <i>RLBP1</i>	78
Tabla 3.28 – Cebadores del gen <i>RPE65</i>	78
Tabla 3.29 – Cebadores del gen <i>TULP1</i>	78
Tabla 3.30 – Controles positivos de mutaciones.....	80
Tabla 3.31 – Cebadores empleados en la secuenciación directa del exón I (región variable) del gen <i>PCDHA1</i>	84
Tabla 4.1 – Mutaciones homocigotas identificadas mediante la micromatriz de genotipado.....	90
Tabla 4.2 – Variantes en heterocigosis compuesta identificadas mediante la micromatriz de genotipado.....	92
Tabla 4.3 – Familias RPar con dos mutaciones heterocigotas en genes distintos identificadas mediante la micromatriz de genotipado (Digenismo).....	93
Tabla 4.4 – Familias con una única variante heterocigota posiblemente patogénica identificada mediante la micromatriz de genotipado.....	94
Tabla 4.5 – Familias con variantes posiblemente no patogénicas identificadas mediante la micromatriz de genotipado.....	95
Tabla 4.6 – Resultados del ensayo de validación.....	96

Tabla 4.7 – Variantes posiblemente patogénicas detectadas mediante la micromatriz de diseño personalizado.....	99
Tabla 4.8 – Variantes probablemente no patogénicas detectadas con la micromatriz de resecuenciación.....	101
Tabla 4.9 – Resultado del análisis <i>in silico</i> de los nuevos cambios.	106
Tabla 4.10 – Mutaciones encontradas mediante secuenciación del exoma completo.....	109
Tabla 4.11 – Características clínicas de los afectos de la familia RP 42.....	116
Tabla 4.12 – Variantes de secuencia identificadas en el paciente índice de la familia RP42 en genes implicados en el SBB, poliquistosis renal, SLS y Nefronoptosis. I	118
Tabla 4.13 – Resultados de las predicciones <i>in silico</i> para el nuevo sitio aceptor de los alelos silvestre vs. mutante.....	121
Tabla 4.14 – Características clínicas de las familias genéticamente diagnosticadas.	126
Tabla 5.1 – Protocadherinas implicadas en distintos tipos de DHR.	156

ABREVIATURAS

CLAVE DE ABREVIATURAS

11-cisRAL: 11-cis retinal

11-cisRDH: 11-cis retinal aldehído deshidrogenasa

11-cisROL: 11-cis retinol

5'-3'-RACE: 5'- 3'- Rapid Amplification of cDNA Ends

aa: Aminoácido

ABCA4 (ABCR): Casete de unión a ATP Subfamilia A miembro 4

ACL: Amaurosis congénita de Leber

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: ADN codificante

APEX: Arrayed primer extension

ARL6: Proteína tipo factor de ADP-Ribosilación 6

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

AVC: Alteraciones en la visión de los colores

BBIP10: Proteína interactora del BBSoma 1

BBS1: Gen del síndrome de Bardet-Biedl 1

BBS10: Gen del síndrome de Bardet-Biedl 10

BBS12: Gen del síndrome de Bardet-Biedl 12

BBS2: Gen del síndrome de Bardet-Biedl 2

BBS4: Gen del síndrome de Bardet-Biedl 4

BBS5: Gen del síndrome de Bardet-Biedl 5

BBS7: Gen del síndrome de Bardet-Biedl 7

BBS8: Gen del síndrome de Bardet-Biedl 8

BBS9: Gen del síndrome de Bardet-Biedl 9

C2orf71: Marco de lectura abierta 71 del cromosoma 2

CEP290: Proteína centrosómica de 290kDa

CERKL: Proteína similar a ceramida quinasa

CN: Ceguera nocturna

CNCE: Ceguera nocturna congénita estacionaria

CNGA1: Subunidad α 1 del canal dependiente de nucleótido cíclico

CNGB1: Subunidad β 1 del canal dependiente de nucleótido cíclico

CNVs: *Copy number variations*, Variaciones en el número de copias

CRALBP: Proteína de unión a aldehído retinal celular

CRB1: Proteína homóloga 1 de Crumbs

CRBP: Proteína de unión de Retinol celular

c.s.p.: Cantidad suficiente para
DC: Distrofia de conos
DCB: Distrofia de conos y bastones
DCBLX: Distrofia de conos y bastones ligada al cromosoma X
ddNTPs: Dideoxinucleótidos
DHR: Distrofias hereditarias de retina
DM: Distrofia macular
dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato
EGF: Factor de crecimiento epidérmico
EGF-like: Dominio proteico tipo factor de crecimiento epidérmico
EPR: Epitelio pigmentario de la retina
ERG: Electrorretinograma
ESCS: Síndrome del S-cono aumentado
EYS: Proteína homóloga de eyes shut (*Drosophila*)
FFM: Fundus flavimaculatus
FISH: Hibridación in situ fluorescente
GC: Guanilil ciclasa
GLIS2: Dedo de zinc de la familia GLIS 2
GMPc: Guanosín monofosfato cíclico
GPR98: Receptor acoplado a proteína G 98
H.U.V.R.: Hospital Universitario Virgen del Rocío
IDH3B: Subunidad β de la enzima Isocitrato deshidrogenasa 3 (NAD⁺)
IFT: Mecanismos de transporte intraflagelar
INPP5E: Inositol polifosfato-5-fosfatasa
INVS: Inversina
IQCB1: Motivo IQ conteniendo a B1
IRBP: Proteína interfotorreceptora de unión de retinoide
JBTS: Síndrome de Joubert
Kb: Kilo base
LM-PCR: Linker mediated-PCR
LRAT: Lecitín retinol aciltransferasa
LR-PCR: Long-range PCR
LZTFL1: Factor de transcripción tipo 1 con cremallera de leucina
MAF: Minor Allele Frequency, frecuencia del alelo menor
MERTK: C-mer proto-oncogén tirosin quinasa
MGC1203: Dominio coiled-coil conteniendo 28B
MIM: *Mendelian Inheritance in Man* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)

MKKS: Síndrome de McKusick–Kaufman
MKKS (BBS6): Gen del síndrome de McKusick-Kaufman
MKS: Síndrome de Meckel–Gruber
MKS1: Proteína del síndrome de Meckel tipo 1
MLPA: *Multiplex-ligation probe amplification*
NAD-IDH: Nicotinamida-adenina dinucleótido específica isocitrato deshidrogenasa
NEK8: Quinasa 8 relacionada con NIMA
NGS: *Next-generation sequencing*, Secuenciación de nueva generación
NMD: Nonsense-mediated mRNA decay
NPH: Nefronoptisis
NPH5 (IQCB1): nefrocistina-5
NPHP1: Nefrocistina 1
NPHP3: Nefrocistina 3
NPHP4: Nefrocistina 4
NPM: Nucleofosmina
NR2E3: Receptor nuclear subfamilia 2 grupo E miembro 3
OFD1: Síndrome orofaciodigital tipo 1
OFD1: Gen del síndrome orofacial tipo 1
ORF15: Open reading frame 15
pb: Par de bases
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDE: Fofosdiesterasa
PDE6B: Subunidad β de la fosfodiesterasa 6 específica de bastón dependiente de GMPC
PDZ: Dominio identificado en PSD95, Dlg1 y zo-1.
PDZD7: Proteína que contiene dominio PDZ 7
PKD: Poliquistosis renal
PKD1: Gen de la enfermedad de poliquistosis renal 1
PKD2: Gen de la enfermedad de poliquistosis renal 2
PKHD1: Gen de la enfermedad de poliquistosis renal y hepática 1
PNR: Receptor nuclear fotorreceptor-específico
PPCRA: Atrofia coriorretinal paravenosa pigmentada
PPRPE: RP con preservación del epitelio pararteriolar
PRCD: Proteína de la degeneración progresiva de bastones y conos
PROM1: Prominina 1
PRPF31: Factor de procesamiento 31 de pre-mRNA de PRP31 homólogo (*S. cerevisiae*)
qPCR: PCR cuantitativa
RDH12: todo-trans retinol deshidrogenasa

RDS : Periferina 2
RGR: Receptor acoplado a proteína G del epitelio pigmentario de la retina
RHO: Rodopsina
RK: Rodopsina quinasa
RLBP1: Proteína de unión al retinaldehído 1
ROM1: Proteína de membrana del segmento externo de los bastones 1
RP: Retinosis Pigmentaria
RPad: Retinosis Pigmentaria autosómica dominante
RPar: Retinosis Pigmentaria autosómica recesiva
RPe: Retinosis Pigmentaria esporádica
RPE65: Proteína de 65 kDa específica del epitelio pigmentario de la retina
RPGR: Regulador de GTPasa implicado en Retinitis Pigmentaria
RPGRI1: Proteína interactora del regulador de Retinitis Pigmentosa GTP-asa
RPGRI1L: Proteína tipo la proteína 1 interactora de RPGR
RPGR-ORF15: Isoforma de RPGR con el *open reading frame* 15
RPLX: Retinosis Pigmentaria ligada al cromosoma X
RT-PCR: *Real time-PCR*, PCR a tiempo real
SBB: Síndrome de Bardet Biedl
SDCCAG8: Antígeno-8 serológicamente definido de cáncer de colon
SLS: Síndrome de Senior–Løken
SNC: Sistema nervioso central
SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*
SNV: *Single Nucleotide Variation*
STGD: Enfermedad de Stargardt
STGD4: Enfermedad de Stargardt dominante tipo 4
Taq: *Thermus aquaticus*
Th: Temperatura de hibridación
TMEM67: Proteína transmembrana 67
todo-*trans* RAL: todo-*trans* retinal
TRIM32: Motivo conteniendo tripartitos 32
TTC8: Dominio de repetición tetratricopeptido 8
TUB: Proteína homóloga a tubby murino
TULP1: Proteína relacionada con tubby
TULP2: Proteína relacionada con tubby 2
USH: Síndrome de Usher
USH-2: Síndrome de Usher tipo 2
USH2A: Gen de síndrome de Usher 2A

UTR: *Untranslated región*, región no traducida

VAAr: Virus adeno-asociados recombianes

VLGR1: Receptor muy grande acoplado de proteína G 1

VREF: Vitreorretinopatía exudativa familiar

WCLB: Buffer de lisis de linfocitos

NOMENCLATURA DE LOS AMINOÁCIDOS

Código de una letra	Código de tres letras	Aminoácido
A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina
X ó *	Ter	Codon de parada

I INTRODUCCIÓN

1.1 LA VISIÓN

1.1.1 La retina

La visión o sentido de la vista es una de las principales capacidades sensoriales del hombre y de muchos animales que les permite obtener información del medio en el que viven. El órgano encargado de la visión es el ojo o globo ocular (Figura 1.1) Anatómicamente el ojo está constituido por tres capas concéntricas que son, de la más externa a la más interna: túnica fibrosa, túnica vascular y túnica nerviosa. Aunque todas las partes del ojo son importantes para percibir la información visual, la túnica nerviosa o retina es la receptora de la información visual.

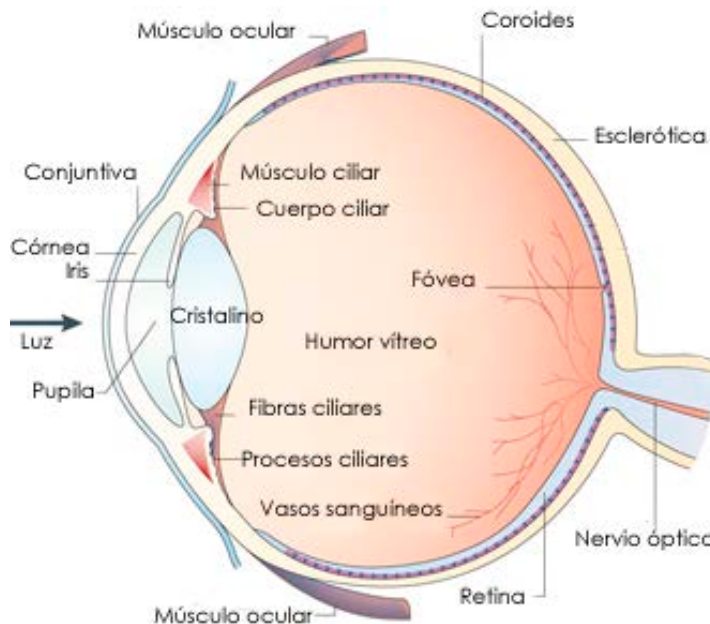


Figura 1.1– Estructura del ojo.

Representación esquemática del ojo humano en el cual la luz pasa a través de la pupila, el cristalino y la cavidad vítreo antes de alcanzar la capa fotosensible de la retina.

La retina es una porción del cerebro que se proyecta hacia las estructuras superficiales para recibir los rayos luminosos que provienen del mundo exterior. Su fácil acceso, unido a la posibilidad de estudiar el procesamiento de la información en una parte intacta del sistema nervioso, convierte a esta estructura en un modelo de gran utilidad para estudios fisiológicos y morfológicos del sistema nervioso en general [Dowling, 1987]. La retina es una capa de tejido de aproximadamente 0,2 mm de grosor en el caso de los humanos, que recubre la cara interna del ojo. Anatómicamente se diferencia en dos regiones: la retina anterior o ciega que reviste la cara posterior del

cuerpo ciliar y del iris, y la retina posterior o sensitiva que es la encargada de la percepción visual. En la retina posterior fotosensitiva se localiza la papila del nervio óptico y la mácula. La papila del nervio óptico, la papila óptica, disco óptico o punto ciego es por donde los axones de las células ganglionares abandonan la retina para formar el nervio óptico. La mácula también llamada mácula lútea, de unos 5 mm de diámetro, es la zona de mayor agudeza visual y coincide con el eje visual del ojo. La mácula tiene unas peculiaridades histológicas e histoquímicas que la diferencian del resto de la retina: mayor grosor, ausencia de bastones, elevado número de conos (hasta 140.000 conos/mm²), epitelio pigmentario más denso y gran contenido en pigmentos xantofílicos como la luteína y la zeaxantina, los cuales parecen tener entre otras funciones, un papel protector frente a los fototraumatismos. La mácula se divide en dos zonas: la fovea y la foveola. La fovea está en el centro de la mácula, algo deprimida, presenta un color más oscuro y con una extensión de unos 1,5 mm de diámetro que equivale a un diámetro papilar de 0° a 5°. La foveola se observa como un reflejo brillante en el centro de la fovea y tiene una extensión de unos 0,35 mm de diámetro.

Santiago Ramón y Cajal (1892) fue uno de los pioneros en el estudio de la organización de la retina de los vertebrados y la mayoría de sus descripciones y clasificaciones siguen siendo válidas. Gracias a la microscopía electrónica, las técnicas de inmunocitoquímica y las de registro electrofisiológico e inyección intracelular, tenemos un conocimiento mucho más detallado sobre los circuitos neuronales de la retina. La retina de mamíferos posee 6 clases de neuronas: bastones, conos, células horizontales, células bipolares, células amacrinas y células ganglionares. Están distribuidas de manera laminar en tres capas que contienen cuerpos celulares (capa de células ganglionares, capa nuclear interna y capa nuclear externa) y dos capas donde se producen interacciones sinápticas (capa plexiforme interna y capa plexiforme externa). Además los segmentos externos de los fotorreceptores se encuentran separados del lecho capilar de la coroides por la capa del epitelio pigmentario de la retina (EPR) (Figura 1.2).

El EPR es una monocapa de células epiteliales comunicadas entre sí mediante uniones ocluyentes y forma parte de la barrera hematorretiniana que separa la retina neural de la coroides. El EPR participa en el mantenimiento e integridad de la retina en muchos aspectos: i) suministra factores tróficos a los fotorreceptores, ii) interviene en la fagocitosis y digestión de los discos de las membranas que son recambiados diariamente por los conos y por los bastones, iii) recicla y aporta retinoides al ciclo visual, iv) regula la composición y volumen del espacio subretinal [Young y Bok, 1969, Bridges, 1976, Nicoletti y cols., 1995, Rizzolo y cols., 2011] y v) mediante los gránulos de melanina de su citoplasma, absorbe los rayos luminosos dispersos impidiendo la reflexión y la diseminación de la luz dentro del globo ocular [Zinn y Marmor, 1979] .

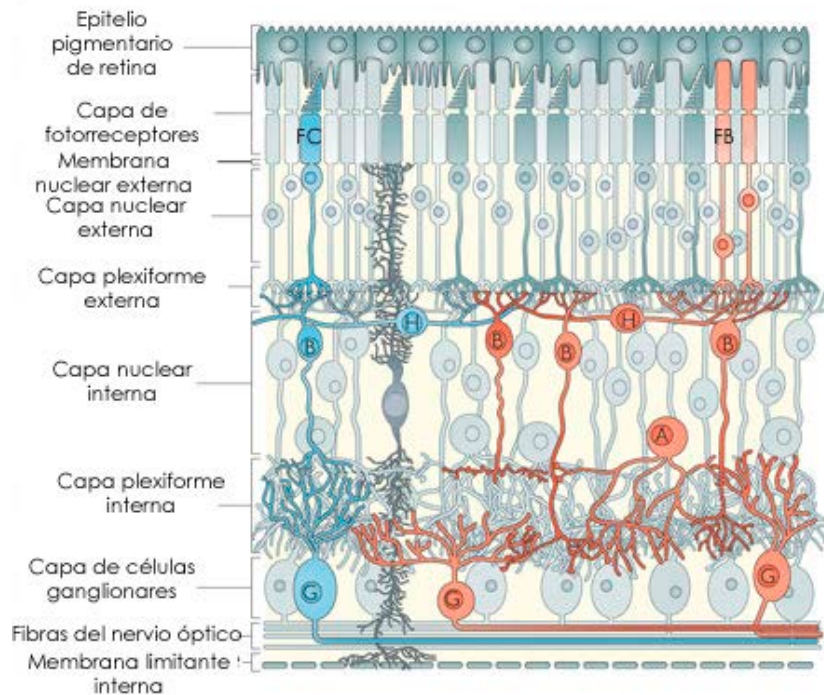


Figura 1.2 - Representación esquemática de una sección transversal de la retina mostrando su estructura laminar.

Fotorreceptor cono (FC), fotorreceptor bastón (FB), células horizontales (H), células bipolares (B), células amacrinas (A), células ganglionares (G). En azul se ha representado un circuito representativo de la transmisión de la señal de los conos y en rojo uno de los bastones. Modificada de Swaroop y cols. [2010].

La capa nuclear externa contiene los cuerpos celulares de los conos y de los bastones, cuya porción externa está en íntimo contacto con el EPR. Los conos y bastones establecen sinapsis en la capa plexiforme externa con las dendritas de las células bipolares y de las células horizontales, cuyos núcleos celulares se localizan en la capa nuclear interna. En la capa plexiforme interna se produce la segunda sinapsis de la vía vertical de la retina, donde contactan los axones de las células bipolares con las dendritas de las células ganglionares. Además a este nivel terminan gran cantidad de prolongaciones de las células amacrinas, que afectan y modulan la información que les llega a las células ganglionares. Las células amacrinas junto con las horizontales constituyen vías de dirección lateral que modifican las señales transmitidas por la vía vertical de la retina, es decir, desde los fotorreceptores a las células bipolares y a las ganglionares. Los núcleos de las células ganglionares constituyen la capa de células ganglionares. Los axones de las células ganglionares se dirigen hacia la papila del nervio óptico formando la capa de fibras aferentes del nervio óptico. Por último, las células de Müller que forman la membrana limitante interna equivalen a la glia y como ésta tienen

función de soporte. Las células de Müller llenan los espacios entre los diversos elementos neurales que quedan entre las dos membranas limitantes, la externa y la interna. Cabe destacar que la luz atraviesa las distintas capas de fibras de la retina antes de alcanzar las células fotosensibles (fotorreceptores), que están localizados cerca del suministro de sangre.

1.1.2 Los fotorreceptores

1.1.2.1 Características morfológicas y funcionales de los fotorreceptores de la retina

Los fotorreceptores son las neuronas responsables de captar la luz y realizar la fototransducción. La mayoría de los vertebrados tienen dos tipos de fotorreceptores inicialmente clasificados en base a su aspecto morfológico: bastones y conos.

Los fotorreceptores presentan un segmento externo, un segmento interno, un cilio conector y una terminal sináptica (Figura 1.3).

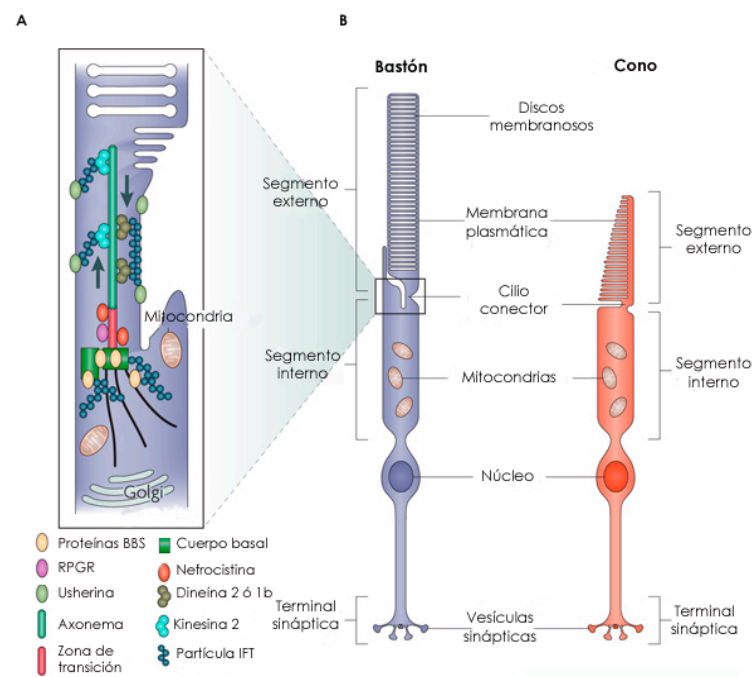


Figura 1.3 – Estructura de los fotorreceptores de la retina.

A) Cilio conector de los fotorreceptores. El cilio consta de un esqueleto central llamado axonema. El axonema está anclado al cuerpo basal, el cual organiza el ensamblaje de los microtúbulos. El transporte de nutrientes y de membranas a través del cilio se realiza mediante mecanismos de transporte intraflagelar (IFT). B) Tipos de fotorreceptores. Modificada de Wright y cols. [2010].

El segmento externo, es una prolongación celular que adopta la forma de bastón o de cono y se encuentra en íntimo contacto con el EPR. Esta porción alberga la maquinaria necesaria para la fototransducción. Está formado por discos membranosos

apilados en cuya bicapa lipídica se localizan los pigmentos visuales (ver más adelante). Las diferencias funcionales entre conos y bastones pueden ser, en parte, atribuidas a las diferencias estructurales en su segmento externo. En el segmento externo de los bastones, los discos de membrana están separados unos de otros y rodeados por membrana plasmática. El segmento externo de los conos está formado por invaginaciones apiladas de la membrana plasmática [Mustafi y cols., 2009]. Como resultado, mientras que los discos de los bastones están aislados del espacio extracelular por la membrana plasmática, los discos de los conos están abiertos a la matriz extracelular (Figura 1.4). Esta configuración de los segmentos externos de los conos incrementa considerablemente la superficie de la membrana de los discos y el ratio superficie-volumen de los conos. Se cree que la estructura continua y abierta del segmento externo de los conos favorece las reacciones de fototransducción y el metabolismo y asegura el transporte rápido de material entre los conos y la matriz interfotorreceptora [Wright y cols., 2010]. Cada hora se añaden de uno a tres discos nuevos en la base del segmento externo, mientras que los discos viejos son fagocitados por las células del EPR.

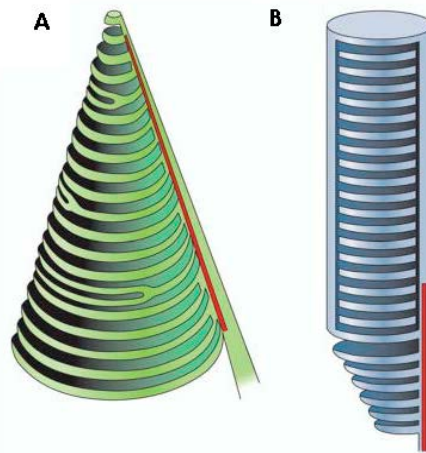


Figura 1.4 - Estructura del segmento externo de los conos y bastones.

Los discos de los conos no son únicas evaginaciones completamente separadas de la membrana, sino que mantienen conexión unos con otros y están abiertos a la matriz extracelular. Además el axonema del cilio (línea roja) se extiende a lo largo de la longitud completa del segmento externo del cono. B| Los bastones muestran discos individuales que no mantienen ninguna conexión entre ellos. El axonema de los cilios de los bastones no se extiende la longitud completa de su segmento externo. Modificada de [Mustafi y cols., 2009].

El cilio conector es un cilio sensorial primario modificado en una estructura especializada característico de los fotorreceptores de los vertebrados. Tiene una longitud de 200-500nm y constituye el único pasillo de transporte entre el segmento externo y el segmento interno de los fotorreceptores (Figura 1.3). El cilio conector está formado por

una parte central, llamado axonema y un cuerpo basal. El axonema de los cilios de los fotorreceptores está, a su vez, constituido por nueve dobletes de microtúbulos dispuestos en círculo. El cilio está anclado al cuerpo basal, el cual organiza el ensamblaje de los microtúbulos. El constante tráfico de proteínas y de membranas a través de cilio, mediante mecanismos de transporte intraflagelar hace de éste una estructura crucial para el correcto funcionamiento y la supervivencia de los fotorreceptores.

El segmento interno contiene el núcleo de la célula, el aparato de Golgi y las mitocondrias. En él tienen lugar la mayor parte de las reacciones metabólicas de la célula.

La terminal sináptica es el extremo proximal del fotorreceptor y se encuentra rellena de vesículas sinápticas. La terminal sináptica de los bastones es redondeada y se denomina esférula, mientras que la de los conos tiene forma triangular y se denomina pedículo. Tanto en las esférulas como en los pedículos se forman unas estructuras con un elemento central y uno o dos elementos laterales (diadas o triadas). El elemento central corresponde a dendritas invaginantes de las células bipolares y los elementos laterales son terminaciones axónicas de células horizontales [Wassle y Boycott, 1991]. Además de estos tipos de sinapsis, también existen sinapsis tipo “gap” o comunicantes entre conos y conos, y entre conos y bastones.

Además de estructuralmente, los bastones y los conos se diferencian funcionalmente en aspectos diversos como son la sensibilidad lumínica, la respuesta cinética y el periodo de adaptación [Fu y Yau, 2007, Kefalov y cols., 2010].

Los bastones detectan estímulos de luz de hasta un único fotón y son los encargados de la visión en condiciones escotópicas (poca luz/ visión nocturna). Aunque los bastones funcionan bien bajo condiciones de luz débil, éstos se saturan con facilidad y pierden su capacidad de respuesta bajo condiciones de luz moderada o fuerte. La respuesta de los bastones a la luz débil es lenta y, además, tras la exposición a luz fuerte, presentan un periodo de refracción más o menos largo [Wang y Kefalov, 2011].

Por el contrario, los conos son menos sensibles y funcionan mejor bajo condiciones de luz fuerte. Esto los hace especialmente indicados en condiciones fotópicas (muchas luz/ visión diurna). La respuesta de los conos a condiciones de poca luz es rápida, y además, se recuperan rápidamente de la exposición a luz intensa [Wassle y Boycott, 1991].

Los humanos y primates tienen retinas ocupadas predominantemente por bastones, con una proporción de 95:5, salvo en la fovea ocupada exclusivamente por conos (Figura 1.5). Al igual que los humanos, la retina de la mayoría de los vertebrados es bastón-dominante. Por ejemplo, la proporción de bastones a conos es de 65:35 en salamandra [Mariani, 1986], de 97:3 en ratón [Carter-Dawson y Lavail, 1979a, Carter-

Dawson y Lavail, 1979b], de 92:8 en vacas [Krebs y Krebs, 1982]. La retina de algunos animales está enriquecida en conos como por ejemplo, las gallinas con un 60% de conos [Meyer y May, 1973], y la ardilla de tierra con un 96% [West y Dowling, 1975]. Estos modelos son muy útiles para el estudio del funcionamiento específico de los conos. También la retina del embrión del pez cebra es considerada cono-dominante durante los primeros 15 días, ya que sus bastones no contribuyen a la visión antes de ese tiempo [Krebs y Krebs, 1982].

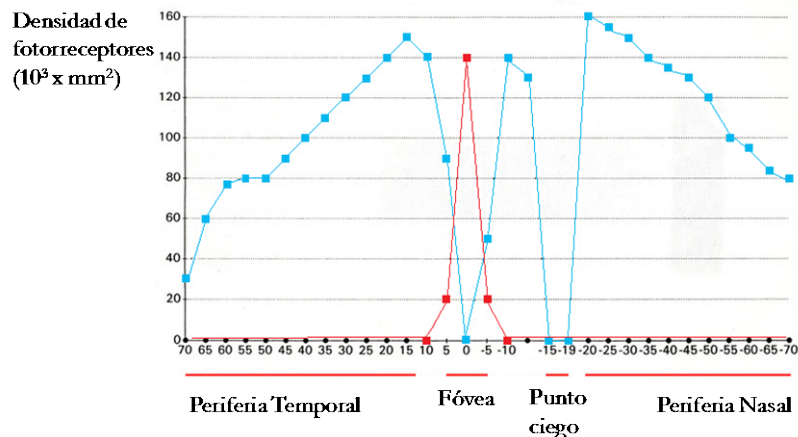


Figura 1.5 – Gráfica de distribución de cada tipo de fotorreceptores a lo largo del meridiano horizontal de la retina humana.

La línea roja representa el número de conos y la línea azul el de bastones. Cabe destacar la región denominada como “punto ciego” entre -15 y -19 del ángulo visual donde hay una ausencia total de fotorreceptores. Este es el punto donde los axones de las neuronas ganglionares abandonan la retina para formar el nervio óptico.

1.1.2.2 Pigmentos visuales

Los pigmentos visuales son las moléculas de los fotorreceptores que tienen la capacidad de captar los fotones de luz. Cada fotorreceptor contiene un tipo de pigmento visual. El pigmento visual de los bastones es la rodopsina mientras que los conos pueden presentar tres tipos de pigmento visual llamados fopsinas. Dependiendo del pigmento, los conos pueden ser: conos rojos, que presentan mayor sensibilidad para longitudes de ondas más largas; conos verdes, con mayor sensibilidad a las longitudes de ondas medias, y conos azules, con mayor sensibilidad a las longitudes de ondas más cortas. Estos tres tipos de conos dan lugar a la visión tricromática.

El pigmento visual consiste en un cromóforo fotosensible unido covalentemente a una proteína denominada opsina. La opsina pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteína-G [Palczewski, 2006] y consta de siete hélices transmembrana. Es la proteína más abundante de las membranas de los discos de los fotorreceptores tanto

de los bastones como de los conos. El cromóforo presente en los fotorreceptores humanos es el 11-*cis* retinal (11-*cis* RAL) [Darnall y Lythgoe, 1965].

La apo-opsina (opsina libre sin cromóforo) tiene una débil actividad constitutiva y puede iniciar la cascada de transducción [Cornwall y Fain, 1994]. En oscuridad, 11-*cis* RAL se une a la opsina mediante la formación de un enlace de base de Schiff con una lisina conservada de la estructura de la opsina (residuo K296 de la rodopsina humana). Esta unión da lugar a un holo-pigmento que está en estado inactivo [Darnall y Lythgoe, 1965]. En presencia de luz, el 11-*cis* RAL absorbe un fotón convirtiéndose en la forma todo-*trans* RAL. La fotoisomerización del retinoide induce una serie de rápidos cambios conformacionales en la molécula de opsina que la conducen al estado fisiológicamente activo (metarrodopsina II) en ~1 ms [Nathans, 1992, Hessel y cols., 2001, Hamm, 2001]. La metarrodopsina II activa la proteína G visual, transducina (Gt). Finalmente, metarrodopsina II pasa a una forma inactiva, metarrodopsina III, y tras la hidrólisis del enlace de base de Schiff se disocia en opsina libre y todo-*trans* RAL. Este paso transcurre en cuestión de minutos en los bastones mientras que en los conos tarda sólo unos segundos [Shichida y cols., 1994]. La inactivación de metarrodopsina II en los fotorreceptores se discute mas adelante (ver sección 1.1.4).

1.1.3 Cascada de la fototransducción

La fototransducción es el proceso mediante el cual la luz es convertida en cambios en el potencial eléctrico de membrana y tiene lugar en el segmento externo de los fotorreceptores. El mecanismo de la fototransducción está evolutivamente muy conservado en las diferentes especies [Arshavsky y cols., 2002, Lamb y Pugh, 1992] (Figura 1.6).

El segundo mensajero que transmite la señal lumínica en señal nerviosa es GMPc, el cual abre canales catiónicos asociado a GMPc localizados en la membrana plasmática del segmento externo de los fotorreceptores [Yau, 1994a]. En condiciones de oscuridad el canal catiónico se encuentra unido a GMPc y está abierto, permitiendo la continua entrada de Na⁺ y Ca²⁺ a través de la membrana plasmática del segmento externo. Esta corriente interna despolariza los fotorreceptores y mantiene constante la liberación del neurotransmisor (glutamato) por parte de las terminales sinápticas de los fotorreceptores. La concentración de GMPc en el segmento externo se mantiene constante por el equilibrio existente entre su síntesis por parte de la enzima guanilato ciclasa (GC) y su hidrólisis mediada por la fofosdiesterasa (PDE). Bajo condiciones de luz, la metarrodopsina II activa a la proteína G transducina, la cual activa a PDE. La PDE activada hidroliza el GMPc a GMP. La disminución en la concentración citosólica de GMPc hace que el unido a los canales catiónicos se suelte provocando su cierre y, en

consecuencia, la hiperpolarización de la membrana del fotorreceptor y la disminución en la liberación de glutamato. De esta manera la señal lumínica es convertida en señal nerviosa que se transmite a la neurona postsináptica [Lamb y Pugh, 2006, Yau y Hardie, 2009]. Además la disminución de Ca^{2+} intracelular es esencial para la adaptación a la luz y para la recuperación tras una estimulación luminosa [Yau, 1994b].

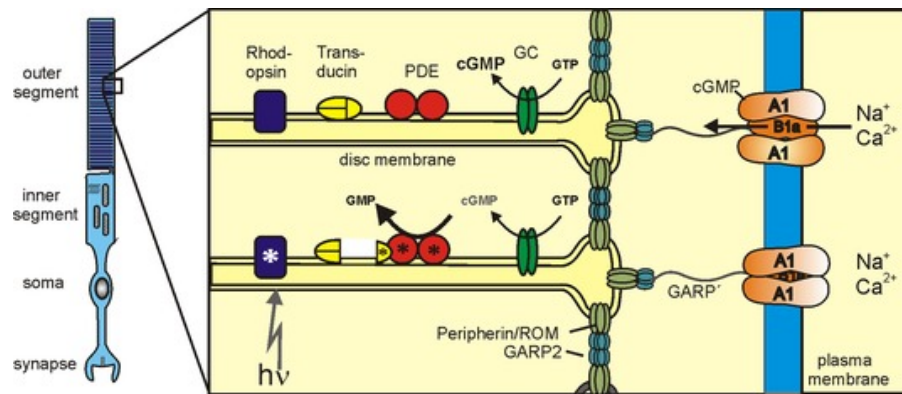


Figura 1.6 – Cascada de fototransducción en el segmento externo de los bastones.

Los canales dependientes de GMPc en la membrana plásmica (con sus subunidades CNGA1 y CNGA2) están conectados con los discos intracelulares a través del dominio GARP (glutamic acid-rich protein). GC: guanil ciclase, PDE: fosfodiesterasa, ROM: Proteína del segmento externo de los bastones. La estimulación lumínica lleva a un descenso en la concentración de GMPc intracelular que provoca el cierre de los canales CNG. Modificada de Frings [2012].

Para preservar la capacidad de reacción de los fotorreceptores, la fototransducción en el segmento externo debe finalizar con la inactivación de los componentes implicados, incluyendo la metarrodopsina II, transducina y fosfodiesterasa y finalmente, recuperar el nivel de GMPc.

La inactivación de la metarrodopsina II se lleva a cabo por la acción de la enzima rodopsina quinasa (RK) [Kuhn y Wilden, 1987, Whitlock y Lamb, 1999]. La fosforilación de la rodopsina incrementa fuertemente su afinidad por la arrestina o S-antigen (SAG), que por lo tanto, compite con la transducina. La arrestina forma parte de un grupo de proteínas cuya función es mediar la inactivación de receptores acoplados a proteína G. Mientras que la fosforilación es obligatoria para una recuperación completa, la unión a arrestina acelera la fase de recuperación. Este proceso se encuentra regulado por una proteína denominada recoverina que suprime la actividad de la RK en presencia de Ca^{2+} , ya que en concentraciones elevadas de Ca^{2+} la RK 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.

Debido a los cambios conformacionales en metarrodopsina II el enlace de base de Schiff retinil-lisina se vuelve más accesible al agua y por tanto, más susceptible a la hidrólisis. Metarrodopsina II también puede descomponerse en opsina libre y todo-*trans*

RAL o convertirse en metarrodopsina III inactiva, la cual, finalmente se disocia en opsina libre y retinoide [Kolesnikov y cols., 2003]. Cabe destacar que esta descomposición espontánea es substancialmente más lenta que la inactivación de metarrodopsina II por acción de RK y arrestina [Imai y cols., 2007].

1.1.4 El ciclo visual

El ciclo visual es el conjunto de reacciones enzimáticas por las cuales se regenera el cromóforo retinal que ha sido previamente empleado para la detección de luz en los fotorreceptores. Dado que el cromóforo retinal se libera en forma del isomero *todo-trans* RAL, el proceso de regeneración que tiene lugar en la oscuridad conlleva la isomerización de la forma *trans* (Figura 1.7).

Para ello, el *todo-trans* RAL es transportado por la proteína ABCR (*ATP-Binding Cassette transporter, Retina-specific*) desde la cara luminal a la citoplasmática de la membrana. A continuación el *todo-trans* RAL se reduce pasando a la forma alcohol, *todo-trans* retinol, por acción de la enzima RDH12 (*todo-trans* retinol deshidrogenasa 12), el cual difunde hacia el EPR unido a la proteína IRBP (Proteína interfotoreceptora de unión a retinoide). Posteriormente es esterificado (*todo-trans* retinil éster), por acción de la enzima LRAT (Lecitin retinol aciltransferasa) y la proteína CRBP (Proteína celular de unión a retinol) que favorece la interacción entre el *todo-trans* retinol y la enzima LRAT. La forma esterificada se transforma en 11-*cis* retinol por la acción de la proteína RPE65 (Proteína específica del epitelio pigmentario de retina, 65-kd) y posteriormente a la forma activa 11-*cis* RAL por la proteína 11-*cis*RDH (11-*cis* Retinaldehído deshidrogenasa) y la chaperona de unión RLBP1 también llamada CRALBP (Proteína celular de unión a retinaldehído), finalizando así el ciclo de reciclaje del cromóforo de la rodopsina.

Otro proceso que restaura el pigmento visual es el reciclaje continuo de los discos del segmento externo del fotorreceptor. Dependiendo de las especies después de 5-80 días los discos del segmento externo del fotorreceptor son reciclados y fagocitados por las células del epitelio pigmentario. La síntesis neta de rodopsina parece depender de la intensidad de luz, de manera que el número de moléculas por disco aumenta para garantizar la correcta densidad de moléculas de rodopsina en los momentos de alta intensidad de luz.

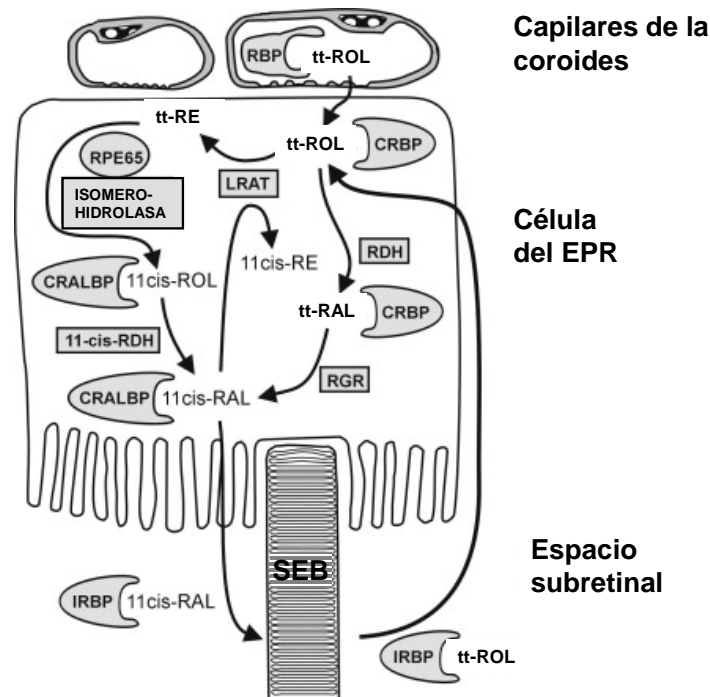


Figura 1.7 – El ciclo visual.

Regeneración del cromóforo retinal en el interior y alrededor de la célula del epitelio pigmentario de retina (EPR). SEB= Segmento externo del bastón; 11cis-ROL = 11-*cis* retinol; 11cis-RAL = 11-*cis* retinal; 11cis-RE = 11-*cis* retinil éster; tt-ROL = todo-*trans* retinol; tt-RE = todo-*trans* retinil éster; tt-RAL = todo-*trans* retinal; RGR = receptor acoplado a proteína G del epitelio pigmentario de retina; RBP = Proteína sérica de unión a retinol, CRBP = Proteína celular de unión a retinol, CRALBP = proteína celular de unión a retinal; RDH = todo-*trans* retinol deshidrogenasa; 11-*cis* RDH = retinol deshidrogenasa específica para 11-*cis* retinol; IRBP = Proteína de la matriz interfotoreceptora de unión a retinoides. Adaptado de La Cour y Tezel [2005]

La retina nos proporciona una visión sumamente sensible, que está basada en la integridad de una única célula, los fotorreceptores. El adecuado funcionamiento retiniano requiere un balance preciso entre los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular programada (o apoptosis) de los fotorreceptores. El gran requerimiento energético de los fotorreceptores, su complejidad estructural y su alta especificidad hacen de ellos unas células extremadamente vulnerables a su degeneración. Determinadas mutaciones genéticas o factores ambientales pueden activar vías específicas para inducir la apoptosis en los fotorreceptores contribuyendo al desarrollo de numerosas enfermedades distróficas y degenerativas de la retina. La razón por la cual la afectación de un amplio rango de funciones celulares converge en la muerte de los fotorreceptores sigue constituyendo un enigma. A continuación se describen las distrofias hereditarias de retina, y los aspectos genéticos de las mismas. Posteriormente, se muestra un resumen de algunas de las estrategias empleadas en el diagnóstico molecular de estas enfermedades.

1.2 DISTROFIAS HEREDITARIAS DE RETINA

Las distrofias hereditarias de retina (DHR) son un conjunto de enfermedades degenerativas, y generalmente progresivas, causadas por la afectación primaria de los fotorreceptores, que ocurren en 1 de cada 3.000 individuos [Wright y cols., 2010].

Las DHR se pueden clasificar en base a si afectan predominantemente los bastones (Ej. Retinosis Pigmentaria, RP; Ceguera nocturna congénita estacionaria, CNCE), a los conos (Ej. Distrofia de conos, DC; distrofia de conos y bastones, DCB; alteración en la visión de los colores, AVC; Distrofia macular, DM o enfermedad de Stargardt, STGD) o causan la afectación generalizada de los fotorreceptores (Ej. Amaurosis congénita de Leber, ACL) [Hamel, 2006, Berger y cols., 2010] (Figura 1.8).

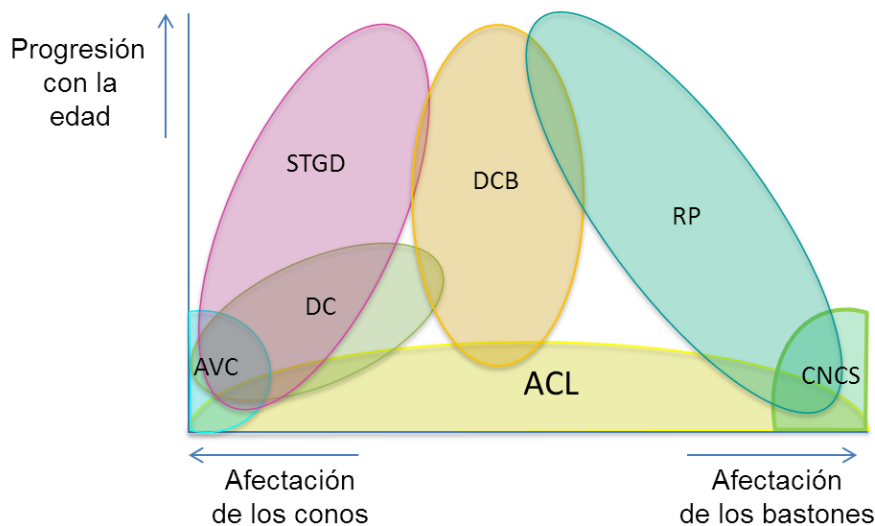


Figura 1.8 – Solapamiento fenotípico entre DHR.

Los pacientes con alteraciones en la visión de los colores (AVC) muestran un defecto aparentemente estacionario en el cual están implicados principalmente los conos. A estadios más avanzados, la distrofia de conos (DC) apenas puede distinguirse de la distrofia de conos y bastones (DCB). Pacientes con enfermedad de Stargardt (STGD) de edades tardías muestran defectos en la periferia similares a los pacientes afectados de DCB. Pacientes con retinitis pigmentosa (RP) inicialmente muestran ceguera nocturna, seguida de visión de túnel debido a defectos en los bastones que muy frecuentemente progresa a la ceguera total cuando se produce la afectación de los conos. En pacientes con amaurosis congénita de Leber (ACL) pueden afectarse los dos tipos de fotorreceptores, las células de Müller o las del EPR, y por ello, puede apreciarse tanto solapamiento clínico como genético con la DC, la DCB o la RP. Pacientes con ceguera nocturna congénita estacionaria (CNCE) muestran un defecto bastón-específico. Modificada de Neveling y cols. [2012b]

Aunque todas las DHRs han sido descritas como entidades clínicas distintas, no siempre son fácilmente distinguibles ya que las características clínicas de algunas de ellas

pueden solaparse, tanto en etapas tempranas como tardías de la enfermedad [Estrada-Cuzcano y cols., 2012b, Neveling y cols., 2013].

Además, acompañando a este solapamiento clínico, se ha descrito un importante solapamiento genético [Berger y cols., 2010] (Figura 1.9). Esta heterogeneidad clínica y genética constituye el principal obstáculo para establecer correlaciones genotipo-fenotipo y por tanto, poder desentrañar las bases etiopatogénicas de las DHR.

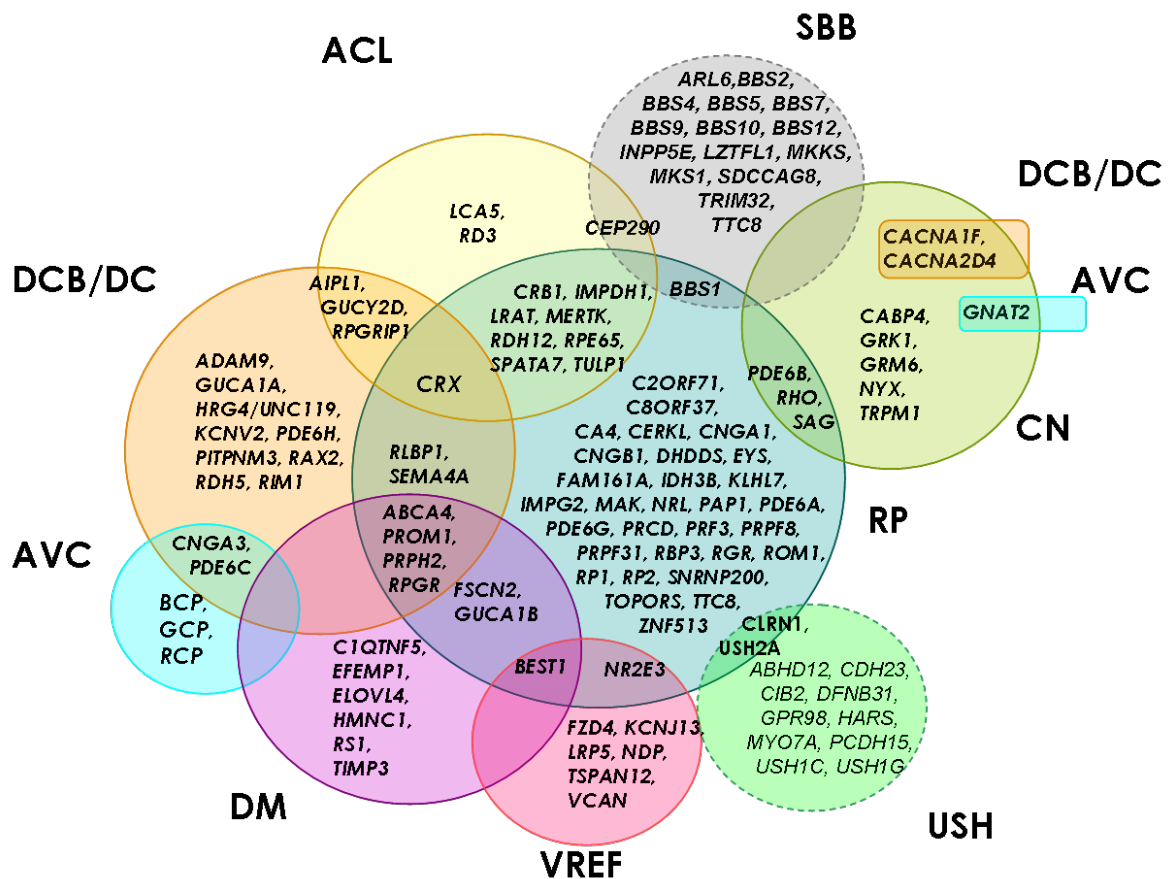


Figura 1.9 – Solapamiento genético entre las distintas DHR.

Cada uno de los genes implicados en la aparición de las DHR no sindrómicas: Retinosis pigmentaria (RP), Ceguera nocturna (CN), Alteración en la visión de los colores (AVC), Distrofia de conos y bastones/ Distrofia de conos (DCB/DC), Amaurosis congénita de Leber (ACL), distrofia macular (DM), vitreorretinopatía exudativa familiar (VREF) y DHR sindrómicas (borde punteado): Síndrome de Usher (USH) y síndrome de Bardet Biedl (SBB). Modificado de Berger y cols. [2010].

La elevada heterogeneidad genética de las DHR es posiblemente la mayor detectada jamás entre las enfermedades mendelianas, lo que se traduce en una alta frecuencia de portadores entre la población general. Aunque cada mutación es extremadamente rara, como hay tantos genes y tantas mutaciones, en conjunto puede llegar a ser común presentar una mutación patológica en un gen de DHR en uno de los alelos. Se estima que aproximadamente un 22% de la población general es portador de una mutación nula en un gen DHR [Nishiguchi y Rivolta, 2012].

Como se ha comentado anteriormente, casi todas las mutaciones causales asociadas a DHR son raras (frecuencia del alelo menor, *Minor Allele Frequency*, $MAF < 0,01$) y la mayoría de los genes asociados tienen cientos de alelos de enfermedad. Sin embargo, en determinadas circunstancias alguno predomina, por ejemplo, la mutación c.2299delG de *USH2A* causa un porcentaje substancial de los casos de síndrome de Usher (USH), pero es aún rara en la población general ($MAF < 0,01$) [Hartong y cols., 2006, Van Wijk y cols., 2004, Dreyer y cols., 2000]. Son pocas las variantes comunes que son responsables de la degeneración de los fotorreceptores. Un ejemplo es un alelo común en el gen *RPGRIPL*, p.A229T, el cual aumenta la probabilidad de que se produzca la degeneración de los fotorreceptores en combinación con otras mutaciones que causan ciliopatías [Khanna y cols., 2009]. Otra variante común se encuentra en el gen *PRPF31*, la cual se ha sugerido que actúa modificando la penetrancia en formas dominantes de RP [Vithana y cols., 2003]. La baja penetrancia o los genes modificadores son difíciles de identificar comparados con los alelos de alta penetrancia, pero su papel en la variabilidad fenotípica es importante. Es incluso más complicado encontrar modificadores fenotípicos poco frecuentes, aunque los análisis del interactoma han sido capaces de identificar alelos modificadores del fenotipo en el SBB y ciliopatías relacionadas [Beales y cols., 2003, Badano y cols., 2003].

Así pues, cientos de alelos raros que pueden estar presentes en decenas de genes distintos, convergen en la aparición del mismo fenotipo. Esto sugiere la analogía de una larga cadena con muchos eslabones, cualquiera de los cuales puede romperse o debilitarse para causar o predisponer a la degeneración de los fotorreceptores.

1.2.1 Retinosis Pigmentaria

1.2.1.1 Introducción

El término Retinitis Pigmentosa (RP; MIM #268000) fue empleado por Donders en 1857 para describir aquellas formas de ceguera en las que se observaba movilización pigmentaria en forma de espícula ósea en el fondo de ojo. Hoy en día, aunque se reconoce que la expresión Retinitis Pigmentosa es semánticamente incorrecta, puesto que es una patología hereditaria y no inflamatoria, sigue siendo ampliamente aceptada y utilizada para referirse a las distrofias que comienzan en la retina periférica y progresan hacia la mácula [Inglehearn, 1998].

Las tres características más sobresalientes de la RP son su carácter hereditario, la evolución progresiva y no tener, en el momento actual, un tratamiento ni paliativo ni curativo, lo que conduce a la pérdida parcial o total de la visión [Rivolta y cols., 2002b].

1.2.1.2 Epidemiología

La RP es la distrofia de retina más común, constituyendo aproximadamente la mitad de todos los casos de DHR [Daiger y cols., 2013]. Pertenece al grupo de las llamadas enfermedades raras. Los estudios realizados en diferentes poblaciones han permitido estimar una prevalencia mundial de 1 de cada 4.000 personas, constituyendo un total de más de un millón de individuos afectados en todo el mundo [Haim, 2002, Hamel, 2006, Hartong y cols., 2006]. En España la incidencia de RP se estima en 1/2.500-3.000 recién nacidos vivos [Ayuso y cols., 1997].

1.2.1.3 Aspectos clínicos de la Retinitis Pigmentosa

La RP presenta una gran heterogeneidad clínica. Tanto la edad de inicio como la progresión de la enfermedad varían de forma significativa de unos pacientes a otros, incluso dentro de la misma familia [Ayuso y Millan, 2010]. En la mayoría de los pacientes de RP los síntomas clínicos aparecen ya en la adolescencia. No obstante, la edad de aparición de los primeros síntomas parece estar relacionada con el tipo de herencia. Las formas ligadas al cromosoma X presentan síntomas a edades más tempranas, seguidas de las formas recesivas y posteriormente las dominantes. Según la edad de inicio, la RP se puede clasificar en juvenil y en típica.

La RP se suele presentar con hemeralopía o ceguera nocturna debido a la afectación primaria de los bastones, seguida de la pérdida progresiva de campo visual periférico. Los pacientes suelen presentar lo que se conoce como visión de túnel debido a la preservación de los conos de la mácula. No obstante, conforme la enfermedad avanza, se afectan también los conos, lo cual da lugar a alteración de la visión diurna y de la agudeza visual, pudiendo llegar a la ceguera total después de varias décadas [Hartong y cols., 2006]. No se conocen los mecanismos que inducen la muerte de los conos tras la muerte de los bastones, pero es probable que la viabilidad de estas células este mediada por factores de supervivencia [Huang y cols., 1993, Lavail y cols., 1998, Mohand-Said y cols., 1998].

El fondo de ojo característico de un paciente de RP suele presentar atenuación de los vasos sanguíneos de la retina, palidez del disco óptico y depósitos de pigmentos. Dichos pigmentos proceden de las células afectadas del epitelio retinal y se acumulan en forma de espículas óseas en la periferia de la retina [Phelan y Bok, 2000] (Figura 1.10).

El deterioro progresivo de la función retiniana se evalúa mediante el electroretinograma (ERG), herramienta fundamental para el diagnóstico y clasificación de la RP. El ERG consiste en medir la respuesta del fotorreceptor cuando se someten a estímulos luminosos, tanto el fotorreceptor adaptado a la oscuridad (ERG escotópico), como del adaptado a un determinado nivel de luz (ERG fotópico). El ERG escotópico

mide de forma selectiva la respuesta de los bastones, mientras que el fotópico mide la respuesta de los conos. Existe otro ERG denominado mesópico que detecta la respuesta de ambos tipos de fotorreceptores y consiste en la estimulación de la retina adaptada a la oscuridad con destellos de luz blanca brillante.

En los pacientes con RP típica el ERG escotópico se encuentra alterado e incluso abolido y muestran una pérdida proporcional de fotorreceptores y de los componentes posteriores a éstos [Phelan y Bok, 2000].

En la mayoría de los casos, la RP se manifiesta como una enfermedad no sindrómica cuyos síntomas están confinados al ojo. Sin embargo, en un 20-30% de los casos, la RP se encuentra asociada a otras alteraciones sistémicas (RP sindrómica) (Ver *Sección 1.2.2 Síndromes asociados a RP*).

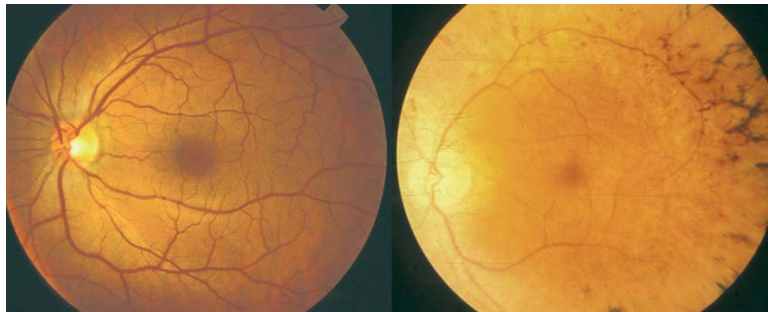


Figura 1.10 – Imagen del fondo de ojo.

Comparativa entre un individuo sano (Izq.) y un afecto de RP (Dcha.). En esta imagen se puede observar la palidez del disco óptico, atenuación de los vasos sanguíneos y depósitos de pigmento en forma de espícula ósea en la periferia.

1.2.1.4 Aspectos genéticos de la Retinitis Pigmentosa

1.2.1.4.1 Modos de herencia

La mayoría de los casos descritos de RP son monogénicos, aunque existen algunas familias que muestran un patrón de herencia más complejo. En un estudio multicéntrico llevado a cabo en 503 familias españolas afectas de RP no sindrómicas [Ayuso y cols., 1995], se establecieron las frecuencias relativas de las distintas formas de RP. La forma autosómica recesiva (RPar) constituye el 39%, la autosómica dominante (RPad) el 12% y la RP ligada al cromosoma X (RPLX) el 4%. Los casos aislados o esporádicos (RPe) suman el 41%. El 4% restante corresponde a familias afectas de RP que no pueden ser englobadas en ninguna de las categorías anteriores. En RP también se han descrito otros tipos de herencia no mendeliana como herencia mitocondrial [Dryja y Li, 1995, Smith y cols., 1999, Pieczenik y Neustadt, 2007] digenismo entre los genes *ROM1* y *RDS-Periferina* [Kajiwara y cols., 1994, Dryja y cols., 1997] y disomía uniparental con

mutaciones en *USH2A* [Rivolta y cols., 2002b], *RPE65* y *MERTK* [Thompson y cols., 2002].

1.2.1.4.2 Heterogeneidad genética

La RP es el arquetipo de enfermedad monogénica con extremada heterogeneidad genética [Hims y cols., 2003]. La RP presenta tanto heterogeneidad alélica como no alélica. La heterogeneidad alélica hace referencia a la existencia de mutaciones diferentes en el mismo gen que producen el mismo o distintos fenotipos (series alélicas). La heterogeneidad no alélica o de *locus* hace referencia a la implicación de diversos genes en el desarrollo de la misma enfermedad (Figura 1.9).

Hasta el momento, se han identificado más de 3.000 mutaciones distintas en 61 genes en pacientes con RP no sindrómica (Tabla 1.1) (<https://sph.uth.edu/retnet/>; <http://www.hgmd.org/> actualizado Nov-13), 41 de ellos responsables de la forma recesiva. A pesar de los intensos esfuerzos realizados en los últimos años, se estima que aproximadamente un tercio de los genes causantes permanecen aún sin identificar [Den Hollander y cols., 2010, Neveling y cols., 2012a].

Los genes que se encuentran más comúnmente mutados en RP son *EYS* ($\approx 15\%$) [Barragan y cols., 2010] y usherina (*USH2A*; $\approx 8\%$) en RPar [Hartong y cols., 2006], rodopsina (*RHO*; $\approx 8-10\%$) [Briscoe y cols., 2004] en RPad y *RPGR* ($\approx 74\%$) en RPLX [Daiger y cols., 2007]. *RPGR* tiene un exón en el extremo carboxi-terminal (ORF15) con una secuencia altamente repetitiva muy susceptible a la aparición de inserciones y deleciones de pequeño tamaño. Esta región “caliente” concentra más de la mitad de todas las mutaciones descritas en *RPGR* [Vervoort y cols., 2000, Shu y cols., 2008].

1.2.1.4.3 Correlaciones genotipo-fenotipo

A pesar de que la función de muchos de los genes asociados a la RP ha sido estudiada de manera exhaustiva, las correlaciones genotipo-fenotipo no son del todo bien comprendidas. Con frecuencia es difícil establecerlas debido a que mutaciones en mismo gen pueden conducir a un amplio rango de fenotipos distintos (Figura 1.9), incluso en determinados casos la misma mutación puede dar lugar a entidades clínicas distintas [Weleber y cols., 1993].

El gen del rodopsina (*RHO*) es uno de los genes de RP mejor estudiados. La gran mayoría de las mutaciones en *RHO* causan RP de herencia autosómica dominante y lo hacen mediante un mecanismo bien conocido que puede desembocar en una ganancia de función o un efecto dominante negativo de la proteína mutada [Mendes y cols., 2005]. Sin embargo, algunas mutaciones siguen un patrón de herencia autosómica recesiva. La razón de que una mutación en *RHO* p.E150K cause RP únicamente si está en estado de

homocigosis, mientras que un portador heterocigoto no desarrolle el fenotipo RP es más difícil de explicar [Kumaramanickavel y cols., 1994]. Es posible que estas mutaciones recesivas en *RHO* constituyan mutaciones excepcionalmente leves que son o bien toleradas por los fotorreceptores o bien conducen a la RP a edad más avanzada [Neidhardt y cols., 2006]. De hecho, la progresión de la enfermedad en pacientes con mutaciones en *RHO* es más lenta que en pacientes con mutaciones en *RPGR* [Sandberg y cols., 2007].

Como se ha mencionado anteriormente, *RPGR* es el gen que causa un mayor número de casos de RPLX recesivo por el cual el fenotipo no se transmite de varón a varón. No obstante, también se han descrito modos de herencia dominantes [Rozet y cols., 2002], así como otras degeneraciones de retina asociadas a este gen [Ayyagari y cols., 2002, Demirci y cols., 2002, Neidhardt y cols., 2008]. Además, hay algunos casos de mujeres portadoras que muestran signos de la enfermedad en un grado variable [Rozet y cols., 2002, Li y cols., 2005, Banin y cols., 2007]. Este efecto podría atribuirse a la naturaleza dominante de algunas mutaciones o a la inactivación no aleatoria del cromosoma X en el tejido afectado. Por todas estas razones, el diagnóstico clínico de la RP no es fácil, ya que en determinadas circunstancias la historia familiar y las características clínicas del paciente en el momento de la primera consulta no permiten asignar un diagnóstico clínico certero. Recientemente se ha publicado que al menos el 8% de las familias que recibieron un diagnóstico clínico provisional de RPad presentan mutaciones en genes de RPLX [Churchill y cols., 2013]. Igualmente, mutaciones en genes comúnmente asociados a síndromes de Usher o SBB puede causar RP no sindrómica [Riazuddin y cols., 2010, Khan y cols., 2011, Rivolta y cols., 2000, Estrada-Cuzcano y cols., 2012a].

El abordaje genético de los casos esporádicos es también complejo. Tradicionalmente, los casos de RPe se han considerado casos recesivos, con padres portadores no afectados. Esto ciertamente es así en muchos casos, pero hay excepciones. Al menos el 15% de los varones afectados de RPe presentan mutaciones en los genes de RPLX, *RPGR* o *RP2* [Branham y cols., 2012]. Además, las mutaciones *de novo* en genes de herencia dominante son responsables de al menos 1-2% de los casos esporádicos [Neveling y cols., 2012a, Sohocki y cols., 2001].

Toda esta problemática puede resultar confusa para el paciente y posiblemente requiera una explicación más detallada y consejo genético. En algunos casos, será necesario redefinir la enfermedad familiar. Así, integrar el fenotipo clínico, la historia familiar y los hallazgos genéticos se está convirtiendo en nuevo paso crucial en el diagnóstico de las distrofias hereditarias de retina.

1.2.1.4.4 Genes responsables de la Retinitis Pigmentosa

Las alteraciones genéticas responsables de las distrofias de retina pueden afectar a casi todos los aspectos de la estructura y funciones celulares. Las mutaciones que afectan a funciones específicas de los fotorreceptores como la fototransducción o el ciclo visual, son sólo algo más numerosas que las mutaciones que afectan a funciones más generales de la célula como el los mecanismo de *splicing*, el metabolismo lipídico o la matriz extracelular [Wright y cols., 2010]. El grupo de genes que con mayor frecuencia causan la muerte de los fotorreceptores es el que se encarga de la función ciliar (proteínas localizadas en el cilio conector y que participan en mecanismos de IFT). La tabla 1.1 resume los genes identificados hasta la fecha responsables de la RP, ordenados por tipo de herencia, así como su localización cromosómica, su función, otros fenotipos asociados y el número de mutaciones registradas en las bases de datos.

1.2.2 Síndromes asociados a RP

Se han descrito más de 30 síndromes diferentes asociados a RP [Hartong y cols., 2006], entre los que destacan dos: el síndrome de Usher (USH) y el síndrome de Bardet-Biedl (SBB).

1.2.2.1 El síndrome de Usher

El síndrome de Usher (USH) es la forma sindrómica más frecuente y supone un 15-20% de todos los casos de RP recesiva. En este caso, la RP se encuentra asociada a pérdida auditiva, que puede ser profunda desde el nacimiento (tipo I), moderada no progresiva (tipo II) o de aparición más tardía y gradual (tipo III) [Bonnet y El-Amraoui, 2012].

El USH es considerado una enfermedad monogénica de herencia autosómica recesiva. Aunque, también se han descrito casos de herencia compleja como digenismo entre *PDZD7* y *GPR98* [Ebermann y cols., 2010]. Mutaciones en al menos 12 genes causan la aparición de uno de los tres tipos conocidos de USH [Lorenz y Preising, 2005, Reiners y cols., 2006] (<https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm#A-genes>). Dependiendo de la mutación, los genes del USH pueden causar RP sin pérdida auditiva [Rivolta y cols., 2002a, Bernal y cols., 2003, Aller y cols., 2004, Khan y cols., 2011] o sordera profunda sin RP [Liu y cols., 1997, Weil y cols., 1997, Bork y cols., 2001a, Astuto y cols., 2002a].

Tabla 1.1 – Genes implicados en la RP.

Nombre del gen	Símbolo del gen	Locus	Fenotipo	Función	Otros fenotipos asociados	Mutaciones
Carbonic anhydrase 4	<i>CA4</i>	17q23.2	RPad	---	–	6
Cone rod homeobox protein	<i>CRX</i>	19q13.32	RPad	Factor de transcripción	Distrofia de conos y bastones (ad), Amaurosis congénita de Leber (ar y ad)	51
Fascin homolog 2	<i>FSCN2</i>	17q25.3	RPad	Estructura celular	Distrofia macular (ad)	1
Guanylate cyclase activator 1B	<i>GUCA1B</i>	6p21.1	RPad	Fototransducción	Distrofia macular (ad)	3
Inosine monophosphate dehydrogenase 1	<i>IMPDH1</i>	7q32.1	RPad	Regulación del ciclo celular	Amaurosis congénita de Leber (ad)	14
Kelch-like 7	<i>KLHL7</i>	7p15	RPad	Degradación de la proteína Ubiquitin-proteasoma	–	3
Pim1 associated protein 1	<i>PAP1</i>	7p14.3	RPad	Mecanismos de maduración del ARNm	–	
Pre-mRNA processing factor 3 homolog	<i>PRPF3</i>	1q21.2	RPad	Mecanismos de maduración del ARNm	–	3
Pre-mRNA processing factor 31 homolog	<i>PRPF31</i>	19q13.42	RPad	Mecanismos de maduración del ARNm	–	65
PRP6 pre-mRNA processing factor 6 homolog	<i>PRPF6</i>	20q13.33	Rpad	Mecanismos de maduración del ARNm		2
Pre-mRNA processing factor 8 homolog	<i>PRPF8</i>	17p13.3	RPad	Mecanismos de maduración del ARNm	–	21
Peripherin 2	<i>PRPH2</i>	6p21.1	RPad	Estructura del segmento externo de los fotorreceptores	Distrofia macular (ad), Formas digénicas con ROM1, Distrofia macular adulta vitelliforme (ad)	123

Retinol dehydrogenase 12	<i>RDH12</i>	14q24.1	RPad	Fototransducción	Amaurosis congenita de Leber (ar)	66
Retinal outer segment membrane protein 1	<i>ROM1</i>	11q12.3	RPad	Estructura celular	Formas digénicas con PRPH2	11
Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4A	<i>SEMA4A</i>	1q22	RPad	Desarrollo y mantenimiento de la retina	Distrofia de conos y bastones (ad)	3
Small nuclear ribonucleoprotein 200kDa (U5)	<i>SNRNP200</i>	2q11.2	RPad	Mecanismos de maduración del ARNm	–	7
Topoisomerase I binding, arginine/serine-rich	<i>TOPORS</i>	9p21.1	RPad	–	–	8
Bestrophin-1	<i>BEST1</i>	11q12.3	RPad y RPar	Ciclo visual	Vitreoretinocoroidopatía (ad); Distrofia macular Best (BMD) (ad)	232
Nuclear receptor subfamily 2, group E, member 3	<i>NR2E3</i>	15q22.32	RPad y RPar	Factor de transcripción	Síndrome Aumentado del S-Cono (ar), Síndrome de Goldmann-Favre	45
Neural retina leucine zipper	<i>NRL</i>	14q11.2	RPad y RPar	Desarrollo y mantenimiento de la retina. Factor de transcripción	Puede incluir aglomeraciones de pigmento y preservación de la funciones de los conos azules	14
Retinal G protein coupled receptor	<i>RGR</i>	10q23.1	RPad y RPar	Metabolismo de la retina	Esclerosis coroidal (ad)	7
Rhodopsin	<i>RHO</i>	3q22.1	RPad y RPar	Fototransducción	Ceguera nocturna congénita estacionaria CSNB (ad)	161
Retinitis pigmentosa 1	<i>RP1</i>	8q12.1	RPad y RPar	Estructura ciliar	–	67
Retinal-specific ATP-binding cassette transporter (ATP-binding cassette subfamily A member 4)	<i>ABCA4</i>	1p22.1	RPar	Ciclo visual	Enfermedad de Stargardt(ar), Distrofia de conos y bastones (ar), Degeneración macular juvenil y tardía(ar), fundus flavimaculatus (ar);	680

ADP-ribosylation factor-like 2 binding protein	<i>ARL2BP</i>	16p13.3	RPar	Función ciliar	RP con situs inversus	2
chromosome 2 open reading frame 71	<i>C2orf71</i>	2p23.2	RPar	Metabolismo de la retina		13
chromosome 8 open reading frame 37	<i>C8ORF37</i>	8q22.1	RPar	---		4
Ceramide kinase-like	<i>CERKL</i>	2q31.3	RPar	Desarrollo y mantenimiento de la retina	–	8
clarin 1	<i>CLRN1</i>	3q25	RPar	Desarrollo y mantenimiento de la retina	Síndrome de Usher, tipo 3 (ar)	23
Cyclic nucleotide-gated channel alpha 1	<i>CNGA1</i>	4p12	RPar	Fototransducción	–	8
Cyclic nucleotide-gated channel beta 1	<i>CNGB1</i>	16q13	RPar	Fototransducción	–	6
Crumbs homolog 1	<i>CRB1</i>	1q31.3	RPar	Matriz extracelular	Amaurosis congénita de Leber (ar), Atrofia coriorretinal paravenosa pigmentada (ad), retinitis pigmentosa (ar) con preservación para-arteriolar del RPE, los síntomas pueden incluir vasculopatía exudativa tipo Coat y disminución del grosor de la retina con estructura anormal	183
dehydrodolichol diphosphate synthase	<i>DHDDS</i>	1p36.11	RPar	Metabolismo de la retina		1
ER membrane protein complex subunit 1	<i>EMC1</i>	1p36.13	RPar	---		
Eyes shut homolog	<i>EYS</i>	6p12	RPar	Estructural. Matriz extracelular	–	118
family with sequence similarity 161 member A	<i>FAM161A</i>	2p15	RPar	Desarrollo y maduración de los fotorreceptores		6
G protein-coupled receptor 125	<i>GPR125</i>	4p15.2	RPar	---		
isocitrate dehydrogenase 3, beta subunit; IDH3B	<i>IDH3B</i>	20p13	RPar	Ciclo visual		2

interphotoreceptor matrix proteoglycan 2	<i>IMPG2</i>	3q12.3	RPar	Organización de la matriz interfotorreceptora y mantenimiento del segmento externo		10
KIAA1549 protein	<i>KIAA1549</i>	7q34	RPar	---		
Lecithin retinol acyltransferase	<i>LRAT</i>	4q32.1	RPar	Ciclo visual	Amaurosis congenita de Leber (ar)	10
male germ cell-associated kinase	<i>MAK</i>	6p24	RPar	Ciclo celular		9
C-mer proto-oncogene tyrosine kinase	<i>MERTK</i>	2q14.1	RPar	Fagocitosis segmento externo de los fotorreceptores	Amaurosis congenita de Leber (ar)	27
NIMA (never in mitosis gene A)-related kinase 2	<i>NEK2</i>	1q32.3	RPar	Función ciliar		2
Phosphodiesterase 6A	<i>PDE6A</i>	5q33.1	RPar	Fototransducción	–	16
Phosphodiesterase 6B	<i>PDE6B</i>	4p16.3	RPar	Fototransducción	Ceguera nocturna congénita estacionaria CSNB (ad)	39
phosphodiesterase 6G, cGMP-specific, rod, gamma	<i>PDE6G</i>	17q25	RPar	Fototransducción		1
Progressive rod-cone degeneration	<i>PRCD</i>	17q25.1	RPar	–	–	2
Prominin 1	<i>PROM1</i>	4p15.32	RPar	Estructura celular	Retinitis pigmentosa con degeneración macular (ar); Distrofia macular tipo Stargardt (ad); Distrofia macular (ad); Distrofia de conos y bastones (ad)	9
Retinol binding protein 3	<i>RBP3</i>	10q11.22	RPar	Ciclo visual	–	2
Retinaldehyde-binding protein 1	<i>RLBP1</i>	15q26.1	RPar	Ciclo visual	Distrofia de conos y bastones (ar), retinitis punctata albescens (ar), Distrofia de conos y bastones de Terranova (ar)	20

Retinal pigment epithelium-specific protein 65kDa	<i>RPE65</i>	1p31.2	RPar	Ciclo visual	Amaurosis congenita de Leber (ar)	134
Arrestin, s-antigen	<i>SAG</i>	2q37.1	RPar	Fototransducción	Enfermedad de Oguchi (ar)	11
Spermatogenesis associated protein 7	<i>SPATA7</i>	14q31.3	RPar	---	Amaurosis congenita de Leber (ar)	15
tetratricopeptide repeat domain 8	<i>TTC8</i>	14q31.3	RPar	Función ciliar		14
Tubby like protein 1	<i>TULP1</i>	6p21.31	RPar	Desarrollo y mantenimiento de la retina	Amaurosis congenita de Leber (ar)	31
Usher syndrome 2A	<i>USH2A</i>	1q41	RPar	Estructural. Función ciliar	Síndrome de Usher, tipo 2a (ar)	392
zinc finger protein 513	<i>ZNF513</i>	2p23.3	RPar	Factor de transcripción		1
oral-facial-digital syndrome 1	<i>OFD1</i>	Xp22	RPLX	Función ciliar		127
Retinitis pigmentosa 2	<i>RP2</i>	Xp11.23	RPLX	Desarrollo y mantenimiento de la retina	–	76
Retinitis pigmentosa GTPase regulator	<i>RPGR</i>	Xp11.4	RPLX	Transporte intraflagelar	Distrofia de conos y bastones (XI), Distrofia macular atrófica (XI)	151

RPad: RP autosómica dominante; RPar: RP autosómica recesiva; RPLX: RP Ligada al cromosoma X; ---: Desconocido. <https://sph.uth.edu/retnet/>; accedido el 13-Nov-2013; <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> [Daiger y cols., 2013].

1.2.2.2 El síndrome de Bardet-Biedl

El síndrome de Bardet-Biedl (SBB), que abarca entre un 5-6% de todos los casos RP se engloba dentro de las llamadas ciliopatías [Badano y cols., 2006b] y afecta a 1 de cada 160.000 personas en Europa [Beales y cols., 1997]. Es un trastorno pleiotrópico caracterizado por un amplio rango de síntomas clínicos de expresión variable. Los signos primarios de la enfermedad son: RP, obesidad, polidactilia postaxial, trastornos renales, hipogonadismo en varones y dificultades de aprendizaje. Los signos secundarios son: retraso en el habla, retraso en el desarrollo, diabetes mellitus, anomalías en la dentición, anomalías cardíacas congénitas, braquidactilia/sindactilia, ataxia, mala coordinación y anosmia/hiposmia [Beales y cols., 1999, Forsythe y Beales, 2013].

El diagnóstico clínico de SBB requiere la presencia de al menos 4 signos primarios ó 3 primarios y 2 secundarios [Beales y cols., 1999, Rooryck y Lacombe, 2008, Putoux y cols., 2012]. El espectro de signos clínicos de SBB se solapa con otros de ciliopatías relacionadas como el síndrome de Joubert (JBTS; MIM 213300), la amaurosis congénita de Leber (ACL; MIM 204000), el síndrome de McKusick–Kaufman (MKKS; MIM 236700), el síndrome de Meckel–Gruber (MKS; MIM 249000), la nefronoptosis (NPH; MIM 256100), el síndrome orofaciodigital tipo 1 (OFD1; MIM 311200) y el síndrome de Senior–Løken (SLS; MIM 266900). Aunque cada uno es considerado como una entidad clínica distinta, en muchos casos es muy difícil asignar un diagnóstico clínico específico. Esto es de especial importancia en el diagnóstico de individuos de corta edad, quienes con frecuencia son diagnosticados RP ya que muchos de los signos extraoculares suelen aparecer a edades más avanzadas.

El SBB sigue generalmente un patrón de herencia autosómico recesivo, bajo el cual se han asociado mutaciones en 18 genes (<https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm#A-genes>). También se han descrito casos de herencia no mendeliana (trialelica) en pacientes que portaban tres mutaciones en los genes *BBS2* y *MKKS*. Este modo de herencia puede representar un modelo de transmisión intermedio entre las enfermedades mendelianas o monogénicas y las complejas [Katsanis y cols., 2001]. Además, uno de los mecanismos propuestos y demostrados para explicar la gran variabilidad clínica, inter e intrafamiliar que caracteriza a esta patología es la existencia de variantes en distintos *loci* BBS que interaccionan entre sí (epistásis) modulando la expresividad clínica de la enfermedad [Badano y cols., 2006a]. A estas variantes también se les conoce como alelos modificadores del fenotipo.

Recientemente se ha publicado que una mutación en el gen *BBS1* (p.M390R) es responsable de un amplio rango de fenotipos que van desde la RP no sindrómica al SBB

[Estrada-Cuzcano y cols., 2012a]. El solapamiento genético entre el SBB y otras ciliopatías, tanto sindrómicas como no sindrómicas, ha sido ampliamente descrito en la literatura [Schaefer y cols., 2011]. Por ejemplo, mutaciones en el gen *CEP290* se han asociado a la aparición de hasta seis entidades clínicas distintas [Zaghloul y Katsanis, 2009].

1.3 GENES ANALIZADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO

1.3.1 Genes asociados a DHR no sindrómicas

1.3.1.1 Casete de unión a ATP, Subfamilia A, miembro 4 (*ABCA4*)

El gen *ABCA4* (MIM 601691) fue identificado por Allikmets y cols. [1997] en la región p21-p13 del cromosoma 1 y está formado por 50 exones.

La proteína codificada, ABCR (o RmP; *Rim Protein*), tiene 2274 aa y se expresa específicamente en la retina. Se trata de una glicoproteína específica de la membrana de los discos de los segmentos externos de los bastones, cuya función está relacionada con el transporte de retinoides [Azarian y Travis, 1997, Sun y Nathans, 1997].

ABCA4 se caracteriza por presentar una gran heterogeneidad alélica, ya que mutaciones en *ABCA4* son responsables de la aparición de fenotipos distintos como son la enfermedad de Stargardt (STGD), fundus flavimaculatus (FFM) [Allikmets y cols., 1997, Stone y cols., 1998, Gerber y cols., 1998, Nasonkin y cols., 1998, Lewis y cols., 1999, Fukui y cols., 2002], la RPar [Cremers y cols., 1998, Martinez-Mir y cols., 1998, Fukui y cols., 2002, Klevering y cols., 2005, Klevering y cols., 2004] y la DCB [Cremers y cols., 1998, Maugeri y cols., 2000].

La combinación de las posibles mutaciones causales definirá el fenotipo y la severidad de la patología [Maugeri y cols., 1999, Paloma y cols., 2002, Klevering y cols., 2004].

Actualmente, se estima que las mutaciones de *ABCA4* son responsables del 2,9% de los casos de RPar [Daiger y cols., 2007].

1.3.1.2 Marco de lectura abierta 71 del cromosoma 2 (*C2orf71*)

El gen *C2orf71* (MIM 613428) fue identificado por Nishimura y cols. [2010] en la región cromosómica 2p24.1-p23.1.

La proteína codificada por este gen consta de 1288 aa y se expresa sobre todo en el ojo. Aunque su función no está totalmente esclarecida, parece que actúa en las modificaciones lipídicas post-traduccionales [Nishimura y cols., 2010].

Mutaciones en *C2orf71* son responsables de la RP tipo 54 (RP54) (MIM 613428). Se estima que su contribución a la aparición de la RPar es ~1% [Audo y cols., 2011].

1.3.1.3 Proteína similar a ceramida quinasa (*CERKL*)

El gen *CERKL* (MIM 608380) está localizado en el brazo largo del cromosoma 2, en la región q31.2 [Tuson y cols., 2004].

Presenta ocho isoformas distintas de las cuales cuatro son codificantes (a, b, c y d). La isoforma canónica es la “b” que consta de 14 exones y 558 aa. Las cuatro isoformas se expresan en retina de adulto, además de en riñón, pulmón, páncreas, cerebro, placenta e hígado. Dentro de la célula se localiza en el aparato de Golgi, aunque puede variar en función de los estímulos que actúen sobre ella [Bornancin y cols., 2005]. A pesar de su homología estructural con otras quinasas, no tiene actividad ceramida-quinasa. Parece ser que la sobreexpresión de *CERKL* protege a las células de la apoptosis en condiciones de estrés oxidativo [Bornancin y cols., 2005, Tuson y cols., 2009] por lo que podría ser importante para la respuesta al estrés y la protección de los fotorreceptores [Mandal y cols., 2013].

Mutaciones en *CERKL* son la causa de la RP tipo 26 (RP26) (MIM 608380) de herencia autosómica recesiva [Tuson y cols., 2004] y de DCB [Aleman y cols., 2009]. Se estima que este gen es responsable de la RPar en aproximadamente el 1% de las familias [Hartong y cols., 2006].

1.3.1.4 Subunidad α I del canal dependiente de nucleótido cíclico (*CNGA1*)

El gen *CNGA1* (MIM 613756) fue aislado por Dhallan y cols. [1992] a partir de la secuencia de retina bovina [Kaupp y cols., 1989]. Su localización cromosómica es 4p12 y consta de 11 exones y 690 aa.

El gen *CNGA1* codifica para la subunidad α de un canal catiónico asociado a un nucleótido cíclico. Los canales catiónicos dependientes de GMPc están constituidos por un heterodímero compuesto por dos subunidades homólogas, α (*CNGA1*) y β (*CNGB1*; 600724), cada una con una región N- y C-terminal, seis dominios transmembrana, y un poro en la posición central. Se expresa específicamente en el segmento externo de los bastones de la retina y participa en la fototransducción [Cukkemane y cols., 2011].

Defectos en *CNGA1* son responsables de la RPar tipo 49 (RP49) (MIM 613756) y se estima que es responsable del 2% de los casos en población española [Paloma y cols., 2002].

1.3.1.5 Proteína homóloga I de Crumbs (*Drosophila*) (*CRB1*)

El gen *CRB1* (MIM 604210) se localiza en la región 1q31-q32.1. Fue clonado por Den Hollander y cols. [1999] a partir de ADNcs que se expresan específicamente o preferencialmente de la retina humana.

La proteína fue nombrada *CRB1* de *Crumbs homolog-1* ya que comparte el 35% de identidad con la proteína 'crumbs' (*CRB*) de *Drosophila melanogaster* [Den Hollander y cols., 2001b]. El gen *CRB1* sufre un proceso de *splicing* alternativo que resulta en 4 isoformas distintas. La isoforma 1 es la canónica y consta de 1.406 aa. Se expresa preferentemente en retina, cerebro y testículo. En tejido fetal se expresa en cerebro y ojo. Subcelularmente se localiza en la zona apical de las uniones adherentes de la membrana limitante externa de la retina [Kantardzhieva y cols., 2005]. La isoforma 2 se secreta al medio extracelular y se le ha atribuido una función en la morfogénesis de los fotorreceptores y en el mantenimiento de la polaridad celular y la adhesión [Pellikka y cols., 2002] .

Distintas mutaciones en *CRB1* se han asociado a varias distrofias de retina como la RPar tipo 12 (RP12) (MIM 600105) [Den Hollander y cols., 1999], RP con vasculopatía exudativa tipo Coats [Den Hollander y cols., 2001a], RP con preservación del epitelio pararteriolar (PPRPE), ACL tipo 8 (LCA8) (MIM 613835)[Den Hollander y cols., 2001a, Lotery y cols., 2001] y la atrofia corioretinal paravenosa pigmentada (PPCRA) [Mckay y cols., 2005] (MIM 172870) .

Las mutaciones descritas se localizan en casi todos los dominios del gen, pero la mayoría de ellas se encuentran entre el 2º y 3º dominio tipo laminina-G (Figura 1.11). Se ha postulado que las mutaciones nulas en ambos alelos (ej. p.K801* en homocigosis) dan lugar a la aparición del fenotipo ACL, mientras que las mutaciones con pérdida de sentido o que afectan a sitios de *splicing* dan lugar a RP y PPRPE y RP con Coats. No obstante, es bastante probable que el grado de funcionalidad que conserva la proteína *CRB1* mutada y la severidad de la enfermedad estén influenciados por el bagaje genético del individuo [Den Hollander y cols., 2004].

CRB1 es responsable del 1% de los pacientes RPar [Hartong y cols., 2006], aunque la contribución del gen es mucho mayor, aproximadamente del 20% en población española, cuando nos referimos a pacientes afectados de ACL [Vallespin y cols., 2007].

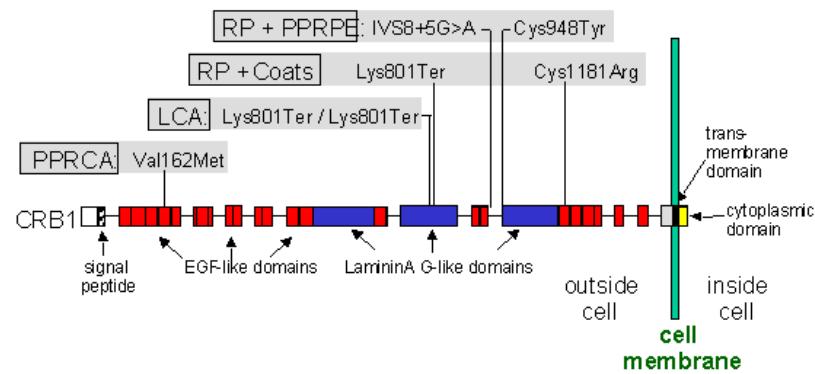


Figura 1.11 – Representación esquemática del gen *CRB1* y sus dominios proteicos.

Algunas de las mutaciones identificadas en pacientes afectados de distintas distrofias de retina. Modificada de Wijnholds y cols. [2008].

1.3.1.6 Proteína homóloga de eyes shut (*Drosophila*) (*EYS*)

El gen *EYS* (MIM 612424) está localizado en la región pericentromérica del cromosoma 6 (6 q12) y es el gen responsable del locus RP25. Con sus 2Mb de secuencia genómica es el gen más grande expresado en retina y el quinto más grande del cuerpo humano.

El locus RP25 fue identificado por Ruiz y cols. [1998] tras un estudio de ligamiento en familias españolas afectas de RPar. En dicho estudio se concluye que el 10%-20% de las familias analizadas podrían estar ligadas a dicho locus. Estos datos fueron apoyados por trabajos en otras poblaciones que señalaban la gran contribución del locus RP25 a la RPar [Khaliq y cols., 1999]. Tras la evaluación de la secuencia genómica de un número considerable de genes candidatos [Li y cols., 2001, Barragan y cols., 2005a, Barragan y cols., 2005b, Abd El-Aziz y cols., 2005, Abd El-Aziz y cols., 2006, Barragan y cols., 2008b] y el refinamiento del locus por distintas estrategias [Barragan y cols., 2008a, Abd El-Aziz y cols., 2008a], se consiguió la identificación y caracterización del gen *EYS* [Abd El-Aziz y cols., 2008b].

La proteína codificada, SPAM, consta de 43 exones y 3.145 aa. Presenta una estructura compuesta por 28 dominios tipo EGF en la región N-terminal seguida de 5 dominios laminina-G entre los que se insertan más dominios EGF. También presenta un sitio de reconocimiento para un péptido señal y un dominio *coiled-coil* [Barragan y cols., 2010] (Figura 1.12). Se expresa en la matriz extracelular del segmento externo de los fotorreceptores y se cree que podría tener un papel estructural o en el mantenimiento de la integridad de los fotorreceptores.

El gen *EYS* se ha estudiado en distintas especies de insectos y se sabe que la proteína spam o spacemaker se expresa únicamente en el ojo de los insectos que tienen

un sistema de rabdómeros (fotorreceptores) abierto, en el cual los rabdómeros de cada omatidio se encuentran separados unos de otros por el espacio interrabdómeral. La pérdida completa de spacemaker hace que pasen de tener un sistema de ojos abierto a uno cerrado [Zelhof y cols., 2006].

Estudios en distintas poblaciones coinciden en señalar al gen *EYS* como el gen de mayor prevalencia en RPar [Abd El-Aziz y cols., 2010, Audo y cols., 2010, Bandah-Rozenfeld y cols., 2010, Huang y cols., 2010, Littink y cols., 2010b, Isackson y cols., 2011, Pieras y cols., 2011, Iwanami y cols., 2012]. En población española es responsable de más del 15% de los casos de RPar [Barragan y cols., 2010].

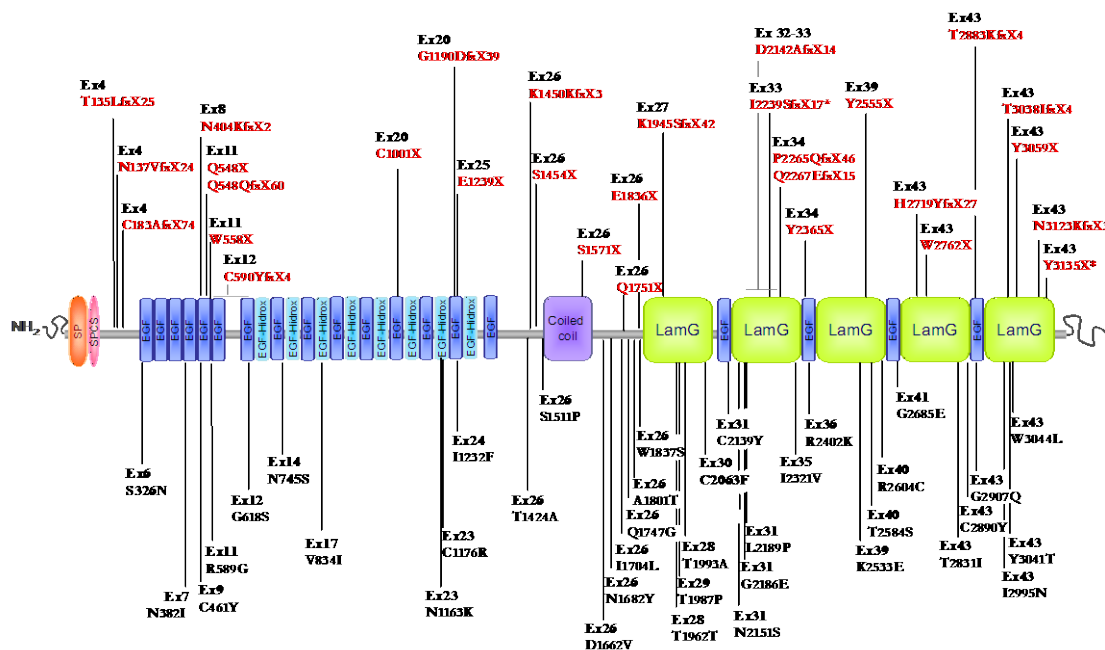


Figura 1.12 - Representación esquemática del gen *EYS*. Las líneas señalan la localización de todas las mutaciones publicadas hasta el momento por otros grupos de investigación. En rojo aparecen resaltadas todas aquellas mutaciones nulas, mientras que en negro aparecen todas aquellas mutaciones con pérdida de sentido.

1.3.1.7 Subunidad β de la enzima Isocitrato deshidrogenasa 3 (NAD⁺) (*IDH3B*)

El gen *IDH3B* (MIM 604526) fue mapeado por Kim y cols. [1999] mediante FISH en la región cromosómica 20p13.

IDH3B codifica una proteína de 385 aa que constituye la subunidad β de la enzima nicotinamida-adenina dinucleótido específica isocitrato deshidrogenasa (NAD-IDH), un heterotetrámero con dos subunidades α (*IDH3A*), una β y una γ (*IDH3G*). NAD-IDH participa en el ciclo de Krebs catalizando la conversión de isocitrato a alfa-cetoglutarato, una reacción esencial que simultáneamente convierte NAD⁺ en NADH. El NADH producido es usado en la síntesis de ATP, una molécula universalmente usada como fuente de energía en las células.

Mutaciones en *IDH3B* son la causa de la RPar tipo 46 (MIM612572). Los pacientes con estas mutaciones no presentaron otros problemas asociados [Hartong y cols., 2008]. Para conocer la contribución de *IDH3B* en la RPar son necesarios estudios poblacionales.

1.3.1.8 Lecitín retinol aciltransferasa (*LRAT*)

El gen *LRAT* (MIM 604863) fue identificado por Ruiz y cols. [2001] en el cromosoma 4 región q32.1.

La proteína LRAT consta de 230 aa y se expresa preferencialmente en testículo, hígado, células de epitelio pigmentario de retina, intestino delgado, próstata, páncreas y colon y, en menor medida, en cerebro [Nagatsuma y cols., 2009]. Dentro de la célula del EPR participa en el ciclo visual (*apartado 1.1.4*) esterificando el compuesto *trans* retinol en una de las etapas de la regeneración del cromóforo 11-*cis* RAL.

Mutaciones en *LRAT* se han asociado a diversas distrofias de retina como son la ACL tipo 14 (*ACL14*) (MIM 613341) [Senechal y cols., 2006, Vallespin y cols., 2007], la distrofia de retina severa de inicio precoz (MIM 613341) [Thompson y cols., 2001, Dev Borman y cols., 2012] y la RP juvenil (MIM 613341) [Den Hollander y cols., 2007]. Se estima que la contribución de *LRAT* en la aparición de la RPar es aproximadamente del 1% [Hartong y cols., 2006].

1.3.1.9 C-mer proto-oncogén tirosin quinasa (*MERTK*)

El gen *MERTK* (MIM 604705) fue mapeado por Weier y cols. [1999] en el cromosoma 2q14.1.

MERTK es un miembro de la familia de los receptor quinasa MER/AXL/TYRO3 y codifica para una proteína transmembrana con dos dominios fibronectina tipo-III, dos dominios tipo Inmunoglobulina C2 y un dominio tirosina quinasa. Su función es la transducción de la señal de la matriz extracelular al citoplasma mediante la unión de numerosos ligandos como LGALS3, TUB, TULP1 o GAS6 [Caberoy y cols., 2010]. *MERTK* regula muchos procesos fisiológicos como la supervivencia celular, migración, diferenciación y fagocitosis de células apoptóticas [Scott y cols., 2001]. En las células de EPR, *MERTK* participa en la fagocitosis de los discos del segmento externo de los bastones.

Mutaciones en *MERTK* son la causa de la RPar tipo 38 (RP38) (MIM 613862). El rastreo mutacional en familias RPar de distintas poblaciones mostró que las mutaciones en *MERTK* son una causa rara de RPar en humanos, afectando a menos del 1% de las familias [Gal y cols., 2000, Mchenry y cols., 2004, Tada y cols., 2006, Tschernutter y cols., 2006, Brea-Fernandez y cols., 2008, Mackay y cols., 2010]. Sin

embargo en determinadas poblaciones como las Islas Feroe el porcentaje aumenta considerablemente, hasta un 30%, debido al efecto fundador de una sola mutación que implica la delección de los 7 primeros exones de *MERTK* [Ostergaard y cols., 2011].

1.3.1.10 Receptor nuclear subfamilia 2, grupo E, miembro 3 (*NR2E3*)

El gen *NR2E3*, también conocido como *PNR* (Receptor nuclear fotorreceptor-específico) (MIM 604485), fue identificado por Kobayashi y cols. [1999] en la región cromosómica 15q24 por técnicas FISH.

La proteína codificada consta de 410 aa y se expresa en el núcleo de los fotorreceptores. Es un factor de transcripción que se une a la región promotora de una serie de genes específicos de los fotorreceptores, entre los que se encuentran rodopsina, las opsinas M- y S- de los conos y *PDE6B*. Favorece la expresión de rodopsina mientras que suprime la expresión de las opsinas M- y S- de los conos [Cheng y cols., 2004, Peng y cols., 2005].

Mutaciones en *NR2E3* son responsables del síndrome del S-cono aumentado (ESCS) (MIM 268100) [Haider y cols., 2000], de la RPar [Gerber y cols., 2000] y de la RPad tipo 37 (RP37) (MIM 611131) [Coppieters y cols., 2007]. Por tanto, mutaciones en este gen pueden causar tanto degeneración de retina recesiva como dominante, incluso en miembros de la misma familia [Escher y cols., 2009]. Este hecho puede ser atribuible al doble papel que juega *NR2E3* en la regulación de genes específicos de los fotorreceptores durante el desarrollo y mantenimiento de los bastones [Coppieters y cols., 2007]. La contribución relativa de *NR2E3* a la RP se estima en ~1-2% de los casos [Gire y cols., 2007].

1.3.1.11 Subunidad β de la fosfodiesterasa 6 específica de bastón dependiente de GMP_c (*PDE6B*)

El gen *PDE6B* (MIM 180072) se localiza en la región cromosómica próxima al telómero 4p16.3 y fue clonado y secuenciado por Weber y cols. [1991] como gen candidato de la enfermedad de Huntington.

PDE6B codifica una proteína de 22 exones y 855 aa que se expresa preferentemente en retina con una pequeña expresión en cerebro de un transcrito de menor tamaño [Weber y cols., 1991, Collins y cols., 1992]. Subcelularmente se localiza en la membrana plasmática donde forma un trímero con *PDE6A* y *PDE6G*. Tiene actividad catalítica y participa en la fototransducción (*Sección 1.1.3*).

Mutaciones en el gen *PDE6B* son responsable de la RPar tipo 40 (RP40) (MIM 613801) [McLaughlin y cols., 1993] y de una forma dominante de CNCE (MIM 163500) [Gal y cols., 1994], el conjunto de las cuales representa un 4% de los casos de RPar

[Danciger y cols., 1995, Mclaughlin y cols., 1995, Gao y cols., 1996, Valverde y cols., 1996a, Valverde y cols., 1996b, Piriev y cols., 1998, Hmani-Aifa y cols., 2009, Daiger y cols., 2007].

1.3.1.12 Proteína de la degeneración progresiva de bastones y conos (*PRCD*)

El gen *PRCD* (MIM 610598) está localizado en la región 17q25.1 y fue finalmente anotado por Zangerl y cols. [2006b].

La proteína codificada tiene una longitud de 54 aa de los cuales los 28 primeros, codificados por el exón 1, están altamente conservados evolutivamente. Su alta conservación entre vertebrados y la aparente ausencia de genes homólogos en invertebrados sugiere que pueda estar relacionado con la estructura del fotorreceptor o el metabolismo de estas células aunque su función sigue siendo desconocida [Zangerl y cols., 2006b]. *PRCD* es una proteína citoplasmática que se expresa preferentemente en retina.

El análisis mutacional del gen *PRCD* canino y humano mostró una mutación común (p.C2Y) responsable del fenotipo RPar en ambas especies (RP36) (MIM 610599) [Zangerl y cols., 2006a]. Son necesarios estudios poblacionales para conocer la prevalencia de este gen en la RPar.

1.3.1.13 Prominin I (*PROM1*)

El gen *PROM1* (MIM 180721) está localizado en la región 4p15.3-p15.2 y fue identificado por Maw y cols. [2000].

La proteína prominina consta de 27 exones y 865 aa. Posee un dominio N-terminal extracelular, cinco dominios transmembrana entre los que se insertan dos pequeños *loops* citoplasmáticos y dos grandes *loops* extracelulares glicosilados y un dominio C-terminal citoplasmático [Miraglia y cols., 1997, Weigmann y cols., 1997, Fargeas y cols., 2004].

En la retina, *PROM1* se localiza en la región de protusión de membrana de la base de los segmentos externos de los bastones, implicándose en la morfogénesis de los discos [Maw y cols., 2000]. *PROM1* también se encuentra en los conos, pero distribuida a lo largo de todo el segmento externo [Jaszai y cols., 2007].

Mutaciones en el gen *PROM1*, son responsables de la aparición de diversos fenotipos: RPar tipo 41 (RP41) (MIM 612095) [Maw y cols., 2000, Permanyer y cols., 2010], DCB tipo 12 (DCB12) (MIM 612657) [Michaelides y cols., 2010], STGD dominante tipo 4 (STGD4) (MIM 603786) [Kniazeva y cols., 1999], degeneración macular retinal dominante tipo 2 (MCDR2) (MIM 608051) [Michaelides y cols., 2003, Yang y cols., 2008] y RP severa con degeneración macular [Zhang y cols., 2007].

1.3.1.14 Receptor acoplado a proteína G del epitelio pigmentario de la retina (*RGR*)

El gen *RGR* (MIM 600342) fue identificado a partir de una librería de ADNcs de EPR bovino [Jiang y cols., 1993] y está localizado en la región 10q23.1.

La proteína consta de 296 aa y se expresa fundamentalmente en las células del epitelio pigmentario de retina y en las células de Müller [Pandey y cols., 1994]. Pertenece a la familia de receptores de 7 segmentos transmembrana y presenta cierta homología con otros miembros de la familia como las opsinas [Jiang y cols., 1993]. Es un receptor del cromóforo todo-*trans* y 11-*cis* retinal y por tanto, participa en una de las vías alternativas de la regeneración de los retinoides en el ciclo visual (véase apartado 1.1.4). En presencia de luz, *RGR* produce la isomerización directa de todo-*trans* retinal en 11-*cis* retinal [Hao y Fong, 1996, Hao y Fong, 1999]. Además, *RGR* desempeña un papel esencial en la regeneración de la rodopsina, tanto en la oscuridad como en presencia de luz [Wenzel y cols., 2005].

Mutaciones en *RGR* son responsables de la aparición de la RPar tipo 44 (MIM 613769) [Morimura y cols., 1999b]. Las mutaciones de *RGR* representan <1% de los casos de RPar [Hartong y cols., 2006].

1.3.1.15 Rodopsina (*RHO*)

El gen que codifica la rodopsina humana fue aislado y secuenciado en 1984 [Nathans y Hogness, 1984] y está localizado en la región cromosómica 3q21.3.

La proteína codificada, la opsina, tiene 349 aa y se combina con el cromóforo 11-*cis* retinal para formar la rodopsina. Es una proteína con siete dominios transmembrana unidos por 3 *loops* citoplasmáticos, 3 extracelulares/intradisciales, un extremo 5' extracelular y uno 3' citoplasmático (Figura 1.13). Se localiza en los discos membranosos del segmento externo de los bastones donde se encarga de iniciar la cascada de fototransducción como molécula captadora de fotones (véase apartado 1.1.3).

Desde la publicación en la revista *Nature* de la primera mutación asociada a la RP en el gen de la rodopsina (p.P23H) [Dryja y cols., 1990] hasta ahora, se han detectado más 100 mutaciones en este gen, y eso que sólo cuenta con 5 exones. En un principio, *RHO* se asoció a la patogénesis de la RPad (MIM 613731) [Dryja y cols., 1990, Farrar y cols., 1990, Dryja y cols., 1991, Antinolo y cols., 1994], aunque no tardaron en aparecer publicaciones donde se describían mutaciones que cosegregaban con la RPar [Rosenfeld y cols., 1992, Kumaramanickavel y cols., 1994]. También se ha relacionado con la Retinitis punctata albescens (MIM 136880) [Souied y cols., 1996] y con la CNCE

de herencia autosómica dominante (MIM 610445) [Dryja y cols., 1993, Al-Jandal y cols., 1999].

En la actualidad, las mutaciones en el gen *RHO* (Figura 1.13) explican un 26,5% de los casos de RPad [Daiger y cols., 2007] y ~1% de los casos de RPar [Hartong y cols., 2006].

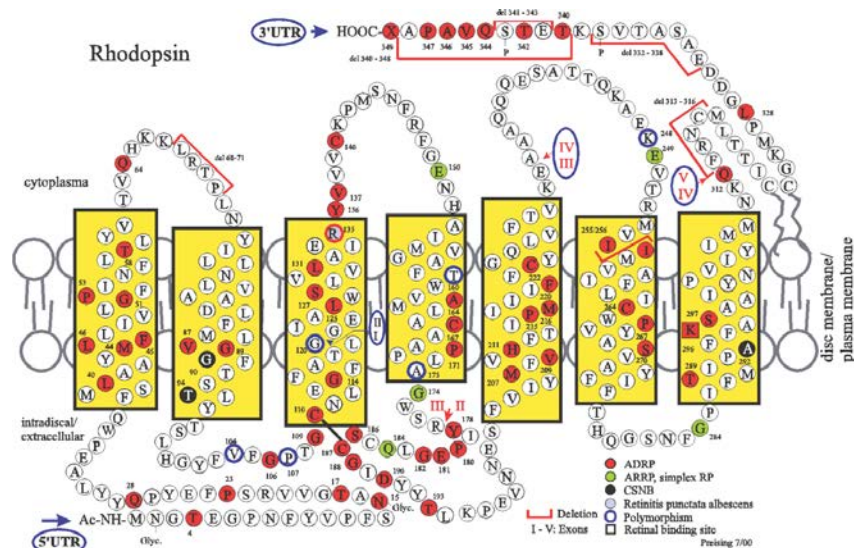


Figura 1.13 – Representación de la estructura de la rodopsina.

Cada uno de los residuos mutados está marcado en distintos colores. En rojo los residuos implicados en RPad, en verde los responsables de RPar y en negro los asociados a CNCE. No se han incluido las mutaciones que afectan al splicing. Tomada de <http://www.retinainternational>.

1.3.1.16 Proteína de unión al retinaldehído, I (*RLBP1*)

El gen *RLBP1* (MIM 180090) se localiza en la región cromosómica 15q26 [Sparkes y cols., 1992].

La proteína codificada, también conocida como *CRALBP* (*Cellular Retinaldehyde-Binding Protein*) es una chaperona de 318 aa que se expresa específicamente en retina y glándula pineal. En retina, se localiza en el citoplasma celular de las células del EPR y se encarga del transporte citoplasmático del cromóforo 11-*cis* retinol y su metabolito el 11-*cis* retinaldehído durante el ciclo visual (véase apartado 1.1.4 Figura 1.7).

Mutaciones en el gen *RLBP1* han sido asociadas a la patogénesis de distintos fenotipos como son: la RPar [Maw y cols., 1997], la Retinitis punctata albescens (MIM 136880) [Morimura y cols., 1999a, Fishman y cols., 2004] y su variante la distrofia retinal de Bothnia (MIM 607475) común del norte de Suecia [Burstedt y cols., 1999, Burstedt y Golovleva, 2010]. También se han descrito mutaciones en *RLBP1*

responsables de la distrofia de bastones y conos de Terranova (MIM 607476), una distrofia de retina de inicio precoz [Eichers y cols., 2002]. Las mutaciones de *RLBP1* representan ~1% de los casos de RPar [Hartong y cols., 2006].

1.3.1.17 Proteína de 65 kDa específica del epitelio pigmentario de la retina (*RPE65*)

El gen *RPE65* humano se localiza en la región cromosómica 1p31 y fue identificado por [Hamel y cols., 1994] tras la descripción de su ortólogo bovino [Hamel y cols., 1993].

La proteína RPE65 es una chaperona que sufre un proceso de *splicing* alternativo dando lugar a dos isoformas distintas (m y s). La isoforma mRPE65 se encuentra asociada a la membrana (65,38 kDa) y contiene modificaciones post-traduccionales, mientras que la isoforma soluble sRPE65 es citosólica (61,161 kDa) y no está modificada [Ma y cols., 2001]. RPE65 participa en la regeneración del pigmento visual (véase apartado 1.1.4) [Gollapalli y cols., 2003, Jahng y cols., 2003]. La forma soluble se une al todo-*trans* retinol, haciendo posible que LRAT lo esterifique a todo-*trans* retinil ester. La forma asociada a membrana, palmitoilada por LRAT, se une al todo-*trans* retinil ester, permitiendo que la isomerohidrolasa los procese a todo-*cis* retinol [Redmond y cols., 1998, Znoiko y cols., 2002, Mata y cols., 2004].

Mutaciones en *RPE65* se han asociado a la aparición de ACL tipo 2 (MIM 204100) [Marlhens y cols., 1997] y de RPar tipo 20 (MIM 613794) [Morimura y cols., 1999b]. Las mutaciones en *RPE65* parecen explicar el ~2% de los casos de RPar y el ~16% de los casos de ACL [Morimura y cols., 1999b, Daiger y cols., 2007].

1.3.1.18 Regulador de GTPasa implicado en Retinitis Pigmentaria (*RPGR*)

El gen *RPGR* (MIM 312610) fue identificado por [Meindl y cols., 1996] en la región Xp11.4 y consta de 19 exones. Cuatro años más tarde, la secuenciación de una región de 172 Kb (conteniendo todo el gen *RGPR*) permitió reconocer un nuevo exón alternativo terminal (ORF15) en el extremo 3' [Vervoort y cols., 2000]. Este gen muestra un complejo patrón de *splicing* alternativo mediado por múltiples potenciadores de *splicing* [Hong y Li, 2002]. *RPGR* codifica una proteína de 815 aa expresada en una amplia variedad de tejidos.

La isoforma RPGR-ORF15 contiene un dominio repetitivo rico en residuos de ácido glutámico y glicina. La elevada proporción de mutaciones encontradas en este exón, en comparación con otras partes del gen, indica que ORF15 es un “punto caliente” (*hot spot*) mutacional [Vervoort y cols., 2000].

La interacción entre la isoforma RPGR-ORF15, con RPGRIP1, la proteína nucleofosmina (NPM) y la nefrocistina-5 o IQCB1 en el cuerpo basal de las células con

cilios primarios, localiza a esta isoforma de RPGR en la regulación del transporte ciliar [Shu y cols., 2005, Otto y cols., 2005, Khanna y cols., 2005].

Mutaciones en *RPGR* son responsables de la RPLX tipo RP3 (MIM 300029) [Meindl y cols., 1996], de la DCBLX (MIM 304020) [Mears y cols., 2000], de la Degeneración macular atrófica (MIM 300834) [Ayyagari y cols., 2002] y de la RP asociada a infecciones sinopulmonares recurrentes (MIM 300455) [Dry y cols., 1999]. Mutaciones en este gen representan un 74,2% de los casos de RPLX [Daiger y cols., 2007]. Aunque la RPLX suele afectar solamente a hombres, varias mutaciones de *RPGR* pueden causar sintomatología en las mujeres portadoras, simulando un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia incompleta [Mears y cols., 2000].

1.3.1.19 Proteína relacionada con tubby 1 (*TULP1*)

El gen *TULP1* (MIM 602280) fue identificado por North y cols. [1997] junto con los otros dos miembros de esta familia génica: TUB (proteína homóloga a *tubby murino*) y *TULP2* (Proteína relacionada con *tubby 2*). Si bien, las proteínas codificadas por estos tres genes son bastantes diferentes en su extremo N-terminal, comparten un gran porcentaje de identidad en la región C-terminal, indicando que pueden estar desempeñando funciones similares.

TULP1 consta de 542 aa y se expresa específicamente en retina y cerebro. Estudios en ratones, demuestran que se localiza en el segmento interno de los fotorreceptores [Grossman y cols., 2010].

A pesar de que la función de *TULP1* no se conoce con exactitud, diversas observaciones sugieren que podría estar implicado, junto con la actina, en el tráfico de proteínas, entre ellas la rodopsina. Dicho tráfico tiene lugar desde el segmento interno hasta el segmento externo de los fotorreceptores a través del cilio conector [Xi y cols., 2005, Hagstrom y cols., 2012]. Se ha descrito que *TULP1* interacciona con la GTPasa Dinamina-1 en la capa plexiforme externa y los segmentos internos de los fotorreceptores [Xi y cols., 2007]. Otros investigadores apuntan que *TULP1* podría estar implicado en el desarrollo de la sinapsis de los fotorreceptores [Grossman y cols., 2010].

Mutaciones en *TULP1* se han asociado a la aparición de la RPar tipo 14 (MIM 600132) [Banerjee y cols., 1998, Hagstrom y cols., 1998, Paloma y cols., 2000], a la ACL tipo 15 (MIM 613843) [Mataftsi y cols., 2007] y a una distrofia de retina de inicio precoz [Mataftsi y cols., 2007]. Mutaciones en *TULP1* causan el 1% de los casos de RPar [Hartong y cols., 2006] y el 1,7% de los casos de ACL [Daiger y cols., 2007].

1.3.2 Genes asociados tanto a DHR síndrómicas como no síndrómicas

1.3.2.1 Gen del síndrome de Usher 2A (*USH2A*)

El gen *USH2A* (MIM 608400) se localiza en el cromosoma 1q41. Weston y cols. [2000] identificaron una isoforma del gen que contenía 21 exones (isoforma A). Cuatro años más tarde se identificaron 51 exones adicionales en el extremo 3' de la isoforma A, haciendo un total de 72 exones (isoforma B) [Van Wijk y cols., 2004].

La isoforma A codifica para una proteína secretada a la matriz extracelular, mientras que la isoforma B, la más abundante en retina, es una proteína de membrana [Liu y cols., 2007b]. La proteína codificada por esta isoforma, también llamada usherina, es una proteína multidominio compuesta por 3 regiones: un largo dominio extracelular, una región transmembrana y una región citoplasmática C-terminal que contiene un motivo de unión a PDZ. El dominio PDZ de usherina interacciona con el dominio PDZ de whirlina, integrando a *USH2A* en la red de proteínas que constituye el interactoma de Usher [Millan y cols., 2011].

La usherina se localiza subcelularmente en el cilio conector de los fotorreceptores [Reiners y cols., 2006, Fliegau y cols., 2007], donde se piensa que está implicada en el transporte de proteínas y moléculas desde el segmento interno hasta el segmento externo de los fotorreceptores [Liu y cols., 2007b, Van Wijk y cols., 2004, Reiners y cols., 2006].

Mutaciones en *USH2A* son responsables tanto de la aparición de USH tipo 2 (USH-2) (MIM 276901) como de la RP sin pérdida de audición tipo 39 (MIM 613809). A pesar de que muchos estudios han diseccionado las propiedades funcionales de *USH2A* [Adato y cols., 2005, Reiners y cols., 2005, Van Wijk y cols., 2009, Ebermann y cols., 2010], aún no ha sido posible establecer una correlación genotipo-fenotipo clara. Se ha postulado que mutaciones nulas en ambos alelos en el gen *USH2A* dan lugar a un fenotipo USH, mientras que mutaciones sin sentido (*missense*) dan lugar a un fenotipo RPar [Kaiserman y cols., 2007]. Por otra parte, un estudio realizado en pacientes afectados de USH-2 señaló diferencias clínicas en gemelos monocigotos, sugiriendo que variaciones en la expresión fenotípica del gen *USH2A* podrían no estar determinadas únicamente por factores genéticos [Liu y cols., 1999].

El gen *USH2A* está asociado aproximadamente al 8% de los casos de RPar no síndrómica [Hartong y cols., 2006] y al 30-40% de los casos de USH-2.

1.3.2.2 Gen del síndrome de Bardet-Biedl I (*BBS1*)

El gen *BBS1* (MIM 209901) fue identificado por Mykytyn y cols. [2002] en la región cromosómica 11q34.

La proteína codificada consta de 593 aminoácidos (aa) y se expresa de manera generalizada en una gran cantidad de tejidos que tienen células ciliadas. *BBS1* junto con *BBS2*, *BBS4*, *BBS5*, *BBS7*, *BBS8*, *BBS9* y *BBIP10* forma el complejo del BBSoma [Nachury y cols., 2007]. El complejo del BBSoma es un componente del cuerpo basal de los cilios celulares que participa en la formación de los cilios primarios [Jin y cols., 2010].

Mutaciones en *BBS1* son la causa del SBB tipo 1 (BBS1; MIM 209900). Una mutación común en este gen p.M390R causa el 80% de los casos de SBB tipo 1 [Mykytyn y cols., 2003]. Recientemente se ha publicado que la misma mutación p.M390R es responsable de un amplio rango de fenotipos que van desde la RP no sindrómica al SBB [Estrada-Cuzcano y cols., 2012a].

1.3.3 Genes asociados a DHR sindrómicas

1.3.3.1 Receptor acoplado a proteína G 98 (*GPR98*)

El gen *GPR98* fue aislado parcialmente por Ishikawa y cols. [1998], aunque quien determinó su estructura exacta fue Mcmillan y cols. [2002]. Está localizado en el cromosoma 5q14.1. También se conoce como *VLGR1* (del inglés *Very Large G-protein coupled Receptor 1*). Está formado por 90 exones y se extiende más de 600 kb. Es la proteína de membrana más larga que se conoce (6.306 aa).

GPR98 codifica para un miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. El ligando de este receptor es el calcio y se expresa en el sistema nervioso central, donde parece desempeñar una importante función en el desarrollo. Contiene un largo dominio extracelular, un dominio 7-transmembrana y un dominio PDZ intracelular. Al igual que *USH2A* interacciona con la proteína *whirlina* y *PDZD7* a través del dominio PDZ, formando parte del complejo proteico que integra el interactoma de Usher [Van Wijk y cols., 2006]. En los fotorreceptores, los dominios extracelulares de *GPR98* y de *USH2A* conectan las membranas del cilio conector y del cuello del segmento interno de los fotorreceptores. Además de las funciones estructurales, se cree que puede desempeñar importantes funciones de marcaje y guía de vesículas a través del cilio, así como participar en la liberación y fusión de dichas vesículas en áreas designadas de las membranas [Zallocki y cols., 2012].

Las mutaciones en *GPR98* están asociadas al síndrome de Usher en su variante 2C (*USH2C*) (MIM 605472), y a la predisposición familiar de las convulsiones febriles familiares tipo 4 (*FEB4*) (MIM 604352). También se ha asociado a un tipo de herencia digénica de *USH* con el gen *PDZD7* (MIM 605472).

1.3.3.2 Gen del síndrome de McKusick-Kaufman (*MKKS*)

El gen *MKKS* (MIM 604896) fue identificado por Stone y cols. [2000] en la región cromosómica 20p12.2. Tiene 6 exones, de los cuales sólo tres son codificantes.

La proteína codificada, también conocida como BBS6, consta de 570 aa y al igual que BBS1 se expresa de manera generalizada en una gran cantidad de tejidos que tienen células ciliadas. Es una chaperona que se moviliza rápidamente desde el citosol al centrosoma y probablemente interviene en el ensamblaje del complejo del BBSoma [Hirayama y cols., 2008].

Mutaciones en *MKKS* se han asociado con dos fenotipos clínicamente solapantes al inicio como son el síndrome de McKusick-Kaufman (*MKKS*; MIM 236700) y el síndrome de Bardet-Biedl tipo 6 (*SBB6*) (MIM 209900). Badano y cols. [2003] encontraron que un paciente con dos mutaciones en *BBS1* y una mutación en *MKKS* (c.973A>C; p.T325P) presentaba un fenotipo más severo que su hermana que presentaba sólo las dos mutaciones en *BBS1*, indicando el posible efecto epistático de los genes BBS.

1.3.4 Genes candidatos de DHR

1.3.4.1 Protocadherina alfa I (*PCDHA1*)

El gen *PCDHA1* es un miembro del conjunto de genes que codifican para las alfa protocadherinas (*PCDHA*). Este conjunto o clúster de genes está localizado en la región cromosómica 5q31 y está compuesto por 15 genes (*PCDHA1-13*, *PCDHAC1* y *PCDHAC2*) y un pseudogen (*PCDHA14*) (Figura 1.14). Los 15 genes constan de 4 exones, cada primer exon (el exón variable) se ensambla a los exones constantes (2-4) que son comunes para cada gen *PCDHA*.

Las proteínas codificadas son proteínas transmembrana cuyo dominio extracelular está compuesto por 6 ectodominios tipo cadherina (EC). La región variable codifica para los dominios extracelulares y transmembrana, mientras que la región constante codifica para el dominio citoplasmático (Figura 1.15).

El análisis filogenético entre distintos ortólogos y el estudio de las islas CpG, parece indicar que la expresión de cada región variable está regulada por un promotor distinto [Noguchi y cols., 2009].

Las protocadherinas forman una familia extraordinariamente diversa de proteínas de adhesión neural, por lo que podrían jugar un papel en el establecimiento y funcionamiento de uniones célula-célula en el sistema nervioso y en la especificación de los circuitos neuronales. El clúster de genes de las alfa-protocadherinas, los cuales se expresan en el cerebro de los vertebrados, codifica diversas proteínas de membrana

cuyas funciones a nivel del SNC parecen estar relacionadas con la proyección axonal, el aprendizaje y la memoria [Wu y cols., 2001, Noguchi y cols., 2009].

Mutaciones en el gen *PCDHA1* no han sido asociadas todavía a la aparición de ninguna DHR.

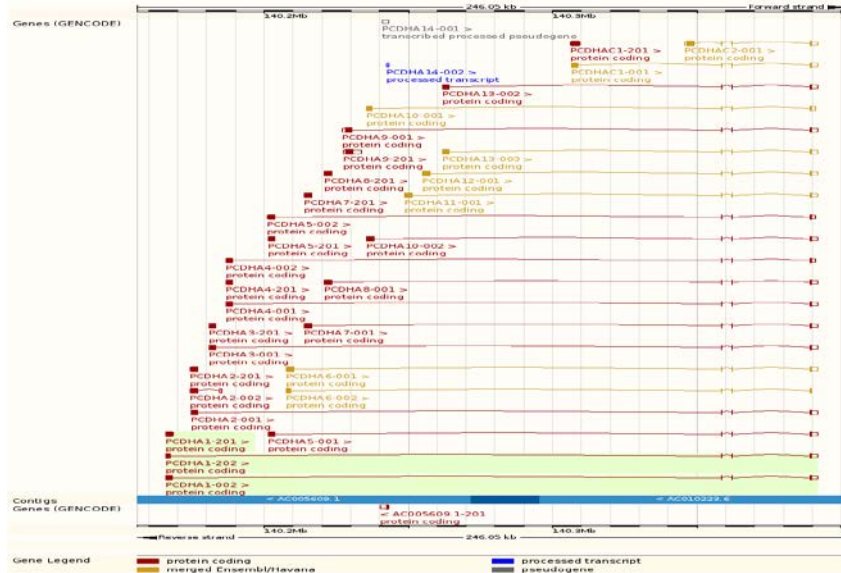


Figura 1.14 – Clúster de genes de las alfa-protocadherinas.

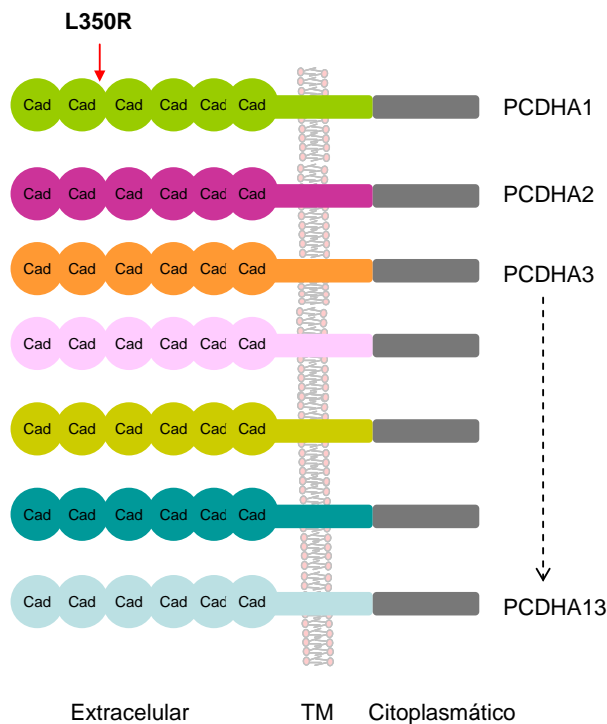


Figura 1.15 – Representación de los dominios proteicos de las alfa-protocadherinas.

1.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS DHR

1.4.1 Importancia del diagnóstico genético

Debido a la gran heterogeneidad clínica y genética de las DHR no siempre resulta fácil lograr un diagnóstico molecular y, con frecuencia, suele ir acompañado de una gran inversión de tiempo y dinero.

El diagnóstico molecular reporta una serie de ventajas como son:

1. Permite la confirmación del diagnóstico clínico preliminar, ya que muchas DHR presentan características clínicas solapantes. La degeneración retiniana es a veces, el primer signo de una enfermedad sindrómica, como por ejemplo en el caso del síndrome de Senior-Løken que está acompañada de fallo renal (nefronoptisis). Debido a que el fenotipo ocular precede a las manifestaciones renales, con frecuencia se incurre en errores en el diagnóstico clínico de estos síndromes. Esto incrementa el riesgo de muerte súbita por un desequilibrio hídrico y salino. Por tanto, identificar la causa genética subyacente cuanto antes, puede permitir la monitorización de pacientes portadores de mutaciones en genes sindrómicos antes de que se manifiesten la totalidad de los síntomas.
2. Establecimiento de correlaciones genotipo-fenotipo que proporcionen un pronóstico más exacto de la enfermedad.
3. La posibilidad de ofrecer consejo genético y asesoramiento reproductivo a las familias. El consejo genético o asesoramiento genético, es una de las actividades propias de la Genética Clínica y consiste en un proceso comunicativo para informar, educar y dar soporte a individuos y familias que tienen una enfermedad genética o el riesgo de tenerla. El consejo genético les brinda a los pacientes información acerca de su enfermedad y les ayuda a tomar decisiones informadas.
4. Ampliar nuestros conocimientos sobre las bases moleculares y etiopatogénicas de este grupo de enfermedades tan heterogéneo.
5. Conocer la prevalencia de cada uno de los genes en nuestra población.
6. Identificación de nuevos genes o asociación de nuevos fenotipos a genes ya identificados.
7. Posibilidad de administrar suplementos nutricionales que van a depender del defecto genético que porte el paciente. El aporte de altas dosis de vitamina A se ha administrado tradicionalmente como tratamiento paliativo en los afectos de DHRs [Berson y cols., 1993, Massof y Finkelstein, 1993], sin embargo, esta práctica puede ser perjudicial en pacientes con defectos en la proteína transportadora de retinoide ABCR según se ha demostrado en un estudio con ratones knockout [Radu y cols., 2008].

8. Posibilidad de tratar a las familias mediante su inclusión en protocolos de terapia génica. Hasta hace unos años era imposible frenar, estabilizar o tratar la pérdida de visión en pacientes con enfermedades de retina. Esto cambió para un pequeño grupo de pacientes con ACL y mutaciones en el gen *RPE65*, ya que la administración de inyecciones subretinales de virus adeno-asociados recombinantes (VAAr) resultó ser segura y exitosa [Bainbridge y cols., 2008, Hauswirth y cols., 2008, Maguire y cols., 2008]. Los VAAr transducen las células del EPR y una vez en el núcleo permanecen como un elemento extracromosómico estable que expresa el ADNc de *RPE65* bajo el control de su propio promotor humano. Hasta el momento han sido tratados un total de 18 pacientes en tres centros entre Filadelfia y Londres. Aunque la mejora de la visión fue variable y en general modesta, parece que fue más efectiva en los pacientes jóvenes. El éxito de estas terapias parece indicar que gran parte de los tratamientos que se desarrollarán en los próximos años estarán basados en genes específicos o incluso en mutaciones específicas, incrementando la importancia de que los pacientes reciban un diagnóstico molecular.
9. La validación de nuevos algoritmos y técnicas diagnósticas que podrán ser implementados en la cartera de servicios del hospital.

1.4.2 Técnicas empleadas en el diagnóstico genético de las DHR

Las técnicas empleadas en la presente tesis se detallan en el apartado 3.2.1 de Materiales y Métodos, pero aquí se resumen algunas características importantes de las técnicas actuales empleadas en el diagnóstico molecular de las DHR.

La secuenciación Sanger sigue siendo la técnica más comúnmente utilizada debido a su gran precisión, flexibilidad, velocidad y coste asequible. La principal limitación es que resulta lento y laborioso para un número elevado de exones o amplicones. Además, no permite detectar deleciones y duplicaciones de gran tamaño (CNVs, *Copy number variations*, variaciones en el número de copias) a menos que la zona donde se origine esté dentro del amplicón secuenciado. Además es necesario conocer la región que se quiere secuenciar. Por estas razones, su uso para el descubrimiento de nuevos genes es más limitado, y requiere el empleo de otras técnicas complementarias que delimiten la región a secuenciar a un intervalo susceptible de ser abordado. No obstante, sigue siendo la técnica de elección para la comprobación de los cambios detectados por otras técnicas.

Las técnicas de clonaje posicional mediante análisis de ligamiento se han usado de manera efectiva para localizar genes asociados a DHR, pero requieren generalmente familias de gran tamaño. El abordaje clásico basado en el análisis de ligamiento

mediante marcadores microsatélites polimórficos resulta muy laborioso. Posteriormente, el desarrollo de la tecnología de las micromatrices permitió el análisis de ligamiento a lo largo de todo el genoma en un periodo más o menos corto de tiempo. Estas micromatrices permiten el genotipado rápido de miles de polimorfismos (SNPs) repartidos a lo largo de todo el genoma. Las micromatrices de SNPs han resultado ser muy útiles en la búsqueda de regiones donde se haya perdido la heterocigosidad en el mapeo de enfermedades de herencia recesiva no sólo en familias consanguíneas sino también en familias de pequeño tamaño y pacientes aislados de matrimonios no consanguíneos [Collin y cols., 2011].

Existen micromatrices basadas en la tecnología APEX (*Arrayed Primer Extension*), diseñadas para cada una de las DHR. Dichos *microarrays* Permiten el genotipado de un número de mutaciones conocidas y asociadas a la enfermedad. Su ventaja reside en la rapidez y el coste del ensayo (aproximadamente 250€/paciente). Esta tecnología permite el diagnóstico genético de un porcentaje variable de pacientes que depende del tipo de DHR, de su origen geográfico y etnia ($\approx 15\%$ en RPar española; Avila-Fernandez y cols. [2010]). Aunque las micromatrices se van mejorando con la inclusión de nuevas mutaciones, no permiten la detección de mutaciones nuevas. Esto puede ser una limitación importante, dado que sólo una pequeña proporción de las mutaciones asociadas a RP son recurrentes. Otra limitación es que al estar diseñados por tipo de DHR y herencia, un diagnóstico clínico preliminar ineficaz puede comprometer la obtención de un diagnóstico genético. No obstante, siguen siendo una buena estrategia de cribado de la cohorte, ya que permite por un lado, diagnosticar aquellas familias cuya causa genética es conocida y por otro, limitar el número de familias candidatas en la búsqueda de nuevos genes y mutaciones.

Las micromatrices de resecuenciación (*Affymetrix*) permiten el estudio simultáneo de la secuencia completa de una selección personalizada de genes. El número de genes analizados depende tanto del tamaño de los mismos como del tamaño de la micromatriz, pero como media se pueden estudiar ≈ 20 genes en un único experimento. Presenta la ventaja de que los usuarios pueden diseñar un panel de genes flexible y adaptado, que cubra los genes más prevalentes de su localización geográfica. Además las micromatrices de resecuenciación permiten la detección de mutaciones nuevas. Aunque, se han mostrado muy efectivas en la identificación de cambios puntuales (*SNV, Single nucleotide variations*), presentan ciertas limitaciones técnicas la identificación de variantes del tipo inserciones y deleciones.

La técnica de MLPA (*Multiplex-ligation probe amplification*) es una técnica cuantitativa que permite la detección de variaciones en el número de copias y grandes reordenamientos génicos que impliquen la delección y/o duplicación de exones

completos (CNVs). Es una técnica ampliamente utilizada en diagnóstico genético, sobre todo de aquellos genes cuya frecuencia de mutaciones del tipo CNVs es alta. Su precio es asequible y los resultados son rápidos y reproducibles.

Las técnicas de *NGS* (*Next-generation sequencing*) también llamadas secuenciación masiva o megasecuenciación suponen una nueva era en la secuenciación genómica. Su importancia, tanto en el diagnóstico molecular de las DHR como en la identificación de nuevos genes de enfermedad, es cada vez mayor. El término *NGS* engloba un conjunto de nuevas tecnologías de secuenciación [Metzker, 2010, Glenn, 2011] todas ellas con un rendimiento muy superior a las técnicas convencionales (Secuenciación Sanger). Actualmente, existen más de 20 plataformas diferentes de *NGS* de distintas compañías comerciales: Roche 454 (*GS FLX Titanium* y *GS Junior*), Life Technologies (ej. *SOLiD 4*, *5500XL*), y las plataformas de Illumina (ej. *HiSeq*, *MiSeq*, *Genome Analyzer IIX*). Cada una de ellas está basada en tecnologías de secuenciación diferentes que utilizan químicas también distintas. Esto hace que cada plataforma tenga características diferentes en cuanto a capacidad, tasas de falsos-positivos y/o longitud de lectura (ej. *454 GS FLX Titanium* para lecturas de más de 500 bp; *SOLiD 5500XL* para lecturas de más de 75 bp (+35 bp); *HiSeq2000* para lecturas de más de 2×100 bp). Al igual que la secuenciación Sanger va precedida de la reacción de amplificación por PCR de los fragmentos de ADN, la *NGS* también requiere un enriquecimiento previo de las regiones de interés. Existen muchos sistemas de enriquecimiento disponibles, como por ejemplo las estrategias basadas en amplicones o en la captura de genes en fase sólida (sobre una matriz) o en fase líquida con el empleo de cebadores [Mamanova y cols., 2010]. El enriquecimiento se puede hacer de regiones genómicas completas (incluyendo regiones promotoras, intrones, etc.), de únicamente las regiones codificantes de determinados genes, de todos los exones del genoma (el llamado exoma), o incluso, del genoma completo.

Aunque la secuenciación de exomas es actualmente la técnica que se ha mostrado más eficiente en la identificación de mutaciones, también presenta algunas limitaciones. Además del coste elevado, una limitación importante es la imposibilidad de secuenciar regiones profundas en intrones. El creciente número de mutaciones identificadas en estas regiones y asociadas a la patogénesis de las DHR [Webb y cols., 2012, Littink y cols., 2010a] subraya la importancia de evaluar las secuencias intrónicas completas. La secuenciación del genoma completo, por tanto, parece ser el abordaje óptimo para el descubrimiento de variantes raras de alto riesgo, ya que ofrece más información que la secuenciación de exomas. Sin embargo, la secuenciación del genoma completo es aún una tecnología muy cara y por ello, la secuenciación del

exoma se está convirtiendo en el método de elección para el diagnóstico e investigación de las enfermedades de base genética [Gilissen y cols., 2011].

El empleo de estas técnicas también comporta nuevos retos, como el análisis de los datos generados y la interpretación de las variantes genómicas encontradas. No obstante, dado el gran número de variantes presentes en el genoma de un paciente, la información posicional sobre donde puede estar localizado el gen causal (ej. Por análisis de ligamiento y/o mapeo de homocigosidad) sigue siendo de gran utilidad para limitar el campo de búsqueda a un intervalo concreto del genoma [Neveling y cols., 2013].

Recientemente con el lanzamiento de los llamados secuenciadores de tercera generación, es posible la secuenciación en tiempo real de un única molécula (ej., *Pacific Bioscience*, *Helicos*), haciendo que no sean necesarias estrategias previas de enriquecimiento. Otros sistemas están basados en la detección de iones H⁺ en lugar de en marcadores fluorescentes (Secuenciación *postlight*, *Ion Torrent*), permitiendo reducir los costes de manufactura mediante el uso de micromatrices comerciales de diseño estándar que no necesitan cámaras, láser, ni marcadores fluorescentes [Glenn, 2011].

1.4.3 Panorama actual en la búsqueda de nuevos genes y mutaciones de DHR

La identificación de nuevos genes responsables de DHR ha progresado a un ritmo linear y constante durante los últimos 20 años (Figura 1.16). En 1990 se publicó el primer estudio que relacionaba la presencia de mutaciones en el gen de la rodopsina con la aparición de la RPad usando una estrategia de gen candidato [Dryja y cols., 1990].

Aunque las herramientas para el descubrimiento de genes ahora son mucho más poderosas, la tasa constante de los últimos años sugiere que, en general, cada nuevo gen identificado es más raro que los anteriores y por tanto, más difícil de identificar [Daiger y cols., 2013].

La secuenciación del genoma completo acelerará previsiblemente el descubrimiento de genes, pero como se ha comentado anteriormente, es posible que los genes desconocidos, sean extremadamente raros y afecten de manera privada a unas pocas familias en todo el mundo.

Las preguntas que se plantean en este contexto son (i) qué porcentaje de pacientes RP puede ser diagnosticado genéticamente con las técnicas disponibles actualmente, y (ii) cuándo será posible identificar la mutación causal en prácticamente todos los pacientes (~95%).

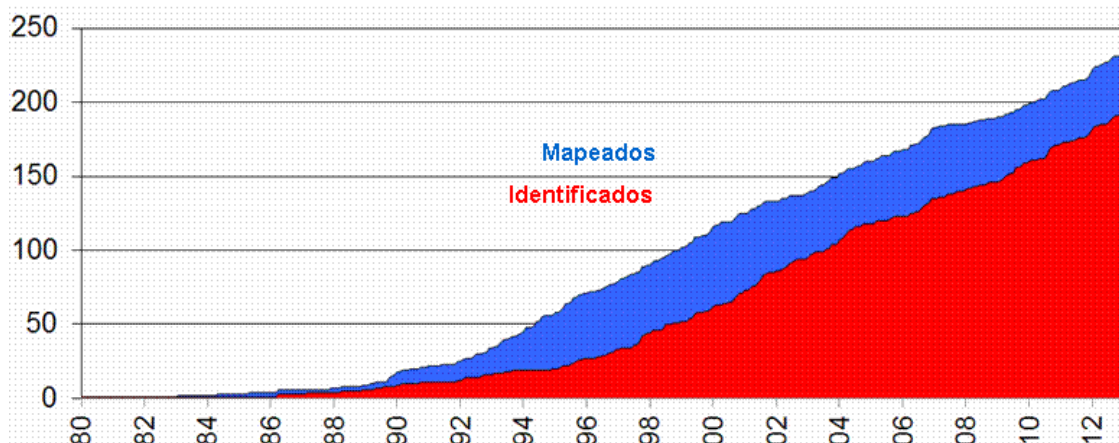


Figura 1.16 – Genes DHR mapeados e identificados en las últimas tres décadas.

Modificada de <https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm#D-graph>.

La respuesta a la primera pregunta depende de la tecnología empleada y del tipo de RP. Combinando resultados de la secuenciación tradicional Sanger y la secuenciación dirigida mediante NGS, es posible detectar la causa genética subyacente en aproximadamente el 20-30% de los casos de RPar, 60-70% de los casos de RPad, 80-85% en los casos de RPLX, y más de 85% de los casos de Usher y SBB [Glockle y cols., 2013]. Con respecto a los casos de RPe el porcentaje es más variable (19–36%), y confirmar la patogenicidad en esos casos puede resultar problemático [O'sullivan y cols., 2012, Shanks y cols., 2013]. Por ejemplo, la frecuencia de portadores en población control para todas las mutaciones asociadas a DHR en individuos no afectados puede exceder el 20% [Nishiguchi y Rivolta, 2012]. Según este estudio 1 de cada 4-5 individuos de la población general puede ser portador de mutaciones nulas responsables de DHR. Esto se traduce en la frecuencia de portadores más alta jamás medida para una enfermedad mendeliana, especialmente teniendo en cuenta que únicamente se incluyeron en el recuento aquellas variantes nulas que conducían a la introducción de un codón de parada prematuro y consecuente pérdida de la proteína. Si se tienen en cuenta además las mutaciones con pérdida de sentido, en las que se produce la sustitución de un aminoácido por otro, este dato aumentaría todavía más. Entre otras cosas, estos resultados indican que el riesgo para una pareja consanguínea de tener un niño con DHR es particularmente elevado comparado con otras enfermedades genéticas.

En relación a la segunda pregunta, la predicción es arriesgada, pero dado el rápido avance en los métodos de secuenciación del ADN, y la incesante identificación de nuevos genes de RP, es razonable esperar que en los próximos 5 años sea posible detectar el gen y la mutación responsable de la enfermedad en el 95% de los pacientes. Esto es asumiendo que la mayoría de los casos que quedan por diagnosticar son

monogénicos, es decir causados por un único gen en un individuo. Sin embargo, ya que las formas digénicas de RP y las formas trialélicas de SBB han sido descritas, la herencia poligénica de las DHR no puede ser descartada [Kajiwara y cols., 1994, Katsanis y cols., 2001].

2 OBJETIVOS

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

- 2.1. Caracterización molecular de 109 familias clínicamente diagnosticadas de RPar con el fin de profundizar en las bases moleculares de dicha patología de acuerdo con el siguiente plan experimental:
 - 2.1.1. Descartar los genes RP conocidos.
 - 2.1.2. Aplicar las tecnologías de última generación para la identificación de nuevas mutaciones y/o nuevos genes no asociados previamente al fenotipo.
 - 2.1.3. Evaluar su posible patogenicidad mediante análisis de cosegregación familiar, ausencia en controles y estudios funcionales *in silico*.
 - 2.1.4. Analizar la prevalencia de cada uno de los genes en la población de estudio.

- 2.2. Implementar el uso de una metodología específica para el diagnóstico molecular rutinario de las DHR en población española tras efectuar una comparativa de los distintos abordajes empleados en el diagnóstico molecular de los pacientes que conforman nuestra muestra de estudio.

3 PACIENTES Y MÉTODOS

3.1 PACIENTES Y CONTROLES

Todos los pacientes que forman parte de la cohorte de estudio y control, autorizaron su inclusión mediante consentimiento informado (Anexo 1). Dichos consentimientos siguen las normas contenidas en la declaración de Helsinki, así como lo estipulado en el Título I, Artículo 12, del real Decreto 561/1993 de 16 de abril, y han sido aprobados por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen del Rocío (H.U.V.R.) de Sevilla.

3.1.1 Familias en estudio

La Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal dispone de una amplia cohorte de pacientes y familias con degeneración de retina hereditaria, que ha ido ampliándose con el paso del tiempo, tanto por las familias remitidas por el Servicio de Oftalmología del H.U.V.R., como por las muestras recibidas de otros hospitales españoles.

En el presente estudio, se incluyeron aquellas familias que cumplían los criterios que se describen a continuación:

Criterio clínico

Se incluyeron todas las familias en las que algún miembro presentaba los signos clínicos establecidos internacionalmente para el diagnóstico de la RP: bilateralidad y simetría, ceguera nocturna, pérdida de visión periférica, disminución o ausencia de respuesta en el electroretinograma, pérdida progresiva de la función de los fotorreceptores y presencia de depósitos pigmentarios típicos en el fondo de ojo.

Criterio genético

La selección de las familias incluidas en el presente estudio se realizó en la consulta de genética clínica, donde se ha efectuado el estudio familiar, valoración de la cronología de la enfermedad y la presencia o no de clínica asociada a la RP.

El análisis de los árboles genealógicos permite establecer el modo de transmisión de la enfermedad. Los criterios utilizados para establecer el modo de herencia en RP son los de Haim [Haim, 1993]:

- Se establece un modo de **herencia autosómica dominante** (RPad) en aquellos árboles genealógicos donde se observa transmisión vertical en al menos dos generaciones sucesivas, en ausencia de transmisión varón-varón y en aquellos casos en que los síntomas sean tan agresivos en varones como en hembras.
- El modo de **herencia autosómica recesiva** (RPar) se asume en aquellos árboles genealógicos en los que se observan al menos dos hijos afectados y

ausencia de síntomas en los padres, exceptuando matrimonios consanguíneos en los que tan sólo un hijo afecto es indicativo de este tipo de herencia.

- Por último, en los árboles genealógicos en los que sólo existan varones afectados y algunas de las hembras presenten características típicas en el fondo de ojo o en el ERG de portadoras, se asumen que presentan un modo de **herencia ligada al cromosoma X (RPLX)**.

No obstante, existe un porcentaje alto de casos en los que es difícil establecer el modo de herencia ya que los árboles genealógicos presentan un único individuo afecto y carece de historial familiar previo. En este caso se asume que se trata de casos **esporádicos (RPe)**.

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

De manera específica, este trabajo se inició con una selección de 109 familias españolas RPar no emparentadas entre sí (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 – Clasificación de las familias estudiadas.

Clasificación genética	Nº de familias	Nº de casos
RP autosómica recesiva (RPar)	109	219

3.1.2 Individuos control

Para la evaluación de las variaciones identificadas como mutaciones responsables de la enfermedad, es preciso confirmar la ausencia de dicha variante en el grupo control. Este grupo está constituido por 200 individuos sanos no relacionados, agrupados según edad y sexo, y sin ningún antecedente personal o familiar relacionado con la patología en estudio.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Técnicas generales utilizadas

3.2.1.1 Extracción de ADN a partir de sangre periférica

El ADN de los pacientes, sus familiares y los controles se obtiene a partir de una muestra de sangre periférica mediante el uso de dos procedimientos diferentes. Por un lado, la extracción manual, más laboriosa, nos permite obtener grandes cantidades finales de ADN. Por el otro, la extracción automática mediante el uso de una plataforma

robotizada, nos permite extraer simultáneamente ADN de numerosas muestras de una manera rápida y efectiva, aunque con una obtención menor de ADN total. Según los requerimientos de las técnicas de estudio, y las cantidades de ADN necesarias para llevarlas a cabo, se procedió a un tipo de extracción u otro.

3.2.1.1.1 Extracción Manual

Los reactivos y soluciones empleados durante el proceso de extracción manual de ADN partiendo de una muestra de sangre periférica se recogen en las Tabla 3.2. y Tabla 3.3.

Tabla 3.2 – Reactivos empleados en la extracción de ADN a partir de una muestra de sangre periférica.

Reactivo	Actividad
TRIS	Tampón ácido-base
MgCl ₂	Mantiene la integridad de la pared de los leucocitos de los cuales se obtiene el ADN
EDTA	Agente quelante. Inhibidor de ADNasas
SDS	Detergente aniónico empleado en la lisis celular
Proteinasa K	Enzima que digiere las proteínas
NaCl	Favorece la precipitación de proteínas
Etanol	Favorece la precipitación de ADN

El procedimiento para la extracción manual de ADN pasa por las siguientes etapas:

- 1) Lavado de muestras de sangre
 - Lavar aproximadamente 15mL de sangre total con suero fisiológico. Para ello se utilizan tubos falcon estériles de 50mL de polipropileno. Centrifugar 5-10 minutos a 2000-2500 rpm (7-8g) y a 4°C sin freno.
 - Desechar el sobrenadante dejando la capa celular. Añadir tampón de lisis de eritrocitos hasta alcanzar un volumen de 50mL y agitar suavemente hasta alcanzar la total disolución de la mezcla. Centrifugar 15 minutos a 3500 rpm (10g) y a 4°C sin freno.
 - Decantar el tubo con cuidado y añadir nuevamente tampón de lisis de eritrocitos hasta un volumen total de 50mL. Centrifugar 15 minutos a 3500 rpm (10g) y a 4°C sin freno.
 - Desechar el sobrenadante.

Tabla 3.3 – Reactivos empleados en la extracción manual de ADN.

Preparados/ Requerimientos y conservación	Reactivos	Cantidad	
Tampón de lisis de eritrocitos	Tris 2M (pH=7,5)	5mL	
Solución extemporánea	MgCl ₂ 1M	2,5mL	
	H ₂ O c.s.p.	500mL	
Tampón de lisis de leucocitos (WCLB) (pH=8,2)	NaCl 5M	40mL	
Esterilizar Conservar a 4°C	EDTA 250mM (pH=8,0)	4mL	
	Tris 2M (pH=7,5)	2,5mL	
	H ₂ O c.s.p.	500mL	
Solución de proteinasa K	Proteinasa K	100mg	
Conservar a -20°C	SDS 10%	5mL	
	EDTA 250mM (pH=8,0)	400µL	
	H ₂ O c.s.p.	50mL	
Tris 10mM/EDTA 0,2mM (pH=7,5)	Tris 2M (pH=7,5)	1mL	
Esterilizar Conservar a 4°C	EDTA 250mM (pH=8,0)	8µL	
	H ₂ O c.s.p.	100mL	
Solución de cloroformo/alcohol isoamílico Mezclar las soluciones A y B y agitar durante toda la noche Conservar a 4°C Preservar de la luz	Solución A	Cloroformo	480mL
		Alcohol isoamílico	20mL
	Solución B	TRIS 2M pH=8,1	5mL
		H ₂ O c.s.p.	500mL
Solución de etanol 70% Conservar a -20°C	Etanol absoluto	700mL	
	H ₂ O c.s.p.	1000mL	

2) Digestión de proteínas

- Añadir tampón de lisis de leucocitos (WCLB), SDS 10% y solución de proteinasa K. La cantidad de cada uno de estos reactivos depende del tamaño del precipitado obtenido en la fase de lavado (Tabla 3.4).

Posteriormente, agitar con vórtex hasta observar un aspecto homogéneo. Dejar a 37°C en baño-maría o estufa y agitación durante una noche.

Tabla 3.4 – Cantidades variables de reactivos que hay que añadir para digerir las proteínas en función del tamaño del precipitado.

WCLB	3mL	4mL	5mL	6mL
SDS 10%	200µL	266µL	333µL	400µL
Sol. Proteinasa K	500µL	666µL	833µL	1000µL

3) Extracción de ADN

- Añadir 1mL de 5,5M NaCl. Agitar durante 15 segundos en vortex y centrifugar 15 minutos a 3500 rpm (10 g) y a 4°C sin freno.
- Con el objeto de eliminar el exceso de sales, traspasar el sobrenadante a otro tubo Nunc y centrifugar 15 minutos a 3500 rpm (10g) y a 4°C sin freno.
- Añadir v/v de cloroformo. Agitar manualmente durante 15 segundos y centrifugar 15-20 minutos a 3500 rpm (10g) y a 4°C sin freno. Traspasar la fase superior a otro tubo con cuidado para no llevarse las fases intermedia e inferior.
- Añadir 2 v/v de etanol absoluto (Merck) y agitar suavemente hasta observar la medusa de ADN.
- Recuperar el ADN y lavarlo con etanol al 70% a –20°C. Posteriormente pasarlo a un criotubo Nunc. Añadir 0,5-1mL (según la cantidad de ADN recuperado) de Tris 10mM/EDTA 0,2mM y dejarlo unas horas a 37°C en agitación para que se disuelva. Conservar posteriormente a –80°C.

3.2.1.1.2 Extracción automática

La extracción de ADN de forma automática se ha efectuado con el equipo MagNA Pure LC 1.0 (Roche Diagnostics), que realiza la extracción de ácidos nucleicos mediante la tecnología de partículas magnéticas combinado con el conjunto de tampones específicos del MagNA Pure LC ADN Isolation Kit- Large Volume (Roche Diagnostics). El protocolo de extracción usado es el V3_8_ADN LV Blood 1000, recomendado por el fabricante. El uso de esta tecnología nos permite obtener un volumen final de 200µl de ADN a una concentración aproximada de 100 ng/µl partiendo de 1 ml de sangre periférica.

3.2.1.2 Espectrofotometría de ADN

Una vez aislado el ADN procedemos a la medida de su concentración y a determinar su grado de pureza. Para ello usamos el espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Scientific) que permite medir la absorbancia a varias longitudes de onda

(260nm para los ácidos nucleicos y 280 nm para las proteínas) usando muy poco volumen de muestra (1µL) y sin necesidad de efectuar diluciones. De esta forma, el cociente entre ambas absorbancias nos da una estimación de la pureza de la muestra, debiendo estar este valor $\approx 1,6-2$.

3.2.1.3 Amplificación de ADN genómico mediante 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 desarrollada por Mullis y cols. [1986]. Esta técnica, que permite la obtención *in vitro* de millones de copias de un fragmento específico de ADN, está basada en la actividad de la enzima ADN polimerasa. Esta enzima es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a partir de otra ya existente (ADN molde). La polimerasa más utilizada es la que procede de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (*Taq* polimerasa) aunque hoy en día existe un gran abanico de enzimas recombinantes.

Los reactivos requeridos para la PCR son: el ADN molde, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), dos cebadores (pequeños fragmentos de ADN monocatenarios que se unirán por complementariedad de bases a ambos extremos de la región que queremos amplificar), un tampón de reacción que mantiene el pH adecuado, iones Mg^{2+} (en forma de $MgCl_2$) necesarios para la actividad de la enzima y la enzima ADN polimerasa.

La PCR se desarrolla en tres etapas:

- **Desnaturalización** – Esta fase se realiza a 94°C y consiste en la separación de la doble cadena de ADN. Cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su complementaria.
- **Hibridación** – Fase en la que los cebadores se unen a su región específica. La temperatura de hibridación es variable según los cebadores diseñados ($\approx 50-65^\circ C$) ya que depende de la naturaleza de la secuencia, principalmente de su contenido en bases Guanina-Citosina.
- **Extensión** – Esta fase se realiza a 72°C y en ella la enzima ADN polimerasa incorpora los desoxinucleótidos disponibles en el medio y extiende la hebra que se está sintetizando.

A continuación se describen los reactivos utilizados (Tabla 3.5) y las condiciones de amplificación (Tabla 3.6) que han sido utilizadas de manera general en nuestro laboratorio. No obstante, la tecnología de la PCR no se reduce a un único dictado de instrucciones que trabajan en cualquier situación [Innis, 1990], por lo que es necesario

ajustar algunos parámetros del proceso para cada fragmento de ADN que se quiera amplificar. Las modificaciones que se hicieron sobre estos protocolos de amplificación estándar se describen a continuación.

Tabla 3.5 – Reactivos utilizados en la PCR estándar.

Reactivos	Cantidad
ADN genómico*	10ng
dNTPs (Roche Diagnostics)	200µM/cada uno
Tampón de PCR 10x (Roche Diagnostics)	2,5µL
MgCl ₂ (Roche Diagnostics)	1,5µL
Solución de cada cebador (10 µM, Sigma-Aldrich)	0,125µL
Taq ADN polimerasa (5U/µl, Roche Diagnostics)	0,2µl
H ₂ O c.s.p.	25µl

*10ng de ADN genómico humano, equivalen a 7500 copias de cualquier segmento monocopia [Innis, 1990].

Tabla 3.6 – Condiciones generales de amplificación.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5'	
Desnaturalización	95	30''	35 ciclos
Hibridación	Th*	30''	
Extensión	72	1'	
Extensión final	72	7'	
Conservación del producto	4	∞	

* Th: Temperatura de hibridación (≈50-65°C).

Una variante de la PCR estándar es la PCR de largo alcance o *long range* (LR-PCR). Su finalidad es amplificar secuencias de ADN de gran tamaño (hasta 15 Kb), y así reducir el número de reacciones de PCR para la amplificación de cada uno de los exones de un gen. Las condiciones específicas de amplificación mediante LR-PCR se resumen en las Tabla 3.7 y Tabla 3.8:

Tabla 3.7 – Reactivos utilizados en la PCR de largo alcance (LR-PCR).

Reactivos	Cantidad
ADN genómico	10ng
Soluciones potenciadoras o <i>enhancers</i> A y B (Sequal Prep™)	1-2µL*
Tampón de PCR 10x (Sequal Prep™)	2,5µL
DMSO	0,4µL
Solución de cada cebador (10µM)	0,5µL
Polimerasa de largo alcance (5U/µL, Sequal Prep™)	0,36µL
H ₂ O libre de ADNasas c.s.p.	20µL

*Las soluciones potenciadoras o *enhancers* A y B se usan en concentraciones variables dependiendo de la naturaleza del fragmento a amplificar. De manera estándar se añade 1µL de *enhancer* A.

La principal diferencia entre el protocolo LR y el estándar radica en unos mayores tiempos de extensión para los protocolos LR y por tanto, para el proceso de PCR global. Es lógico pensar que al aumentar el tamaño del amplicón, la enzima *taq* polimerasa requiera más tiempo para amplificar dicho fragmento. Este tiempo se estima en 1 minuto por Kb, así, para un fragmento de ≈ 3000 bases el tiempo de extensión será de 3 minutos. Además, en este tipo de protocolos con tiempos de extensión incrementados, es frecuente la pérdida de actividad de la enzima durante el proceso. Una forma de contrarrestar esto es programar el termociclador para que el tiempo de extensión se incremente en 20 segundos por ciclo. De esta forma, para un fragmento de 3.000 bases y 25 ciclos, el primer ciclo durará 3', el segundo 3'20" y así sucesivamente hasta llegar a los 11'20" del ciclo #25 (Tabla 3.8).

Tabla 3.8 – Condiciones de amplificación por LR-PCR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº Ciclos
Desnaturalización inicial	94	2'	
Desnaturalización	94	10''	10 ciclos
Hibridación	Th	30''	
Extensión	68	1'/Kb*	
Desnaturalización	94	10''	20-30 ciclos
Hibridación	Th	30''	
Extensión	68	1'/Kb + 20''/ciclo**	
Extensión final	72	5'	
Conservación del producto	4	∞	

*El tiempo de extensión se estima en 1' por cada Kb del fragmento que se quiere amplificar.**En la segunda fase de ciclos D-H-E, se programa el termociclador para que se incremente el tiempo de extensión en 20" por ciclo.

3.2.1.4 Electroforesis en gel y capilar

Tras la finalización de la PCR se realiza una electroforesis para comprobar la correcta amplificación del fragmento en estudio. Hemos utilizado la electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, agente que se intercala entre los pares de bases adyacentes del ADN. Cuando se expone bromuro de etidio a luz ultravioleta emite una luz roja-anaranjada, que se intensifica unas 20 veces después de haberse unido a una cadena de ADN, posibilitando la visualización de nuestro producto. El bromuro de etidio se intercala en el ADN y, por ello, tiene un poderoso efecto mutágeno y, posiblemente cancerígeno y teratógeno. Como alternativa al bromuro de etidio, hemos empleado el compuesto no mutagénico *bluxyo safe* (gTP bio). Además, también hemos utilizado el QIAxcel (Quiagen) que realiza una electroforesis capilar de forma

automatizada y ofrece una imagen digital de los fragmentos amplificados con mayor precisión.

3.2.1.5 Secuenciación automática de productos de PCR y análisis de los datos.

La secuenciación permite determinar la secuencia nucleotídica exacta del fragmento de interés. Existen dos métodos clásicos de secuenciación: el químico [Maxam y Gilbert, 1977] y el enzimático de Sanger [Sanger y cols., 1977]. La secuenciación automática está basada en el método enzimático de Sanger que utiliza dideoxinucleótidos (ddNTPs) como terminadores. Cada uno de los 4 dideoxinucleótidos está marcado con dos fluorocromos diferentes: un fluorocromo donador que es la fluoresceína, y un fluorocromo aceptor que es diferente para cada uno de los 4 dideoxinucleótidos. La fluoresceína actúa como fluorocromo donador, de manera que cuando el láser incide sobre el capilar, ésta absorbe la energía y la transfiere al fluorocromo del mismo dideoxinucleótido. Cada fluorocromo aceptor emite a su correspondiente longitud de onda, de manera que dicha emisión es registrada por el secuenciador, consiguiéndose así la detección e identificación del nucleótido terminador de cada fragmento obtenido en la reacción de secuenciación.

Para llevar a cabo esta técnica partimos del producto de una reacción de PCR convencional con los cebadores específicos de cada fragmento de ADN que se quiere amplificar. El producto de PCR se purifica mediante el método enzimático de purificación ExoSAP-IT® USB Corporation siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado, se lleva a cabo la reacción de secuenciación (Tabla 3.9 y Tabla 3.10) utilizando el kit comercial BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) en cualquiera de los termocicladores disponibles en nuestro laboratorio.

Tabla 3.9 – Reactivos utilizados en la reacción de secuenciación.

Reactivos	Cantidad
Producto de la PCR purificado	2µL
Tampón de Secuenciación 5x (Applied Biosystems)	2,5µL
Solución del cebador (10 µM)	0,5µL
BigDye® Terminator (Applied Biosystems)	0,5µl
H ₂ O csp	10µl

Tabla 3.10 – Condiciones de la secuenciación por el método Sanger.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	96	3'	
Desnaturalización	96	10''	35 ciclos
Hibridación	50	5''	
Extensión	60	4'	
Conservación del producto	4	∞	

El producto de la reacción de secuenciación se purifica mediante el empleo de las placas AutoSeq96, que contienen Sephadex G-50 prehidratado (Amersham Biosciences). Alternativamente, también se usan placas MultiScreen®_{HTS} Assay System (Millipore) previamente rellenas de Sephadex G-50 prehidratado (Sigma Aldrich). El producto purificado se dispone ordenadamente en placas de 96 pocillos, que son las que se introducen en el correspondiente dispositivo del secuenciador para proceder a la inyección en el secuenciador ABI Prism® 3730, de 96 capilares (Applied Biosystems).

Las condiciones generales de inyección son un voltaje de 1,5 KV durante 15 segundos, aunque en función del producto a secuenciar, se pueden modificar los parámetros de tiempo y voltaje. La electroforesis se realiza dentro de cada uno de los capilares rellenos del polímero POP-7™ Performance Optimized Polymer (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones generales de voltaje y tiempo: 9KV y 94 minutos, aunque el tiempo de la carrera puede variar en función del tamaño de los productos. El tampón de electroforesis utilizado es 10X Buffer con EDTA (Applied Biosystems).

El análisis de los datos obtenidos procedentes de la secuenciación consiste en el alineamiento de las secuencias entre sí con la secuencia de referencia obtenida de las diferentes bases de datos. Para ello, utilizamos el programa DNASTAR® Lasergene 8 SeqMan™ que permite estos tipos de alineamientos múltiples, así como ver de forma fácil las diferentes variaciones que puedan presentarse. El objetivo de este alineamiento es precisamente la comparación tanto de la secuencia como de los cromatogramas para identificar estas variaciones de la secuencia problema con respecto a la secuencia de referencia. Seguidamente, se cotejan con las bases de datos disponibles en la web (www.ensembl.org/Homo_sapiens/genesnpview; www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=snp) para confirmar si son variaciones conocidas y localizarlas en la secuencia codificante o en alguna región consenso que pudiera participar en algún proceso regulatorio, o de maduración del ARN mensajero.

3.2.2 Evaluación de grandes deleciones y duplicaciones mediante MLPA

La técnica MLPA (*Multiple Ligation-dependent Probe Amplification*) es una técnica cuantitativa que permite detectar grandes deleciones, duplicaciones o variaciones en el número de copias (*CNVs o Copy Number Variations*) en una región de ADN genómico o de ARN [Schouten y cols., 2002].

El kit de MLPA (MRC-Holland) consiste en un conjunto de sondas complementarias tanto a las regiones intragénicas de interés (exones e intrones) como a otras regiones distintas del genoma cuya correcta hibridación nos dará una idea de la

calidad del proceso. La reacción puede llevarse a cabo en cualquier termociclador programable (Tabla 3.11) y consta de las siguientes etapas (Figura 3.1):

Tabla 3.11 – Condiciones de la reacción de MLPA.

Desnaturalización inicial	98°C	5'	
Adición de reactivos para la hibridación 25°C			
Hibridación	95°C	1'	
	60°C	16h	
Ligación	54°C	15'	
	98°C	5'	
Adición de reactivos para la amplificación 60°C			
Amplificación	95°C	30''	33-40 ciclos
	60°C	30''	
	72°C	1'	
	72°C	20'	
Conservación del producto	4°C	∞	

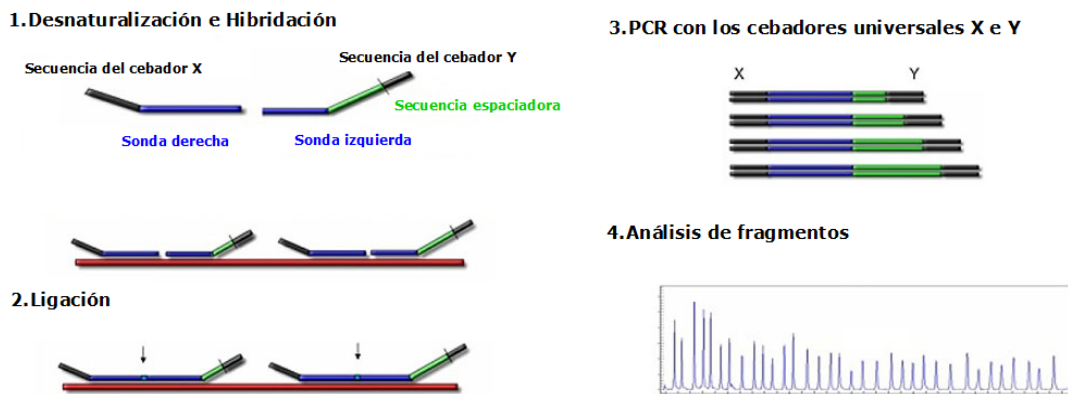


Figura 3.1 – Fundamento del MLPA.

- **Hibridación del ADN genómico**, previamente desnaturalizado, con el kit de sondas.
- **Ligación de las sondas** una vez hibridadas a su diana mediante el uso de una ligasa termoestable. Tras la ligación se genera una sonda continua flanqueada por sitios de unión a cebadores universales.
- **Reacción de PCR** con los cebadores universales marcados con un fluorocromo.
- **Análisis de fragmentos.** Los resultados se analizan con el programa GeneMarker v1.75 (Softgenetics) comparando el electroferograma del paciente con el de individuos control, con el fin de asegurarse que no presentaban

alteraciones génicas en las zonas a estudiar. Se normalizaron las muestras en función de la altura de los picos y se considera la dosis génica normal diploide entre 0.75 y 1.30. Los resultados fuera de este rango deben ser repetidos en dos experimentos independientes para ser considerados válidos.

3.2.3 Micromatriz de genotipado específica para RPar de Asper Biotech

Para este trabajo se seleccionaron 104 familias diagnosticadas clínicamente de RPar cuyo individuo índice fue analizado mediante el uso de una micromatriz específica para RPar.

La micromatriz de genotipado de Asper Biotech detecta mutaciones conocidas en genes implicados en distintas patologías de base genética. Está basado en la técnica APEX que combina la eficiencia de las matrices con la secuenciación Sanger y consta de las siguientes etapas (Figura 3.2):

- **Preparación de la muestra:** Se amplifican los fragmentos de interés en la muestra de ADN del paciente mediante PCR.
- **Hibridación sobre la matriz:** El producto de PCR se hibrida sobre micromatrices que llevan inmovilizadas una serie de sondas de oligonucleótidos correspondientes a las mutaciones que se quieren testar. Los oligos se inmovilizan por su extremo 5' quedando la base a interrogar libre en el extremo 3'.
- **Extensión:** Se añaden terminadores de cadena (ddNTPs) marcados con fluorocromos que se unirán a la base complementaria del extremo 3' que ha quedado libre.
- **Detección:** La fluorescencia del ddNTP se detecta mediante un escáner.

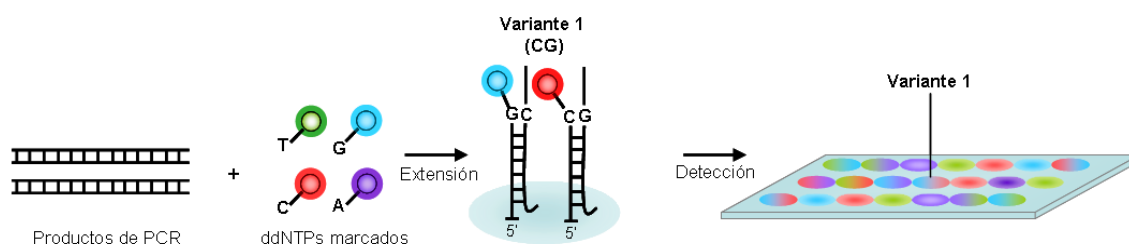


Figura 3.2 – Esquema de funcionamiento de la micromatriz basada en la tecnología APEX.

En el ejemplo se ilustra el genotipado de una variante (variante 1 con el cambio G/C) para una muestra con el genotipo CG. Adaptada de Syvänen [Syvanen, 2001].

En el momento del estudio, la micromatriz de genotipado de RPar testaba 584 variantes en 19 genes implicados en la patogénesis de la RPar: *CERKL*, *CNGA1*, *CNGB1*,

CRB1, MERTK, PDE6A, PDE6B, NR2E3, RDH12, RGR, RLBP1, SAG, TULP1, RPE65, USH2A, USH3A, LRAT, PROM1 y PBP3. La Tabla 3.12 muestra el número de mutaciones estudiadas en cada uno de los genes del panel. Se puede observar que genes como *USH2A* o *CRB1* están muy bien representados con un gran número de variantes analizadas, sin embargo otros como *CERKL, CNGB1, PROM1* o *PDE6A* están muy poco representados. Esto se puede deber en parte a que son genes cuya prevalencia en la población es menor y/o su descubrimiento ha sido más reciente por lo que el número de estudios publicados con mutaciones asociadas es menor. No obstante, el diseño está sometido a revisiones periódicas encaminadas a incluir el estudio de nuevos genes y/o nuevas mutaciones.

Tabla 3.12 – Número de variantes genotipadas en la micromatriz de Asper Biotech de RPar.

Gen	Número de variantes estudiadas
<i>CERKL</i>	2
<i>CNGA1</i>	5
<i>CNGB1</i>	1
<i>MERTK</i>	10
<i>PDE6A</i>	16
<i>PDE6B</i>	26
<i>NR2E3</i>	27
<i>RDH12</i>	42
<i>RGR</i>	8
<i>RLBP1</i>	13
<i>SAG</i>	4
<i>TULP1</i>	22
<i>LRAT</i>	3
<i>CRB1</i>	106
<i>RPE65</i>	99
<i>PROM1</i>	1
<i>PDE6A</i>	1
<i>USH2A</i>	188
<i>USH3A</i>	10
Total	584

3.2.4 Micromatriz de resecuenciación de diseño personalizado para RPar

3.2.4.1 Diseño de la micromatriz de resecuenciación

La micromatriz de resecuenciación ha sido diseñada por nuestro grupo de investigación [Gonzalez-Del Pozo y cols., 2011]. Se basa en la tecnología de la

secuenciación por hibridación sobre matrices desarrollada por Affymetrix (Santa Clara, CA) descrita Fedan y Cutler [2001].

Cada *matriz* lleva inmovilizados sobre su superficie sondas de oligonucleótidos que cubren toda la secuencia génica de interés (Figura 3.3). En función del número de bases que se quiera analizar, existen tres formatos de matrices distintos:

- Formato 49 – Capacidad máxima: 303.366 bases.
- Formato 100 – Capacidad máxima: 117.254 bases.
- Formato 169 – Capacidad máxima: 47.974 bases (utilizado en el presente trabajo).

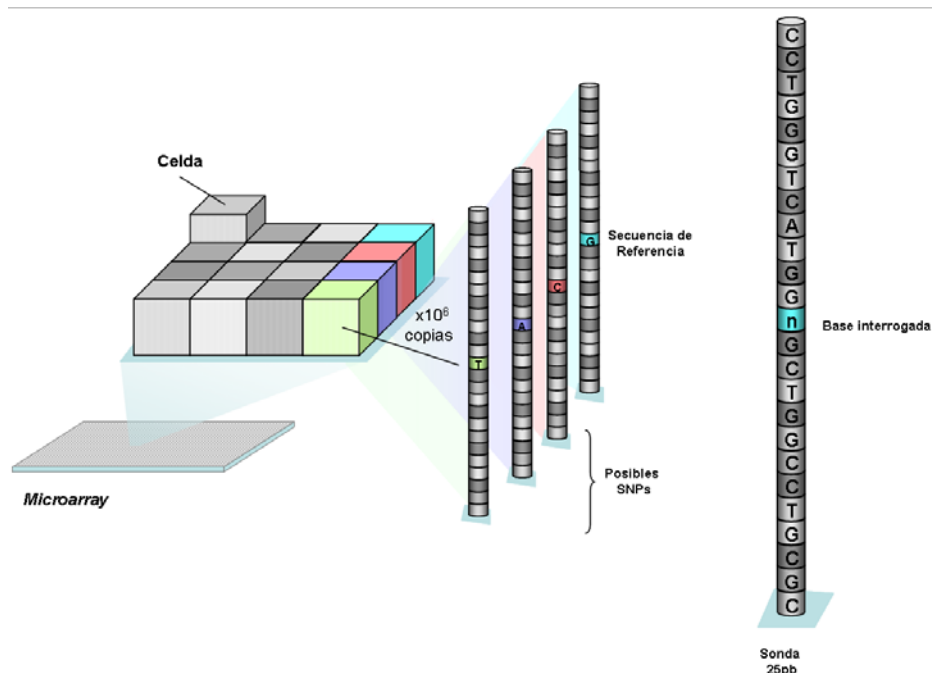


Figura 3.3 – Estructura de una micromatriz o *microarray*.

Cada micromatriz está constituida por 3×10^5 celdas que contienen 1 millón de copias de sondas cada una. Cada sonda tiene una longitud de 25pb siendo la posición intermedia, la base interrogada. La presencia en la matriz de sondas con posiciones intermedias variables (A, C, G y T) permite la detección de todas las posibles sustituciones nucleotídicas.

Las micromatrices de mayor formato están constituidas por aproximadamente 3×10^5 celdas con un tamaño de $20 \times 24 \mu\text{m}$. Cada celda lleva inmovilizadas 10^6 copias de una misma sonda de 25 oligonucleótidos de longitud. Por cada posición del genoma que se quiere interrogar, existen 8 celdas con 8 tipos diferentes de sonda, 4 complementarias a la cadena en sentido directo (*forward*) y otras 4 para la cadena antisentido (*reverse*). Las cuatro sondas se diferencian únicamente en la posición central o base número 13 en la que cada una lleva un nucleótido distinto (A,G,C,T) permitiendo la detección de cualquier sustitución nucleotídica en ambas cadenas. Las

matrices son fabricados usando la fotolitografía estándar y síntesis de ADN en fase sólida que descrita por Fedan y Cutler [2001].

La micromatriz que hemos empleado incluye todos los exones y 15pb de secuencia intrónica flanqueante de 16 genes asociados a distintas distrofias de retina en general y la RPar en particular

Tabla 3.13 – Genes incluidos en la micromatriz de resecuenciación de diseño personalizado.

Gen	Nombre del gen	MIM	Localización genómica
<i>CERKL</i>	Ceramide kinase-like	608381	2q31.3
<i>CNGA1</i>	Cyclic nucleotide gated channel alpha 1	123825	4p12-cen
<i>CRB1</i>	Crumbs homolog 1 (Drosophila)	604210	1q31-q32.1
<i>EYS</i>	Eyes shut, Drosophila, homolog of <i>EYS</i>	612424	6q12
<i>IDH3B</i>	Isocitrate dehydrogenase 3, beta subunit	604526	20p13
<i>LRAT</i>	Lecithin retinol acyltransferase (phosphatidylcholine--retinol O-acyltransferase)	604863	4q32.1
<i>MERTK</i>	C-mer proto-oncogene tyrosine kinase	604705	2q14.1
<i>NR2E3</i>	Photoreceptor-specific nuclear receptor isoform	604485	15q22.32
<i>PDE6B</i>	Phosphodiesterase 6B, cGMP-specific, rod, beta	180072	4p16.3
<i>PRCD</i>	DOG, homolog of PRCD	610598	17q25.1
<i>PROM1</i>	Prominin 1	604365	4p15.32
<i>RGR</i>	Retinal G protein coupled receptor	600342	10q23
<i>RHO</i>	Rhodopsin	180380	3q21-q24
<i>RLBP1</i>	Retinaldehyde binding protein 1	180090	15q26
<i>RPE65</i>	Retinal pigment epithelium-specific protein 65kDa	180069	1p31
<i>TULP1</i>	Tubby like protein 1	602280	6p21.3

En total, sobre la superficie de la micromatriz se inmovilizaron un total de 45.096 pb, de las cuales 44.282 pb corresponden a secuencias génicas, mientras que el resto corresponde a controles internos del proceso (Affymetrix control reference sequence; AFFIX-TagIQ-EX).

Las secuencias repetitivas y las duplicaciones internas que pueden conducir a fallos en la hibridación fueron identificadas mediante el programa bioinformático Repeat Masker (<http://www.repeatmasker.org/>) y excluidas del diseño.

3.2.4.2 Procedimiento experimental y análisis de los resultados

Mediante esta micromatriz se analizaron un total de 102 individuos afectados de RPar, de los cuales 98 carecían de causa genética identificada y 4 fueron usados como controles positivos por presentar mutaciones ya conocidas.

El punto de partida de esta técnica es el ADN genómico sometido a la amplificación de las regiones de interés (Figura 3.4 y Figura 3.5). Las muestras deben tener los siguientes requisitos:

- ADN de cadena doble no degradado (banda única de tamaño > 1,5Kb en gel de agarosa 1%).
- Concentración $\geq 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$
- Cociente de las absorbancias $A_{260}/A_{280} \approx 1,8$

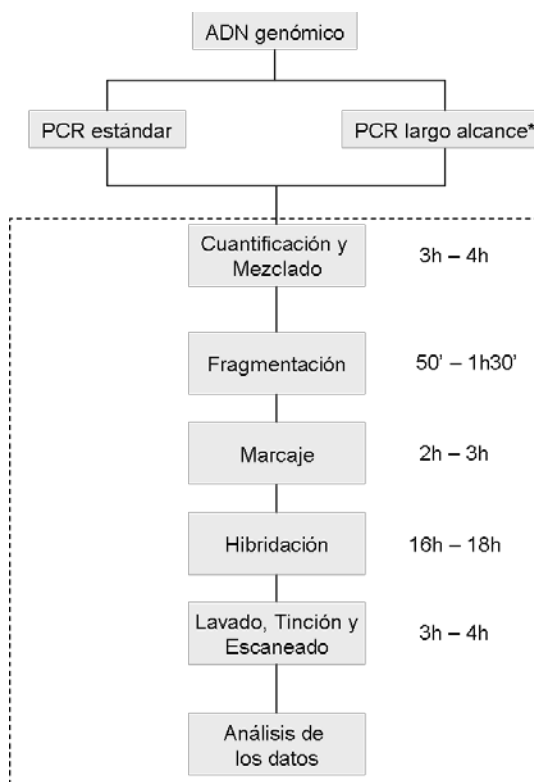


Figura 3.4 – Visión general del protocolo de resecuenciación.
 La duración estimada de cada etapa viene indicada a la derecha. *Protocolo recomendado.

Para la amplificación de todos los exones de los 16 genes incluidos en la matriz, se diseñaron un total de 93 fragmentos de tamaños comprendidos entre 301-7480pb. Para amplicones de tamaños superiores a 1.196pb se emplearon los protocolos de PCR de largo alcance (Tabla 3.7 y Tabla 3.8), mientras que para el resto de amplicones se emplearon las condiciones de amplificación estándar (Tabla 3.5 y Tabla 3.6).

Las condiciones específicas de la PCR, como la temperatura de hibridación, el tamaño de los amplicones y la secuencia de los cebadores, se detallan en las tablas 3.14-3.29. El diseño de cebadores se llevó a cabo mediante la utilización del programa Primer3 (versión 0.4.0.) (<http://frodo.wi.mit.edu/>).

Tabla 3.14 – Cebadores del gen CERKL.

Gen CERKL				
Exón/s	Secuencia Forward (5'→3')	Secuencia Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1	GGGAGCCACTTATTCTTCCTCT	ACTTGGGGACTCGGTAACCT	641	57
2-4	CTTTTAGGTTCTGGGGTACACG	GCCATCTAACCCCTAAACTGTGC	1533	57
5	GGGATATACCTATTTCACAGCTAGG	TGGCTGCAGTAGGTTATGAAGA	473	57
6-7	CAGGCCAGTAACACTTAGTCCTC	CAGACCTAACTCCCTTCCTGA	1092	59
8	CCTGTGTTGTGTTTGTGTTGTC	CTCACATTTGCTAGTGGGGATG	463	57
9-14	ATGTATGCATTTGCTACTGCTC	TGCAAACAAATGTCAGGAAG	5820	Th
15-16	GGAGATCCCTGTTTCATAGTCTCA	TGAAACTGGTCCCAAAAAGG	1330	57

Th: Temperatura de hibridación.

Tabla 3.15 – Cebadores del gen CNGA1.

Gen CNGA1				
Exón/s	Secuencia Forward (5'→3')	Secuencia Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1-3	CCTATGTGTCATGGGAGGAACT	CTGTCTCTGAGGAAATTCACC	3579	57
4-7	TTGGGGTAGAAACCTCCAGTAA	TGCCTGGTAACTTCTCTGAAT	3008	55
8	TAGTGCTATCATGGCTCACTGC	CAAGATCTAACTGCCTGCTA	2211	50

Th: Temperatura de hibridación.

Tabla 3.16 – Cebadores del gen CRB1.

Gen CRB1				
Exón/s	Secuencia Forward (5'→3')	Secuencia Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1	CAGAAGAAAACCTCGCAGCAAAG	CTGACTGTTACATTGACTGGT	552	57
2	ACAGCCAGTAGATGGCAAACCTT	GTGGATTTTCAGCAGTTTAGGG	1196	59
3-4	TTCTTTGTAACAGCTGCTCTGC	GGCAGCTTGGTAACCTACTTCA	3604	65
5	GGTTTTGTGGATATTGCTGAC	GACTAGGTCATTTTTCCAGTG	967	59
6	CACCATGTGTTAAGCAGGGATA	GCTGAAGCCATGGTTAATGA	654	55
7	CAGCCAGGGCAGAAATATACAA	TGATTGTGGAGCAAGTGTGA	1850	55
8-9	CAGTGCAGAGATCTTTTTGGTC	CCCTATTTTACAGGTGAGGAAGC	2859	59
10	TGCTATCAGACCATCCAGTTT	TGAGATCCCATCTGAACATGAC	1376	55
11-12	GTAGAGTGCTGTCTTGCTTCC	TCCTTTTTCTCCCAAGAGA	4358	57
13	GGCTCATCTTTGCTTTGT	CTAGGAAGCGTTTTGCCTAAC	1280	55

Th: Temperatura de hibridación.

Tabla 3.17 – Cebadores del gen *EYS*.

Gen <i>EYS</i>				
Exón/s	Secuencia Forward (5'→3')	Secuencia Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1	TACACAAAGCTCCAGATGGTGA	CCCCAAATCCTGTATCTCAAAG	2928	55
2	GGCAGGATACTGGCTAATCTGA	GCAGGGAATGAGGCAAGATTAT	301	59
3-5	CCATCCTCTGGATTATCATAAAAG	CTATGTCGGCTCACTGCAAG	6719	65
6-7	TTTGCAAAGTTACTGTAGAATTGC	CAACAATTAACCCAAAACATGC	3641	55
8	GCTTTTTGGCTAAGATCACAGG	CCCCTATTGCTAAGCTTTACATAAC	423	59
9	GGCTTTTGAACATGGATATGAC	TCTCTGCACCAAGTAGATTTC	574	57
10	CAGGAACCTATTTTGTGGCAGA	TTCCAAGTAGACTGTTGAGAATTTG	438	59
11	GGCATCTATCATGATCTCTCAGG	TTCTCCCTCCTTTTATTGTGC	474	57
12	AATGCACCCACAACATCTTC	GAGCAAGGCTGTGTAGTCAGATT	596	59
13	TGGCATTCTTATCTAATAAATT	TTGGTTGGTCACTTTAGAAGC	393	50
14	TTGGTTAAAAGTGAACACATAAATGA	TGCTTGAGTTTCTGTTTTCTAACC	382	50
15	GAGATATCAAAATGGCCAGGA	ATGATTGCGACACCATCTTG	367	50
16	TCACAGGAAATTAGGCAAACAA	GGATTTTCCAACCCATTTT	532	50
17-18	CTGGCATGTTTTTATGCACAC	CATTTTGCTCAGGCACACAT	805	50
19	AAAATTTTGAAGGAGAATTGC	ATTTTTGCCCTGTTTGCATC	433	50
20-21	TGTGCTTTGTTTTGTCAATCAC	CAACAAGAGACAAAGAAAGAAAAGG	1611	55
22	GAGGAAGGAAATGTCAAACAAG	TTGCAGAGTGCATTACTAGTGG	408	59
23	GCCACAATCAACTCATTGTCA	TTCCTGATGAAAGCCTAAGTGC	497	59
24	AACTGATCATGAAGATACACTGAGG	GACAACAAGGGAAAGAGGAATG	437	59
25-26C	TGTCTATGGAAATGCAAATGGA	GACCATGACAGGCTTTTCTTC	4026	57
27-28	TTGAAAGAGGCAGGAAAGAGAC	GGGGATAGGGTCACCTTAAAC	5308	57
29	GATTAATCTGCTTCTGGCTTTG	TGAAAAACAGACTGACATTGG	531	57
30	CCCATGTTCAATGCAGCATTAT	GAACGTAGGAATGTGAAGCAA	477	57
31	AGGGTCATGTTATGTGGCTCAG	CAGCTGTTTCTTGTGTGC	559	57
32	TTCAGTCTTTCTCTGTACTGG	GCTCTGAAACATTTGCAGCAT	657	57
33	ACTCCTACCAACCCCTAAATC	GTGGTGGTGCACATCTGTAGTC	470	57
34	TTCTGAAAGCATTCCATGTCC	TTTTCTGGTGCTTTGTTGAGAG	496	57
35	GCCACAATAGCAACCTCTTTT	ACATGTGTGCATCATTTAGGT	506	57
36	GCATATGTGTTTCATGCATGTGT	CTGCTTGGTGATCAGTCTCACT	438	57
37	AGATGCATCAGCAAAACGTAAC	GCATCTAGGCAAAGGTCTTTT	378	57
38-39	GAATAACAACAGCCAGTTGCAC	TGTTCAAGTCTGAAAGCAATCC	1409	57
40	TTCTCTGCGATTTCTGTATTC	CTGTCCTCCCATCATGTAACAA	484	57
41	GACAAGTTAGCATCAGGGCAAT	GAAAAAGAGGACAGTGGATTTG	386	57
42-43	CTTATCCAACCTGGCCAGA AAC	GATTCCCCGTAAGCAATGTATC	7207	57

Th: Temperatura de hibridación.

Tabla 3.18 – Cebadores del gen *IDH3B*.

Gen <i>IDH3B</i>				
Exón/s	Secuencia Forward (5'→3')	Secuencia Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1-12	AACTCAGTACAGGCCGGAAGTC	GCATCCCAGGAAGATTAGAATG	5993	57

Th: Temperatura de hibridación.

Tabla 3.19 – Cebadores del gen LRAT.

Gen LRAT				
Exón/s	Secuencia Forward (5'→3')	Secuencia Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1-2	ATCTCTCCAAGAGGACTTTCC	ACACATGCCAAATACCCACATA	6284	53

Th: Temperatura de hibridación.

Tabla 3.20 – Cebadores del gen MERTK.

Gen MERTK				
Exón/s	Secuencia Forward (5'→3')	Secuencia Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1	CTCCCTTCACTTCTCTTTCC	ACCAGACTGCTACCTACGTTC	854	57
2-3	GACTCTTCCAGAGGCGAGTTTA	TGGCTAAGAGGAAAGAGTGGAG	1942	59
4-5	CCCCATCATGAAGAGTAATGT	ATCCACTCTCTCGGTGTCAAAT	3242	57
6-7	CTCAGAACCCTTTCTTGAT	ACTTCCCTGGTCTCATGATGT	3654	57
8	GAAACCCATCTCTAAAAGCAG	ACATATATTGGAGTGGCCGAAG	987	59
9	TCTCCTGAGGGACTGGAACACTAC	CATGAATTGCTGGACTGCTAAG	883	59
10-11	TGTC AAGGGATAGTGTGACTGG	CAGCAATCCAGTTTGAGTAGCA	3864	57
12-14	GGAAGCTCTGTAGCATCCTTGT	ATTTCTCCTTTCTGGGGAAC	3361	57
15-16	CCCTCCTGACACACATAATTT	TCAGTTGTGCAGTCTTCTTGGT	2541	55
17-20	CCTAATTGGAAACAGCTCATCC	CATTCAAGGACCTCATGCACTA	3794	50
21	CTCAACTCTGCCATTGTGACAT	TCTCTAAGCCTGGATTCTTGG	1908	57

Th: Temperatura de hibridación.

Tabla 3.21 – Cebadores del gen NR2E3.

Gen NR2E3				
Exón/s	Secuencia Forward (5'→3')	Secuencia Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1-8	ACAGAGTTCAGGAAGGGAGACA	TCTGCTGGGTACACACACCTAC	7174	59

Th: Temperatura de hibridación.

Tabla 3.22 – Cebadores del gen PDE6B.

Gen PDE6B				
Exón/s	Secuencia Forward (5'→3')	Secuencia Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1	CAGTTACTCCAGCCTTCATTC	GATGTCAGCTTGAGCCAGAAG	905	65
2-3	TGTCCAAGTCTGCTGGACTG	ACTCATACTGGCTTCTCCAAG	1852	65
4-12	ACAGATTCCACTTTCCACTCGT	CGTGTGCATTTTACCTGTTCTG	7216	59
13-19	GTCCATGCCTAAAACCAACATC	GCATTGTCCATCATACCACTGT	3940	Th
20-22	AAGAAGCTGCCACAGTTCTTA	TCAGTCATTTTCTTGGGCTTCC	3900	65

Th: Temperatura de hibridación.

Tabla 3.23 – Cebadores del gen PRCD.

Gen PRCD				
Exón/s	Secuencia Forward (5'→3')	Secuencia Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1-6	GGGAAGTACTCAAAGTCCAAC	TGCCTGCCCTACTTTGAGAG	6410	59

Th: Temperatura de hibridación.

Tabla 3.24 – Cebadores del gen *PROM1*.

Gen <i>PROM1</i>				
Exón/s	Secuencia Forward (5'→3')	Secuencia Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1	AGTGCTTCCTGCTCCTTCT	CTGTGCAAAGCAATCGCTAA	454	63
2-4	GGCTTCTGGCTAGAGGTCATTA	GTGAGACACTCTTCATCAGCCTAA	5932	59
5-7	CTGGACCTGGACAAAGAACC	GCTCTCAGGGAACAAGAAAAGA	2147	59
8-10	CATTTACCAGTCCATCCCAAGT	GGGCTGGATGATGTTTATCAGT	5574	57
11-12	GTAGTCTGCACACCATGCATTT	ACACGACTCAGTTTTGGTTCT	3751	55
13-15	GAAGACCCAGGGCTATTTTAT	TAAGGAAGGAGAACGGTATGGA	7174	59
16-21	CCACATCCAGCTTTTATTGCTC	CCCTAGAAAATGGCTATCCTGA	6787	59
22-24	GGAGATCCTTTTTGTGACACC	AGAGAGAAGTGAAGGCATCAGC	5171	59
25	GGAAGTGAACATTGCAGCAC	AGTGGTATTCTGGAAAGTGAGG	322	59

Tabla 3.25 – Cebadores del gen *RGR*.

Gen <i>RGR</i>				
Exón/s	Secuencia Forward (5'→3')	Secuencia Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1-4	ACTCGTGAATGGGTTCTTCT	CTGCCTCAGACTTTCAGCTTTA	5877	59
5-8	CTCCTTCTGGCAGGATGTAGTG	ACTCAGGTCCATCTGGCTCTT	6137	61

Tabla 3.26 – Cebadores del gen *RHO*.

Gen <i>RHO</i>				
Exón/s	Secuencia Forward (5'→3')	Secuencia Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1-5	GCTTCTCCTAGTGTCACCTTG	AGGAGCCTATGTGACTTCGTTC	5368	61

Tabla 3.27 – Cebadores del gen *RLBP1*.

Gen <i>RLBP1</i>				
Exón/s	Secuencia Forward (5'→3')	Secuencia Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1-4	GCAGAGTCAGAATCATGGAGGT	ACCCAGGAAGGCCATGTATTA	4400	66
5-7	TAAACCTTCTGGCCTCTAAGCA	CCAAGTGGAGAACAGGGTGAC	1976	65

Tabla 3.28 – Cebadores del gen *RPE65*.

Gen <i>RPE65</i>				
Exón/s	Secuencia Forward (5'→3')	Secuencia Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1-5	GAAGGATTGAGGTCTCTGGAAA	GTGGCTCTCATGTTCTTTTAC	5844	61
6-10	GAGATGTCACAGGTAACCTCAGA	ACCTGGTTCTTATCCTGGCTCT	3264	57
11-14	TTCAGAGGCCTTTCTTTGGA	GAATTGCTTGCTCAACTCAGTG	2275	61

Tabla 3.29 – Cebadores del gen *TULP1*.

Gen <i>TULP1</i>				
Exón/s	Secuencia Forward (5'→3')	Secuencia Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1-11	GAGTTGAGATTCTTCCCCAGT	AACAAGCTCCCCACATGATCTA	7480	61
12-15	GCAGGGGACATGAATTGCTC	CCGACACAGGAGCAGTTTTTC	5774	61

Th: Temperatura de hibridación.

Tras la reacción de PCR, se procedió a medir su concentración mediante un ensayo con el agente fluorescente PicoGreen (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent, Invitrogen, CA) que permite cuantificar con gran sensibilidad el ADN de doble cadena en solución. Teniendo en cuenta las concentraciones y el tamaño de los amplicones, se mezclaron los productos de PCR de un mismo paciente en cantidades equivalentes y se procedió a su purificación mediante placas de purificación Clontech (Clontech, Mountain View, CA). A continuación, el ADN se fragmentó, se marcó con biotina y se hibridó sobre la micromatriz durante 16 horas a 49°C en un horno rotatorio a 60 rpm. Posteriormente, los chips son lavados y teñidos en la estación fluidica con soluciones de estreptavidina conjugada con el cromóforo R-ficoeritrina y el anticuerpo antiestreptavidina biotinilado. La estreptavidina se caracteriza por su gran afinidad a la biotina, así, mediante lavados sucesivos con el anticuerpo antiestreptavidina biotinilado y la estreptavidina marcada se consigue la amplificación de la señal (Figura 3.5). Por último, los chips se introdujeron en el escáner GeneChip 3000 Scanner (Affymetrix, Santa Clara, CA), y se procedió a su lectura.

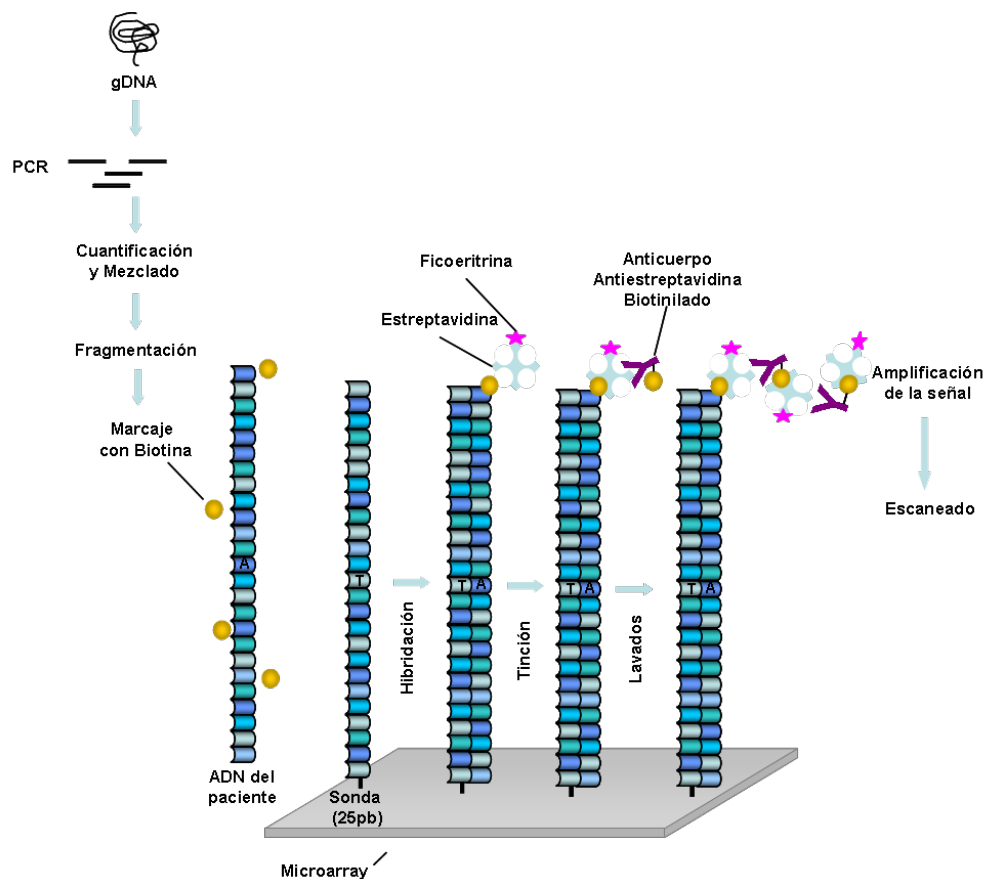


Figura 3.5 – Esquema del protocolo de resecuenciación.

La estreptavidina marcada con ficoeritrina se une a la biotina y el anticuerpo antiestreptavidina lo hace a la estreptavidina. Al estar el anticuerpo biotinilado, nuevos ciclos de lavado consiguen la amplificación de la señal.

Como resultado de la lectura, se obtuvo un archivo de imagen que debía ser interpretado por el software del sistema para obtener información sobre la secuencia de cada una de las sondas. El programa GSEQ® v4.0 se encarga de este proceso; los datos obtenidos se procesaron de nuevo utilizando un algoritmo, que procesa el alineamiento de la secuencia de los pacientes con una secuencia de referencia, además permite la detección rápida de variantes tanto en homocigosis como en heterocigosis.

3.2.4.3 Ensayo de validación de la micromatriz mediante controles positivos de mutaciones

Con el fin de comprobar la eficacia del método para detectar distintos tipos de mutaciones, se incluyeron en el estudio 4 controles positivos con mutaciones previamente descritas por nuestro grupo de investigación. Entre las variantes testadas se incluyeron tres mutaciones puntuales y una inserción de 2pb (Tabla 3.30). Estas muestras fueron procesadas de la misma manera que los sujetos de estudio sin mutaciones conocidas asociadas.

Tabla 3.30 – Controles positivos de mutaciones.

Familia	Gen	Cambio nucleotídico/ Cambio proteico	Genotipo	Tipo Mutación de
RP 21	<i>TULP1</i>	c.823-4A>G -	Heterocigoto	Defecto de <i>splicing</i>
RP 242	<i>TULP1</i>	c.430A>G p.K96E	Heterocigoto	Missense
RP 57	<i>TULP1</i>	c.1255C>G p.R419G	Heterocigoto	Missense
RP 60	<i>EYS</i>	c.78-79insGC p.Q27Rfs*16	Heterocigoto	Inserción

3.2.5 Secuenciación del exoma completo en familias RPar para la identificación de variantes asociadas a enfermedad

En este apartado, se describe la aplicación de las técnicas de secuenciación de nueva generación o *NGS* (del inglés “*Next generation sequencing*”) para identificar las mutaciones y genes causantes de la enfermedad en una selección de familias diagnosticadas clínicamente de RPar.

3.2.5.1 Selección de la cohorte de estudio

La selección de las familias se efectuó en base a una serie de criterios encaminados a priorizar el estudio de aquellas familias con mayor probabilidad de presentar mutaciones en genes nuevos de DHR.

Los criterios que se establecieron fueron los siguientes:

- 1 – Familias clínicamente diagnosticadas de RPar pero sin diagnóstico molecular asociado que han sido previamente analizadas mediante las micromatrices de genotipado y de resecuenciación con resultados negativos.
- 2 – Familias con muestras de ADN disponibles y de la calidad aceptable de al menos dos individuos afectos, uno sano y ambos progenitores.
- 3 – Familias no consanguíneas

Esta selección incluía a 8 familias. El protocolo de secuenciación masiva se llevó a cabo en 4 miembros de cada familia, siendo un total de 32 los individuos secuenciados.

3.2.5.2 Secuenciación del exoma completo

La preparación de librerías y la captura de exomas se llevó a cabo en el Genomic and Bioinformatic Platform of Andalusia (GBPA) siguiendo un protocolo basado en el protocolo del Baylor College of Medicine version 2.1 con algunas modificaciones. Se parte de 5 µg de ADN genómico que es sometido a un proceso de fragmentación, posteriormente sus extremos son reparados y ligados con adaptadores específicos. La distribución de tamaños de los fragmentos es verificada mediante el uso de un Bioanalyzer (Agilent), deben estar comprendidos entre 160 pb a 180 pb después de la fragmentación y 200 pb a 250 pb después de la ligación a los adaptadores. La librería se amplificó mediante LM-PCR (*linker mediated-PCR*) pre-captura usando el sistema FastStart High Fidelity PCR (Roche). Una vez purificado, 2 µg del producto de la LM-PCR fue hibridado con las sondas de NimbleGen SeqCap EZ Exome libraries V3. Tras los lavados, se llevó a cabo la amplificación mediante la LM-PCR post-captura usando el sistema FastStart High Fidelity PCR (Roche). El enriquecimiento de la captura fue cuantificado mediante qPCR siguiendo el protocolo de NimbleGen. La concentración del ADN capturado fue medida mediante Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent (Invitrogen) y el ADN se sometió a protocolos de preparación estándar para su secuenciación en la plataforma SOLiD 5500xl tal y como recomienda el fabricante. La PCR de emulsión se llevó a cabo en escala E80 (cerca de 1×10^9 moléculas molde) usando una concentración de 0,616 pM de ADN enriquecido capturado. Tras el enriquecimiento, cerca de 276 millones de moléculas molde fueron secuenciadas por cada fila en un soporte de 6-filas de SOLiD 5500xl.

3.2.5.3 Análisis de las variantes

Las lecturas obtenidas mediante el protocolo anterior fueron alineadas y enfrentadas contra la secuencia del genoma humano de referencia (hg19) usando el programa BFAST (Blat-like Fast Accurate Search Tool). Las lecturas correctamente mapeadas fueron filtradas con la herramienta SAMtools package, la cual fue usada también para ordenar y procesar los ficheros SAM. Para la predicción de las variantes (nombramiento de variantes), únicamente fueron usadas las lecturas que mapearon en posiciones únicas del genoma de referencia. La identificación de variantes se llevó a cabo con el software GATK (Genome Analysis Toolkit) teniendo en cuenta los SNPs obtenidos de distintas bases de datos: NCBI, dbSNP y el proyecto de 1000 Genomas. El análisis secundario se realizó mediante una herramienta personalizadas que usa ANNOVAR (<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>) (Wang K, Li M, Nucleic Acids Research, 2010), SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg>) y PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) para la anotación de las variantes. Las variantes anotadas no sinónimas encontradas en los individuos afectados fueron comparadas con las variantes presentes en sus familiares no afectados. Finalmente, el resto de variantes fueron comparadas con variantes obtenidas de un grupo de controles sanos procedentes de la misma población local que la familia en estudio. Las variantes presentes en los individuos afectados, pero no en los individuos sanos ni en población control fueron seleccionadas y ordenadas en base al análisis del interactoma para generar un listado de genes candidatos.

La nomenclatura correcta de las mutaciones ha sido comprobada mediante la herramienta Mutalyzer [Lindahl y cols., 1977].

3.2.6 Evaluación de la 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, por secuenciación directa del amplicon.
- Frecuencia del cambio en población control (200 individuos).
- Análisis *in silico* del cambio detectado mediante el empleo de diversas herramientas bioinformáticas. En este punto, podemos distinguir entre cambios que afectan a secuencias codificantes y cambios que afectan a secuencias no codificantes.

3.2.6.1 Evaluación de cambios en secuencias codificantes

Evaluación patogénica del cambio – Existen diversas herramientas on-line como PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) [Adzhubei y cols., 2010],

SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) (<http://sift.jcvi.org/>) [Kumar y cols., 2009], Conseq (<http://conseq.bioinfo.tau.ac.il>) o Disopred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/disopred/disopred.html>) nos permiten predecir el impacto producido por una sustitución aminoacídica en la estructura y función de una proteína y por tanto, su patogenicidad.

Este análisis se realiza en base a varios criterios como el grado de conservación de la posición afectada, el efecto de los cambios sobre el grado de desorden y la tendencia a la agregación de la proteína y la influencia de estas variantes sobre la estabilidad de la proteína. Además, si el aminoácido implicado es una cisteína, la herramienta Dianna v.1.1 (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>) [Ferre y Clote, 2005] permite predecir posibles alteraciones en la formación de puentes disulfuro que puedan afectar a la estructura terciaria de la proteína.

Pérdida/Ganancia de lugares de fosforilación – La fosforilación es uno de los fenómenos principales en los mecanismos de regulación de las proteínas. Mediante el uso de herramientas como NetPhos2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos) o Disorder-Enhanced-Phosphorylation-Sites-Predictor (www.core.ist.temple.edu/pred.html), es posible predecir aquellos aminoácidos dentro de una proteína susceptibles de ser fosforilados. De este modo, al estudiar un cambio a nivel proteico es posible predecir pérdidas o ganancias de estos lugares de fosforilación, y así evaluar la posible patogenicidad provocada por un cambio a este nivel.

3.2.6.2 Evaluación de cambios en secuencias no codificantes

3.2.6.2.1 Variación de sitios de *splicing*

El *splicing* es un proceso post-transcripcional de corte y empalme del ARNm. Las ganancias o pérdidas de sitios donadores y aceptores de *splicing* puede llevar a un mal procesado del mensajero, pudiéndose originar la aparición prematura de un codón de stop, la pérdida de un exón o la inclusión de un intrón. Se emplearon herramientas bioinformáticas como ESEfinder (rulai.cshl.edu/tools/ESE2/) [Cutler, 2001, Cartegni y cols., 2003, Smith y cols., 2006], RESCUE-ESE (genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese) o NNSPLICE v.0.9 (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) [Reese y cols., 1997], NetGene2 (www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2) [Hebsgaard y cols., 1996, Kalled y cols., 2001] para estimar la naturaleza patogénica de las variantes intrónicas identificadas.

Comparando los resultados del transcrito normal, con aquellos obtenidos tras la inclusión del cambio en estudio, nos permite ver si este afecta con la creación o destrucción un sitio de *splicing*.

3.2.6.2.2 Variación de sitios de unión a factores de transcripción

Los factores de transcripción son proteínas que participan en la regulación de la transcripción del ADN. Estos se unen a secuencias concretas, a otros factores o a la ARN polimerasa directamente. La pérdida de sitios de unión a factores de transcripción puede llevar a una mala regulación de la transcripción. Herramientas en red como TESS (Transcription Element Search Software) (www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess) o ACESCAN2 (genes.mit.edu/acescan2/index.html) son capaces de predecir estos lugares importantes para la regulación de la transcripción. De la misma manera que en el estudio de pérdida o ganancia de sitios de *splicing*, comparando los resultados del transcrito normal con aquellos obtenidos tras la inclusión del cambio en estudio, nos permite ver si este afecta con la creación o eliminación de sitios de unión a factores de transcripción.

3.2.7 Secuenciación directa de los nuevos genes candidatos identificados en nuestra cohorte de pacientes afectos de distintas DHR

Una vez identificada una variante probablemente patogénica en un gen nuevo de DHR, se procedió a la secuenciación directa de los exones de interés en nuestra cohorte de pacientes con causa genética desconocida.

Se diseñaron cebadores para el exón 1 del gen candidato *PCDHA1* (Tabla 3.31) que fue secuenciado en una cohorte de pacientes afectos de distintas DHR. Dicha cohorte estaba constituida por 95 pacientes sin causa genética identificada, de los cuales 74 habían recibido un diagnóstico clínico de RPar, 8 de STGD, 6 de ACL, 3 de DCB, 3 de RPad y 1 de Fundus Flavimaculatus.

Tabla 3.31 – Cebadores empleados en la secuenciación directa del exón 1 (región variable) del gen *PCDHA1*.

Gen <i>PCDHA1</i>				
Exón/s	Secuencia Forward (5'→3')	Secuencia Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1A	GTCACCGCCTGAGAGAAGAC	TGCATCAGCAGCTCCTTCTA	595	59
1B	TTCAGGGGCGAGAAACAAAT	ACCTTCGTGATCAGATCAGAGG	420	59
1C	CCGTCCTCGACGTTAATGAT	CACCAGCTCATAGACCGACA	581	59
1D	GGCAGGTGACTTGCTCCTTA	ACCAATAGTGCCACCCACTC	578	59
1E	CTGGACGAGAACGACAACG	CTCTGCTGTGAGTTCGACCA	596	59
1F	GTGCTCACACTGCTGCTGTA	CGTAAAGGGAAGGCAGATGA	678	59

Th: Temperatura de hibridación.

3.2.8 PCR cuantitativa

Para conocer la expresión en retina de los genes candidatos nuevos identificados, se diseñó un experimento basado en PCR cuantitativa en tiempo real. Dicha reacción se llevó a cabo en un termociclador 7500 Fast-Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Se utilizaron como molde $\approx 2,5$ ng de los ADNc comerciales de retina y cerebro, realizándose tres réplicas de cada una de ellos en placas de 96 pocillos. Para determinar los niveles de mensajero de los genes candidatos humanos se usaron oligonucleótidos y una sonda fluorescente de ADN, ambos específicos para dichos genes (Taqman® Gene Expresión Assays).

Las condiciones de reacción de PCR fueron: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos y posteriormente 40 ciclos de incubación a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Para normalizar las variaciones en la cantidad de ADNc de las distintas muestras se determinó la expresión de *GAPDH* humana (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), que es un gen de expresión constitutiva en la célula (genes denominados “housekeeping”).

Los resultados de PCR en tiempo real se analizaron mediante el programa 7500 Fast-Real-Time PCR System (Applied Biosystems). El sistema de PCR en tiempo real se basa en la detección y cuantificación de marcadores fluorescentes a lo largo de la reacción de PCR. Esto permite conocer la cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción, donde un aumento significativo del producto de PCR se correlaciona con la cantidad inicial de ADN o ADNc de estudio. Como resultado se obtienen unos valores denominados “Ct” que equivalen al ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de PCR.

En este trabajo se realizó una cuantificación relativa del ARNm correspondiente a los genes de estudio mediante el método denominado “ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ”. Este método consiste en la comparación de los Cts del gen de estudio y del gen de referencia o housekeeping (ΔCt) en cada muestra, y posteriormente se compararon los ΔCt s de la muestra experimental con respecto a la muestra control ($\Delta\Delta Ct$). El valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ expresa la proporción de cambio en la expresión del gen de estudio obtenida en la muestra experimental con respecto a la muestra control (Ecuación 1). Para comparar la expresión de varios genes diferentes en la misma muestra mediante este método, fue necesario que la eficiencia de la reacción de PCR fuera similar entre ellos.

Ecuación 1 – Método del “ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ”

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen de estudio} - Ct \text{ gen de referencia}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ control}$$

$$\text{Veces de cambio en la expresión del gen de estudio} = 2^{-(\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ control})}$$

4 RESULTADOS

La descripción de los resultados obtenidos se ha dividido en dos bloques. El primero y más extenso, describe el rastreo mutacional de los pacientes mediante el empleo de diversas técnicas como son las micromatrices de genotipado, las micromatrices de diseño propio, el *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) y la secuenciación de exoma completo. El segundo bloque de resultados describe los estudios de expresión del gen candidato nuevo identificado.

4.1 RASTREO MUTACIONAL

4.1.1 Micromatriz de genotipado específica para RPar

En este estudio se han identificado 56 variantes conocidas en 46 familias de las 104 analizadas.

Todas las mutaciones detectadas con este método se confirmaron correctamente mediante secuenciación automática salvo las mutaciones en *USH2A*, c.907C>A (Familia RP 437) y c.6240G>T (Familia RP 353) que fueron nombradas como homocigotas cuando en realidad eran heterocigotas.

De las 46 familias en las que se encontraron cambios (Figura 4.1), 36 portaban variantes patogénicas. De éstas, 7 presentaron un cambio en homocigosis, 5 presentaron dos variantes heterocigotas en alelos distintos de un mismo gen (heterocigosis compuesta), 3 presentaron dos cambios heterocigotos en genes distintos y 21 eran portadoras de un único cambio en heterocigosis. Las 10 familias restantes (de las 46 en las que se encontraron cambios) tenían variantes que fueron inicialmente clasificadas como patogénicas pero estudios posteriores descartaron su implicación con la enfermedad.

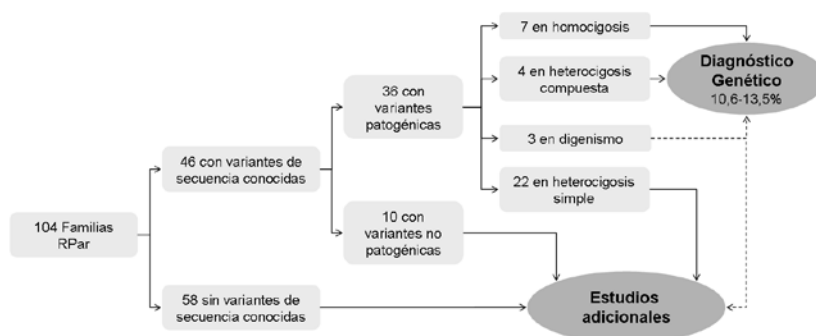


Figura 4.1 – Resultados obtenidos tras el análisis con la micromatriz de genotipado.

Por tanto esta técnica ha permitido caracterizar genéticamente al 10,6%-13,5% de las familias analizadas.

4.1.1.1 Familias con variantes en homocigosis

En 7 de las 104 (6,7%) familias RPar estudiadas, 5 de las cuales eran consanguíneas, se encontraron mutaciones en estado de homocigosis (Tabla 4.1). La segregación familiar de las variantes se llevó a cabo por secuenciación automática de los miembros disponibles (Figura 4.2).

Tabla 4.1 – Mutaciones homocigotas identificadas mediante la micromatriz de genotipado.

Familia	Gen	Cambio Nucleotídico	Alteración proteica	Estado	Referencia
198	<i>CNGA1</i>	c.301C>T	p.R101*	Homocigosis	[Paloma y cols., 2002]
VRP4	<i>RPE65</i>	c.95-2A>T	Defecto en <i>splicing</i>	Homocigosis	[Hanein y cols., 2004]
348	<i>RDH12</i>	c.295C>A	p.L99I	Homocigosis	[Perrault y cols., 2004]
92				Homocigosis	
99	<i>RDH12</i>	c.806_810del5	p.A269Gfs*2	Homocigosis	[Janecke y cols., 2004]
66	<i>RDH12</i>	c.883C>T	p.R295*	Homocigosis	[Thompson y cols., 2005]
291	<i>NR2E3</i>	c.932G>A	p.R311Q	Homocigosis	[Gerber y cols., 2000]
	<i>RDH12</i>	c.701G>A	p.R234H	Heterocigosis	[Thompson y cols., 2005]

Dos de las familias (RP 348 y RP 92) presentaban la mutación c.295C>A; p.L99I en el gen *RDH12*. El análisis de la segregación familiar de dicha mutación se muestra en la la figura 4.2 y muestra cómo la mutación cosegrega con la patología en la familia RP 348. Este estudio no se pudo llevar a cabo en la familia RP 92 ya que no se disponía de muestra de otros miembros de la familia.

Entre las familias con cambios en homocigosis, cabe destacar la familia RP 291. Dicha familia presenta además del cambio homocigoto en *NR2E3*, un cambio heterocigoto en el gen *RDH12* (c.701G>A; p.R234H).

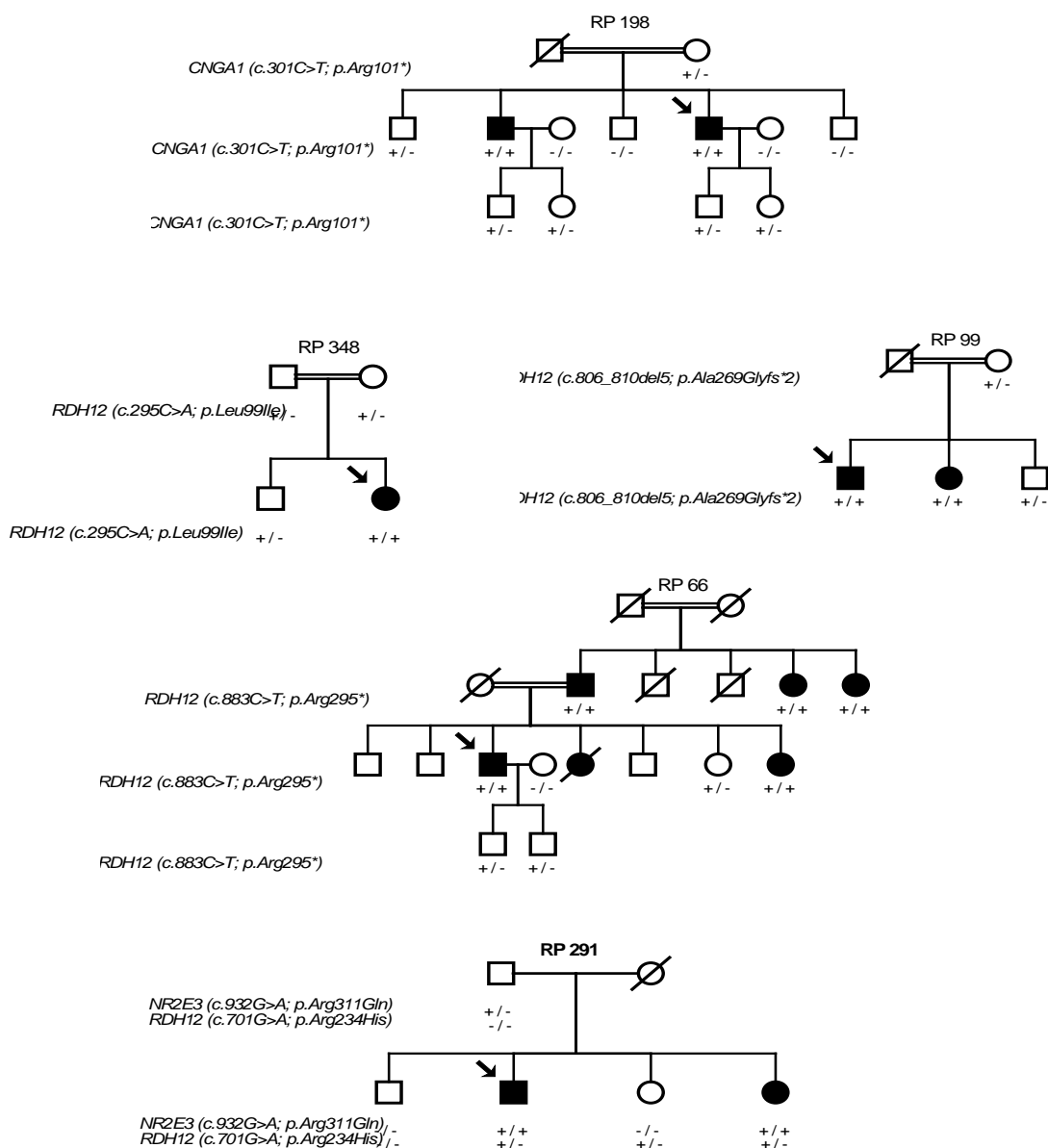


Figura 4.2 – Segregación familiar de los cambios homocigotos hallados mediante la micromatriz de genotipado.

Debajo de cada individuo se muestra el genotipo de cada una de las variantes: - / - para individuos con genotipo silvestre o *wildtype*, +/- para individuos con genotipo heterocigoto para la variante en cuestión y + / + para individuos con genotipo homocigoto para la variante.

4.1.1.2 Familias con variantes en heterocigosis compuesta

En 4 de las 104 (3,8%) familias RPar analizadas se encontraron dos cambios en heterocigosis en el mismo gen (*USH2A*). La segregación familiar en los miembros disponibles de las familias RP 351 y RP 112 (Figura 4.3) mostró como ambas variantes

cosegregaban con la enfermedad. En las otras dos familias (RP 159 y RP 3) no se pudo llevar a cabo el estudio de segregación por no disponer de muestras de familiares.

En todas las familias se halló la mutación c.2276G>T; p.C759F en el exón 13 de *USH2A*. Esta mutación da lugar al cambio de una cisteína por una fenilalanina en la posición 759 de la proteína usherina. El aminoácido implicado está en el quinto dominio tipo laminina-factor de crecimiento epidérmico y participa muy posiblemente en la formación de un puente disulfuro con la cisteína de la posición 747.

Tabla 4.2 – Variantes en heterocigosis compuesta identificadas mediante la micromatriz de genotipado.

Familia	Gen	Cambio Nucleotídico	Alteración proteica	Referencia
159	<i>USH2A</i>	c.1829A>C	p.H610P	[Bernal y cols., 2003]
	<i>USH2A</i>	c.2276G>T	p.C759F	[Rivolta y cols., 2000]
351	<i>USH2A</i>	c.2276G>T	p.C759F	[Rivolta y cols., 2000]
	<i>USH2A</i>	c.2299delG	p.E767Sfs*21	[Dreyer y cols., 2001]
3	<i>USH2A</i>	c.2276G>T	p.C759F	[Rivolta y cols., 2000]
	<i>USH2A</i>	c.10712C>T	p.T3571M	[Jaijo y cols., 2010]
112	<i>USH2A</i>	c.1841-2A>G	Defecto en <i>splicing</i> (Salto Exón 11)	[Jaijo y cols., 2010]
	<i>USH2A</i>	c.2276G>T	p.C759F	[Rivolta y cols., 2000]

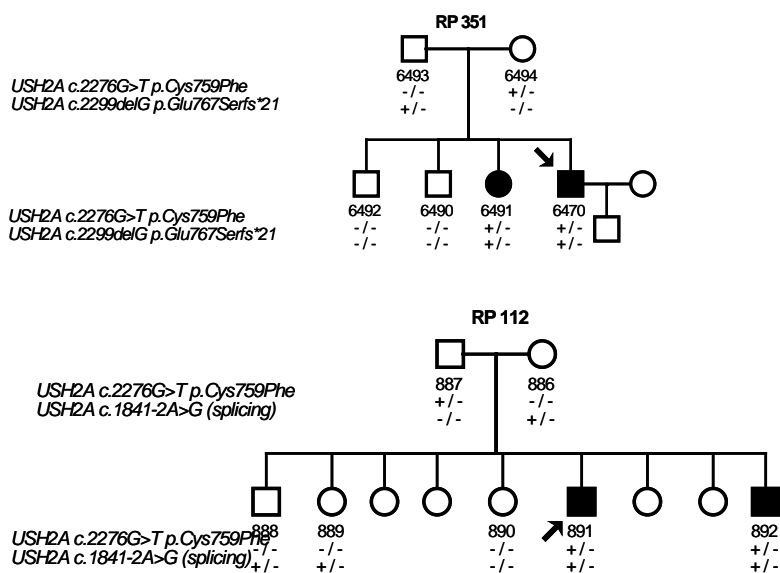


Figura 4.3 – Segregación familiar de las variantes en heterocigosis compuesta identificadas mediante la micromatriz de genotipado.

4.1.1.3 Familias con dos variantes en heterocigosis en genes distintos

En 3 de las 104 (2,9%) familias estudiadas se detectaron dos mutaciones en genes distintos mediante la micromatriz de genotipado (Tabla 4.3). Los estudios de segregación familiar fueron llevados a cabo en los miembros disponibles de las familias RP 435 y RP 180 (Figura 4.4). En la familia RP 353 no se pudo llevar a cabo la segregación familiar por ausencia de familiares disponibles. Estos resultados, confirmaron únicamente la cosegregación de ambos cambios con la enfermedad en la familia RP 180, mientras que en la familia RP 435, sólo segregaba el cambio de *USH2A* (c.2276G>T; p.C759F).

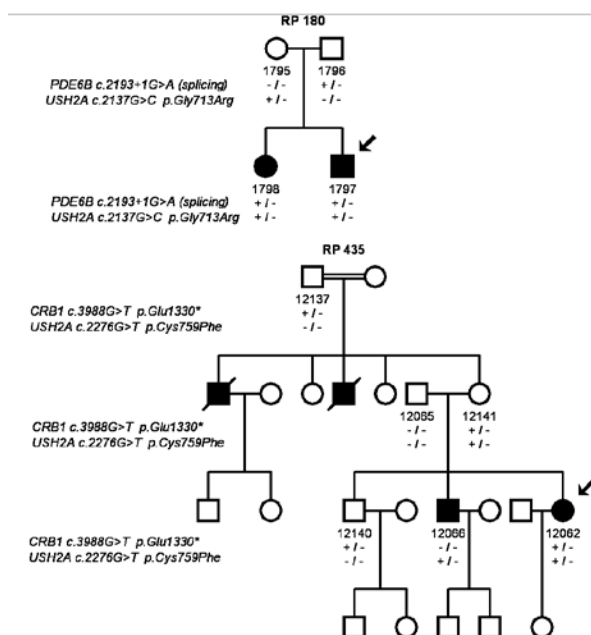


Figura 4.4 – Segregación familiar de los cambios en posible digenismo identificados mediante la micromatriz de genotipado.

Tabla 4.3 – Familias RPar con dos mutaciones heterocigotas en genes distintos identificadas mediante la micromatriz de genotipado (Digenismo).

Familia	Gen	Cambio Nucleotídico	Alteración proteica	Referencia
435	<i>CRB1</i>	c.3988G>T	p.E1330*	[Vallespin y cols., 2006]
	<i>USH2A</i>	c.2276G>T	p.C759F	[Rivolta y cols., 2000]
353	<i>CRB1</i>	c.2290C>T	p.R764C	[Den Hollander y cols., 2004]
	<i>USH2A</i>	c.6240G>T	p.K2080N	[Booij y cols., 2011]
180	<i>PDE6B</i>	c.2193+1G>A	Defecto en <i>splicing</i>	[Mclaughlin y cols., 1995]
	<i>USH2A</i>	c.2137G>C	p.G713R	[Dreyer y cols., 2000]

4.1.1.4 Familias con una variante en heterocigosis

Veintidós de las 104 (21,15%) familias estudiadas mediante la micromatriz de genotipado eran portadoras de una única variante patogénica en heterocigosis (Tabla 4.4).

Tabla 4.4 – Familias con una única variante heterocigota posiblemente patogénica identificada mediante la micromatriz de genotipado.

Familia	Gen	Cambio Nucleotídico	Alteración proteica	Referencia
65	<i>CRB1</i>	c.2843G>A	p.C948Y	[Den Hollander y cols., 2004]
183 299	<i>PDE6B</i>	c.655T>C	p.Y219H	[Mclaughlin y cols., 1995]
277	<i>RDH12</i>	c.295C>A	p.L99I	[Perrault y cols., 2004]
VRP6	<i>RPE65</i>	c.643+1G>C	Defecto en <i>splicing</i>	
219	<i>SAG</i>	c.577C>T	p.R193*	[Maw y cols., 1998]
437	<i>USH2A</i>	c.907C>A	p.R303S	[Ahmed y cols., 2003]
247	<i>USH2A</i>	c.1000C>T	p.R334W	[Dreyer y cols., 2000]
287 47	<i>USH2A</i>	c.2137G>C	p.G713R	[Dreyer y cols., 2000]
23 185 355 378	<i>USH2A</i>	c.2276G>T	p.C759F	[Rivolta y cols., 2000]
149 156 408	<i>USH2A</i>	c.2299delG	p.E767Sfs*21	[Dreyer y cols., 2001]
189	<i>USH2A</i>	c.6240G>T	p.K2080N	[Booij y cols., 2011]
120	<i>USH2A</i>	c.6587G>C	p.S2196T	[Jaijo y cols., 2010]
304	<i>USH2A</i>	c.6746C>A	p.A2249D	[Aller y cols., 2006]
56	<i>USH2A</i>	c.7718G>A	p.R2573H	[Mcgee y cols., 2010]
356	<i>USH2A</i>	c.10273_10274dup	p. C3425Ffs*4	[Jaijo y cols., 2010]

Por otra parte, se identificaron 10 familias (9,6%) con 4 variantes heterocigotas que fueron inicialmente clasificadas como patogénicas pero la falta de cosegregación familiar y la presencia en población control, indicó que se trataba de cambios polimórficos posiblemente no patogénicos (Tabla 4.5).

Tabla 4.5 – Familias con variantes posiblemente no patogénicas identificadas mediante la micromatriz de genotipado.

Familia	Gen	Cambio Nucleotídico	Alteración proteica	Referencia
108	<i>CRB1</i>	c.614T>C	p.I205T	[Bernal y cols., 2003] (rs62645749)
237 430 60	<i>RGR</i>	c.744+5 A>G	-	[Neveling y cols., 2012a]
193 259 305 364 412	<i>USH2A</i>	c.1434G>C	p.E478D	[Garcia-Garcia y cols., 2011] (rs35730265)
77	<i>USH2A</i>	c.4560C>T	p.I1520I	[Le Quesne Stabej y cols., 2012]

4.1.2 Micromatriz de resecuenciación de diseño personalizado.

Todos los datos de las matrices presentes en el presente trabajo han sido depositados en la base de datos EBI Array Express database (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) bajo el número de acceso E-MTAB-786 cumpliendo con las recomendaciones de la sociedad de datos derivados de la genómica funcional, FGED (<http://www.fged.org/>).

4.1.2.1 Ensayo de validación de la micromatriz mediante controles positivos de mutaciones.

Con el fin de comprobar la eficacia del método para detectar distintos tipos de mutaciones, fueron incluidos en el estudio 4 controles positivos con mutaciones previamente descritas por nuestro grupo de investigación. Entre las variantes testadas se incluyeron tres mutaciones puntuales y una inserción de 2pb. De los cuatro controles positivos fueron correctamente detectados tres de ellos, correspondientes a las tres sustituciones nucleotídicas (Tabla 4.6). El cambio que no pudo ser detectado corresponde a una inserción de dos pares de bases en el exón 4 del gen *EYS*, c.78-79insGC descrito en la familia RP 60 [Barragan y cols., 2010].

Las figuras 4.5 y 4.6 muestran los resultados tras el procesamiento de los datos con el software GSEQ (v.4.1) de dos de los controles positivos, el de la familia RP 21 y el de la familia RP 60. El primero presentaba una sustitución nucleotídica que fue correctamente detectada en estado de heterocigosis. El segundo corresponde a la familia RP 60 cuya inserción de dos pares de bases en heterocigosis no pudo ser correctamente detectada.

Tabla 4.6 – Resultados del ensayo de validación.

Familia	Gen	Cambio nucleotídico/ Cambio proteico	Genotipo	Tipo de mutación	¿Detectado por la micromatriz?
242	<i>TULP1</i>	c.430A>G p.K96E	Heterocigosis	Sustitución	Sí
21	<i>TULP1</i>	c.823-4A>G -	Heterocigosis	Sustitución	Sí
57	<i>TULP1</i>	c.1255C>G p.R419G	Heterocigosis	Sustitución	Sí
60	<i>EYS</i>	c.78-79insGC p.Q27Rfs*16	Heterocigosis	Inserción	No

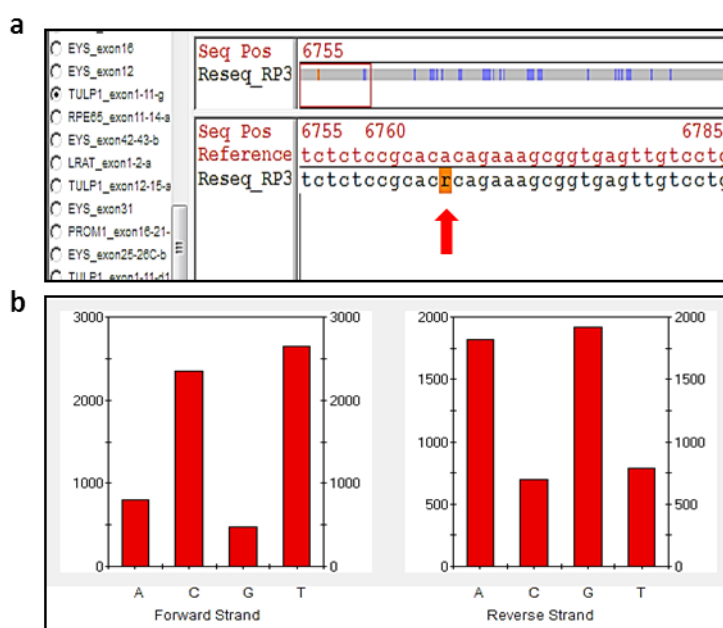


Figura 4.5 – Análisis del exón 7 del gen *TULP1* en el control positivo de la familia RP 21 usando el software GSEQ (v.4.1).

a| Alineamiento de la secuencia del paciente (en negro) con la secuencia de referencia (en rojo). La flecha indica la posición donde se encuentra la mutación heterocigota c.823-4A>G. Según el código IUPAC, R se corresponde con una transición de A>G (purinas), el sombreado naranja indica que está en heterocigosis b| Histograma de la intensidad de hibridación en la posición implicada en la sustitución. En el eje “x” se representa cada una de las posibles bases donde se puede unir el ADN de nuestro paciente para permitir la detección de sustituciones nucleotídicas. En el eje “y” se representa la intensidad de esa unión. A la izquierda se representa la hibridación de la cadena sentido o *forward* y a la derecha la de la cadena antisentido o *reverse* sobre las que hibridarán cada uno de los alelos de nuestro paciente. En la figura se observa cómo hay hibridación tanto en la base C/G como en la T/A indicando que hay un cambio heterocigoto en esa posición.

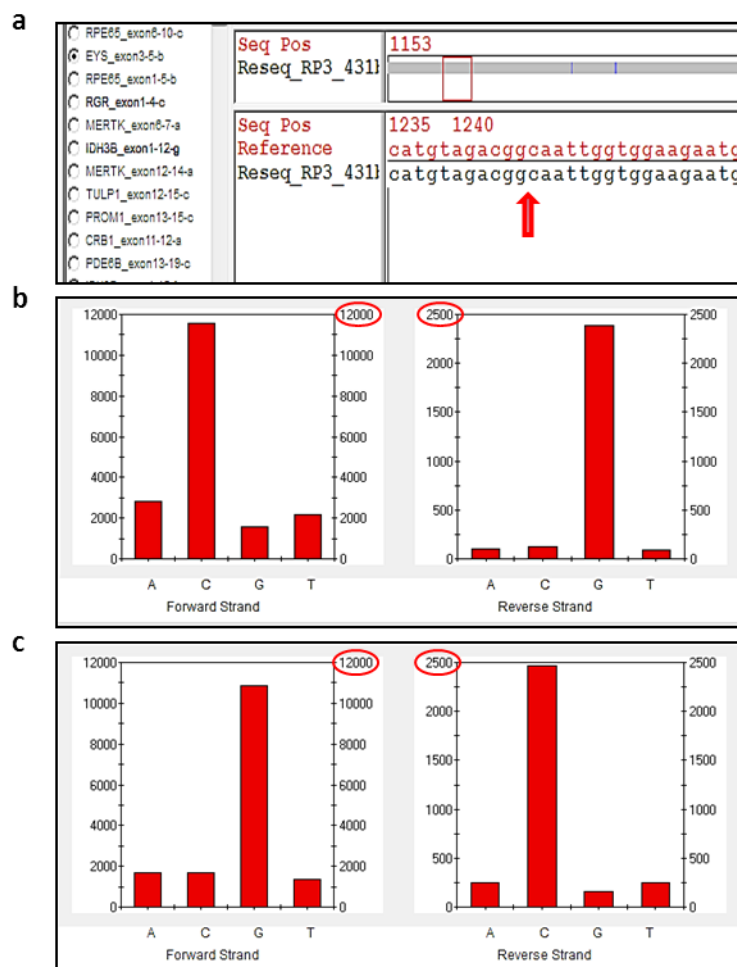


Figura 4.6 – Análisis del exón 4 del gen *EYS* en control positivo de la familia RP60 usando el software GSEQ (v.4.1).

a| Alineamiento de la secuencia del paciente (en negro) con la secuencia de referencia (en rojo). La flecha indica la posición donde debería apreciarse la mutación heterocigota c.78-79insGC. b| Histograma de la intensidad de hibridación de la 1ª base de la inserción. En la figura se observa una caída en la intensidad de la señal de la cadena reverse (rodeado en rojo) que podría estar denotando una falta de hibridación de esa cadena. c| Histograma de la intensidad de hibridación de la 2ª base de la inserción.

4.1.2.2 Variantes identificadas con la micromatriz de resecuenciación en nuestra cohorte de pacientes RPar.

Mediante la micromatriz de diseño personalizado fueron identificados un total de 42 variantes de secuencia, de las cuales 13 eran potencialmente patogénicas (Tabla 4.7) y 29 podrían considerarse como polimorfismos no descritos (Tabla 4.8).

Todas las variantes fueron verificadas mediante secuenciación directa, del mismo modo se llevó a cabo la segregación familiar de los miembros disponibles (Figura 4.8).

Los 13 cambios de secuencia potencialmente patogénicos identificados están presentes en 14 de los 102 pacientes incluidos en el estudio (14%). De ellos, 5 pacientes son homocigotos para la mutación mientras que los 9 restantes son heterocigotos. De las 13 variantes, 5 eran mutaciones previamente descritas y asociadas a la RPar y 8 eran mutaciones nuevas. Para valorar la posible patogenicidad de las 8 nuevas mutaciones, se estudiaron dichas variantes en población control, no detectándose ninguno de los 8 en los 200 cromosomas analizados. Además se llevaron a cabo estudios *in silico* que predicen el posible impacto de las nuevas variantes sobre la funcionalidad de la proteína (véase apartado 4.1.2.3 pág.102).

Entre las cinco mutaciones publicadas se encuentran: una mutación sin sentido en la que se genera un codón de parada prematuro (p.R257* en el gen *CERKL* (Figura 4.7) que se ha detectado en dos familias no relacionadas, tres mutaciones con pérdida de sentido en las que se produce un cambio de un aminoácido por otro (p.C948Y en el gen *CRB1*, p.S297R y p.T342M en el gen *RHO*) y una sustitución nucleotídica de una base consenso relevante para la maduración del ARN mensajero (*splicing*) que afecta concretamente al sitio aceptor: (c.1297-2A>G en *MERTK*).

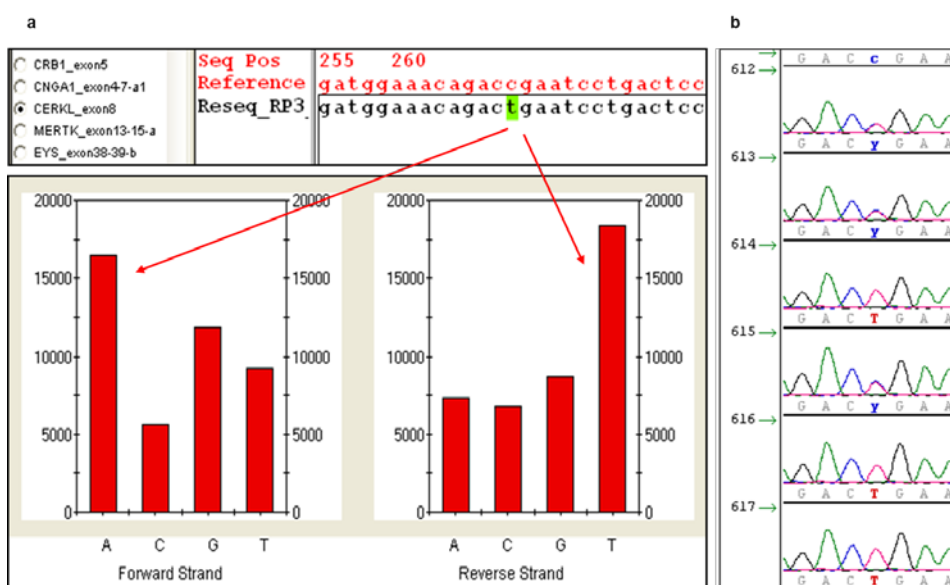


Figura 4.7 – Cambio detectado en la familia RP 76.

a | Detección de la mutación (c.769C>T; p.R257*) en el exón 8 de *CERKL* usando el programa de análisis GSEQ. La secuencia de referencia porta una C homocigota en esa posición. El histograma de intensidad inferior muestra cómo la muestra mutante con una base T homocigota, se une más intensamente a la sonda con una A en la cadena forward y una T en la cadena reverse. **b** | El electroferograma de los miembros de la familia RP76 confirma la cosegregación de la variante con la enfermedad.

Las 8 variantes nuevas incluyen: seis cambios con pérdida de sentido y dos cambios que afectan a sitios relevantes para el *splicing* del ARNm.

Tabla 4.7 – Variantes posiblemente patogénicas detectadas mediante la micromatriz de diseño personalizado.

Familia	Gen	Cambio nucleotídico	Cambio proteico	Referencia/ Nueva	Estado
76	CERKL	c.769C>T	p.R257*	[Avila-Fernandez y cols., 2008]	Homocigosis
206					Homocigosis
29	CRB1	c.2843G>A	p.C948Y	[Den Hollander y cols., 1999]	Homocigosis
322	RHO	c.1025C>T	p.T342M	[Stone y cols., 1993]	Homocigosis
96	MERTK	c.1297-2A>G	-	[Gal y cols., 2000]	Homocigosis
95	CNGA1	c.1151T>C	p.I384T	Nueva	Heterocigosis
234	EYS	c.3695T>C	p.I1232T	Nueva	Heterocigosis
109	EYS	c.5928-2A>G	-	Nueva	Heterocigosis
202	EYS	c.8003G>T	p.C2668F	Nueva	Heterocigosis
242	RHO	c.891C>T	p.S297R	[Souied y cols., 1994]	Heterocigosis
353	PROM1	c.1562C>A	p.T520K	Nueva	Heterocigosis
108	RLBP1	c.875A>T	p.T292M	Nueva	Heterocigosis
193	RPE65	c.726-3C>A	-	Nueva	Heterocigosis
333	TULP1	c.539G>A	p.R180H	Nueva	Heterocigosis

Los 29 cambios restantes pueden ser considerados como polimorfismos no descritos e incluyen 9 sustituciones aminoacídicas, 1 variante en la región 5'UTR, 6 cambios sinónimos y 13 variantes intrónicas que no tienen efectos deletéreos predichos sobre los mecanismos de *splicing* del ARNm (Tabla 4.8). Entre las sustituciones aminoacídicas, la del p.G618S en *EYS* fue inicialmente descrita como una variante asociada a la RPar [Audo y cols., 2010], pero los resultados de los estudios de segregación en nuestra familia española descartaron su papel patogénico.

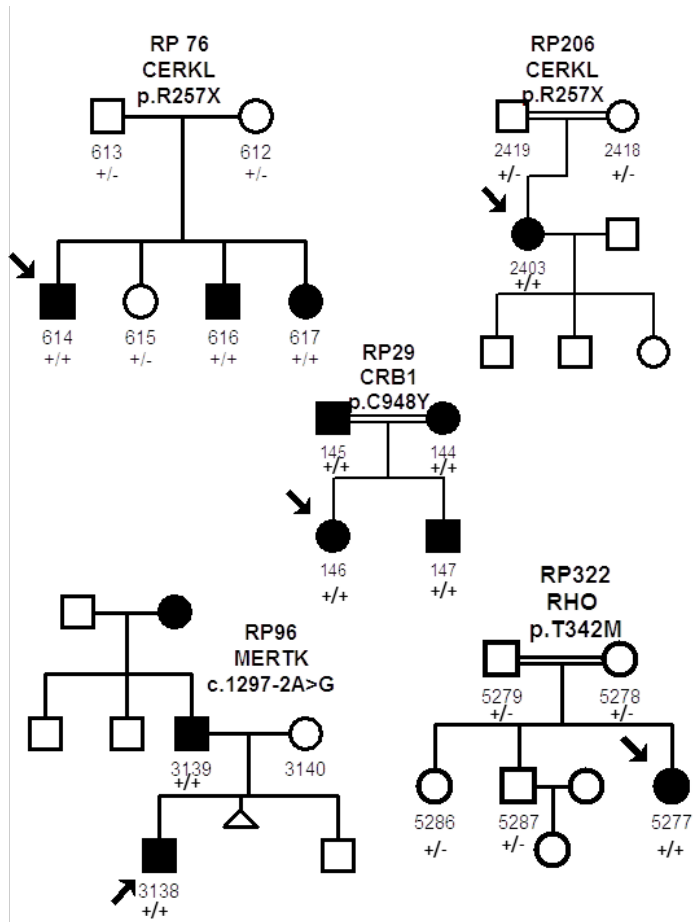


Figura 4.8 – Segregación familiar de los cambios homocigotos encontrados mediante la micromatriz de resecuenciación.

Tabla 4.8 – Variantes probablemente no patogénicas detectadas con la micromatriz de resecuenciación.

Gen	Cambio nucleotídico	Cambio proteico	Nº de pacientes con la mutación	Frecuencia en controles	Segregación familiar	Conclusiones
<i>CNGA1</i>	c.372C>T	p.N124N	3	N/D	No segrega	Sinónimo
<i>CNGA1</i>	c.495T>C	p.Y165Y	1	N/D	N/D	Sinónimo
<i>CNGA1</i>	c.1834A>C	p.N612H	1	N/D	No segrega	Polimorfismo
<i>CRB1</i>	c.135C>G	p.C45W	1	N/D	No segrega	Polimorfismo
<i>CRB1</i>	c.3886A>C	p.K1296Q	12	N/D	No segrega	Polimorfismo
<i>CRB1</i>	c.3960G>C	p.Q1320H	1	N/D	No segrega	Polimorfismo
<i>EYS</i>	c.-459C>T	-	1	20/200		5' UTR
<i>EYS</i>	c.1852G>A	p.G618S	1	N/D	No segrega	Polimorfismo
<i>EYS</i>	c.2024-14C>T	-	1	N/D	N/D	No patogénico
<i>EYS</i>	c.7228+7G>A	-	1	N/D	N/D	No patogénico
<i>EYS</i>	c.7608C>T	p.I2536I	1	N/D	N/D	Sinónimo
<i>MERTK</i>	c.482+698T>C	-	1	N/D	N/D	No patogénico
<i>MERTK</i>	c.482+921G>C	-	1	N/D	N/D	No patogénico
<i>MERTK</i>	c.710G>A	p.R237H	1	N/D	No segrega	Polimorfismo
<i>MERTK</i>	c.2349+15T>A	-	1	N/D	N/D	No patogénico
<i>MERTK</i>	c.2350-15T>C	-	1	N/D	N/D	Afecta muy poco al ensamblaje
<i>NR2E3</i>	c.197G>C	p.G66A	4	N/D	No segrega	Polimorfismo
<i>PDE6B</i>	c.615C>T	p.D205D	1	N/D	N/D	Sinónimo
<i>PROM1</i>	c.55T>G	p.S19A	2	2/200	No segrega	Polimorfismo
<i>PROM1</i>	c.1470C>T	p.I500I	1	N/D	N/D	Sinónimo
<i>PROM1</i>	c.1741-5C>T	-	3	N/D	N/D	No patogénico
<i>PROM1</i>	c.2050-15T>C	-	2	N/D	N/D	No patogénico
<i>PROM1</i>	c.2347-3T>C	-	3	N/D	N/D	No patogénico
<i>RHO</i>	c.444C>T	p.F148F	1	N/D	N/D	Sinónimo
<i>RHO</i>	c.502G>A	p.A168T	1	N/D	No segrega	Polimorfismo
<i>RGR</i>	c.756+5A>G	-	1	N/D	N/D	No patogénico
<i>RPE65</i>	c.1243+45T>G	-	1	N/D	N/D	No patogénico
<i>RPE65</i>	c.1339-48A>G	-	1	N/D	N/D	No patogénico
<i>TULP1</i>	c.1224+26C>T	-	1	N/D	N/D	No patogénico

4.1.2.3 Análisis *in silico* de las nuevas variantes encontradas mediante la micromatriz de resecuenciación.

Para valorar la posible patogenicidad de las 8 nuevas variantes detectadas, se realizaron los correspondientes estudios *in silico*, tanto para los cambios codificantes no sinónimos como para los no codificantes (Tabla 4.9).

La variante c.1151T>C; p.I384T fue identificada en heterocigosis en el exón 8 de *CNGA1* en el paciente índice de la familia RP 95. La mutación da lugar a la sustitución de una isoleucina por una treonina en la posición 384 de la proteína. Este residuo no se encuentra localizado en ningún dominio proteico identificado por la base de datos. Los análisis filogenéticos de conservación evolutiva efectuados mediante la comparación entre ortólogos de diferentes especies (Figura 4.9) revelaron que la posición está conservada entre aminoácidos con propiedades similares.

La variante c.3695T>C; p.I1232T fue identificada en heterocigosis en el exón 25 del gen *EYS* en el paciente índice de la familia RP 234. La mutación da lugar a la sustitución de una isoleucina por una treonina en la posición 1232 de la proteína SPAM. Este residuo se encuentra localizado en un dominio proteico tipo factor de crecimiento epidérmico (*EGF-like*). El alineamiento múltiple entre las secuencias de ortólogos muestra que el residuo se encuentra conservado.

La variante c.5928-2A>G fue identificada en heterocigosis en la secuencia intrónica flanqueante al exón 29 del gen *EYS* en la familia RP 109. La variante consiste en la transición de una adenina por una guanina en la secuencia consenso aceptora del intrón 28. Los estudios *in silico* predijeron que la maquinaria celular de *splicing* del ARNm no reconocerían esta secuencia como el sitio aceptor y por tanto, muy probablemente el exón 29 no formaría parte del ARNm maduro (Tabla 4.9). Esto conduciría a una pérdida en la pauta de lectura y a un codón de parada prematuro.

La mutación c.8003G>T; p.C2668F fue identificada en heterocigosis en el exón 41 de *EYS* en la familia RP 202. El análisis *in silico* realizado con los programas *Polyphen* y *SIFT* coinciden en predecir la patogenicidad de esta variante. El residuo de cisteína se encuentra dentro de un dominio laminina G altamente conservado evolutivamente. La predicción con la herramienta *Dianna* indica que la cisteína se encuentra muy probablemente formando un puente disulfuro. Su sustitución por otro aminoácido provocaría alteraciones en la estructura tridimensional de la proteína incompatibles con su correcto funcionamiento.

El cambio c.1562C>A ; p.T520K fue identificado en heterocigosis en el exón 13 de *PROM1* en la familia RP 353. Los análisis *in silico* predicen que este cambio podría ser tolerado por la proteína y no afecta a ningún dominio proteico identificado por las bases de datos.

La variante c.875A>T; p.T292M fue identificada en heterocigosis en el exón 7 de *RLBP1* en la familia RP 108. El análisis *in silico* realizado con el programa *Polyphen* indica probable afectación de la función de la proteína con un *score* de 0,988, mientras que el programa *SIFT* predice que la variante podría ser tolerada. El aminoácido mutado se encuentra en un dominio de unión a lípidos CRAL-TRIO que se encuentra muy conservado evolutivamente.

La variante c.726-3C>A fue identificada en heterocigosis en la secuencia intrónica que precede al exón 8 del gen *RPE65* en la familia RP 193. La variante consiste en la transición de una citosina por una adenina en la secuencia aceptora del intrón 7. Los estudios *in silico* predijeron que la mutación provocaría la pérdida de la región aceptora y muy probablemente, el exón 8 no formaría parte del ARNm maduro. Esto conduciría a un desfase en la pauta de lectura y a un codón de parada prematuro.

El cambio c.539G>A; p.R180H fue identificado en heterocigosis en el exón 6 de *TULP1* en la familia RP 333. Las herramientas bioinformáticas predijeron que este cambio era benigno y que no afectaba a ningún dominio proteico identificado por las bases de datos. No obstante, dicho residuo se encuentra evolutivamente muy conservado entre las proteínas ortólogas de distintas especies de vertebrados (Figura 4.9).

PROM1 p.Val449Met



Human	IHRNLTLEEYDSYUWLGGLVICSLTLIIFYYLGLLCGVCGYDRHATPTTRGCVSNTG
House	LNQELPKLEEYDSYUWLGGLVICFLLTLIIFFFLGLLCGVFGYDRHATPTTRGCVSNTG
Chimpanzee	IHRNLTLEEYDSYUWLGGLVICSLTLIIFYYLGLLCGVCGYDRHATPTTRGCVSNTG
Dog	IHRNLTLEEYDSYUWLGGLVICSLTLIIFYYLGLLCGVCGYDRHATPTTRGCVSNTG
Platypus	IEDYFPAIEQYDFYRWLGGLIICLVVLIIFYYLGLLCGACGYDRHATPTTRGCVSNTG

RLBP1 p.Thr292Met



Human	SGFYQEIDENILPSDFGGTLPKYDGKVAEQLFQFQAQENTAF
Chimpanzee	SGFYQEIDENILPSDFGGTLPKYDGKVAEQLFQFQAQENTAF
Dog	SGFFQEIDEDILPADFGGTLPKYDGKVAEQLFQFQAQENTAF
Mouse	DGFFQEIDENILPADFGGTLPKYDGKVAEQLFQFRAEVENTAL
	.,*,*****;***;*****;*****;*****;*,;****;

TULP1 p.Arg180His



Human	SSADLKERRAKAQGPRGDLGSPDPPPKPLRVRNKEAPAGEGTMKRKTKKK---GSGEADK
Chimpanzee	SSADLKERRAKAQGPRGDLGSPDPPPKPLRVRNKEAPAGEGTMKRKTKKK---GSGEADK
Mouse	KAPKEREKAKALGPRGDVGSPPAPRKLRTKKKEV--GEGTKLRKAKKK---GPGETDK
Dog	TSAGIKERRAKAQGQKGLASFPVPAPKPLRIKKKEAPAGEGTMKRKTKKKAYTGSGEADQ
Platypus	-----

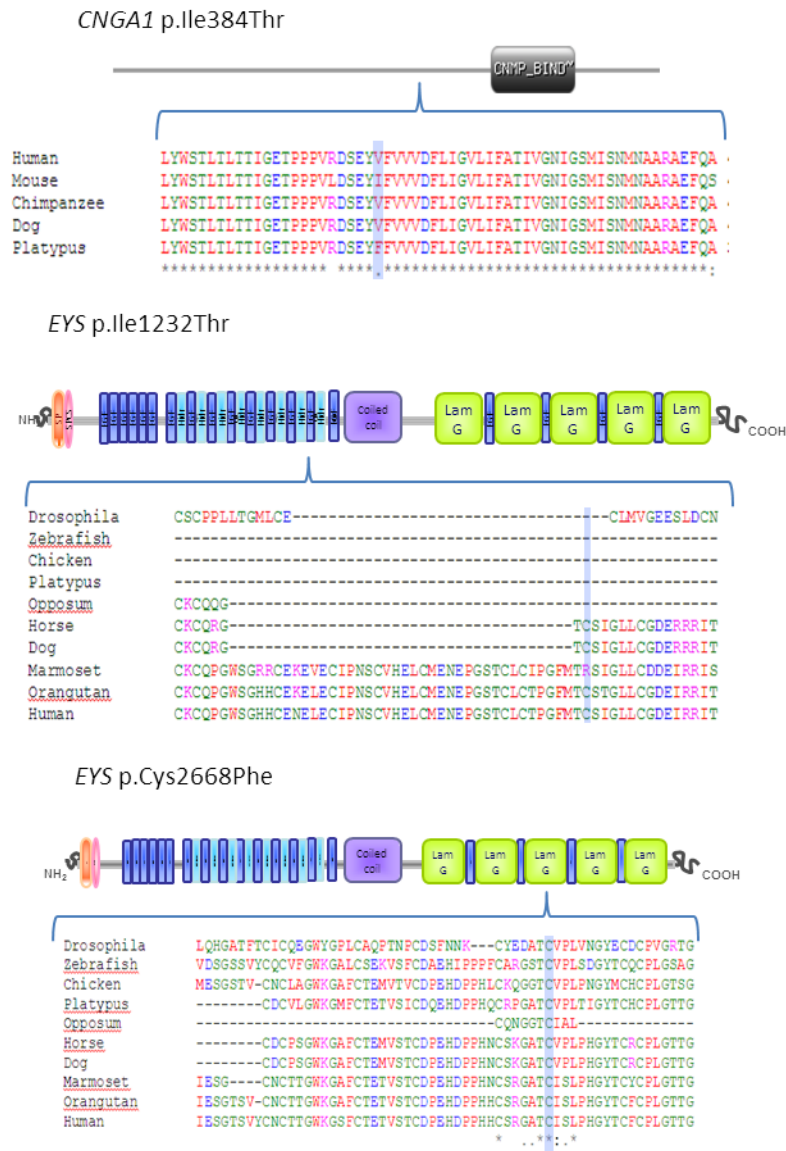


Figura 4.9 – Alineamiento múltiple de las proteínas ortólogas en diferentes especies. El residuo mutado está sombreado. Para el estudio de las variantes de *EYS*, hemos usado el alineamiento de ortólogos realizado por nuestro grupo de investigación [Barragan y cols., 2010].

Tabla 4.9 – Resultado del análisis *in silico* de los nuevos cambios.

	Cambios codificantes					Cambios no codificantes
	¿La sustitución aminoacídica afecta a la función de la proteína?		Dominio proteico donde está el cambio	¿Residuo evolutivamente conservado?	¿Afecta a la formación de un puente disulfuro?	¿Afecta a los mecanismos de <i>splicing</i> del ARNm?
	<i>PolyPhen-2</i>	<i>SIFT</i>	<i>Scan Prosite</i>	<i>ClustalW2</i>	<i>DIANNA (v. 1.1)</i>	<i>NNSPLICE v.0.9</i>
CNGA1 c.1151T>C p.Ile384Thr	Benigno (Score=0,095)	Tolerado (Score= 0,13)	No	Sí	-	-
EYS c.3695T>C p.Ile1232Thr	Benigno (Score=0,001)	Tolerado (Score= 0,54)	Tipo EGF	Sí	-	-
EYS c.5928-2A>G	-	-	-	-	-	Sí, pérdida del sitio aceptor
EYS c.8003G>T p.Cys2668Phe	Probablemente dañino (Score=1,000)	Dañino (Score=0)	Laminina G	Sí	Sí	-
PROM1 c.1562C>A p.Thr520Lys	Benigno (Score=0,043)	Tolerado (Score= 0,52)	Ninguno	No	-	-
RLBP1 c.875A>T p.Thr292Met	Probablemente dañino (Score=0,988)	Tolerado (Score=0,09)	Cral-Trio (dominio de unión a lípidos)	Sí	-	-
RPE65 c.726-3C>A	-	-	-	-	-	Sí, pérdida del sitio aceptor
TULP1 c.539G>A p.Arg180His	Benigno (Score=0,071)	Tolerado (Score 0,12)	Ninguno	Sí	-	-

POLYPHEN-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) [Adzhubei y cols., 2010], SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) [Kumar y cols., 2009], Scanprosite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) [Sigrist y cols., 2010], CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) [Sievers y cols., 2011], Dianna v.1.1 (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>) [Ferre y Clote, 2005] y NNSPLICE v.0.9 (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

4.1.3 Análisis por Multiplex-Ligation Probe Amplification del gen *EYS*

Dado que las mutaciones del tipo variaciones en el número de copias (*Copy number Variations* o *CNVs*) son particularmente frecuentes en el gen *EYS* [Pieras y cols., 2011], los 4 pacientes con mutaciones heterocigotas en dicho gen (Familias RP 60, RP 234, RP 109 y RP 202) fueron analizados por la técnica del Multiplex-Ligation Probe Amplification (MLPA) como una aproximación alternativa para detectar *CNVs* y así profundizar en los mecanismos moleculares de dichas mutaciones.

El presente estudio resultó en la detección de un *CNV* intragénico en el paciente índice de la familia RP 234 que portaba un cambio nuevo identificado por la micromatriz de resecuenciación (p.I1232T, ausente en controles). El análisis por MLPA reveló un 0% de dosis en el exón 12 de *EYS* y un 50% de dosis en el intrón 12 adyacente (Figura 4.10).

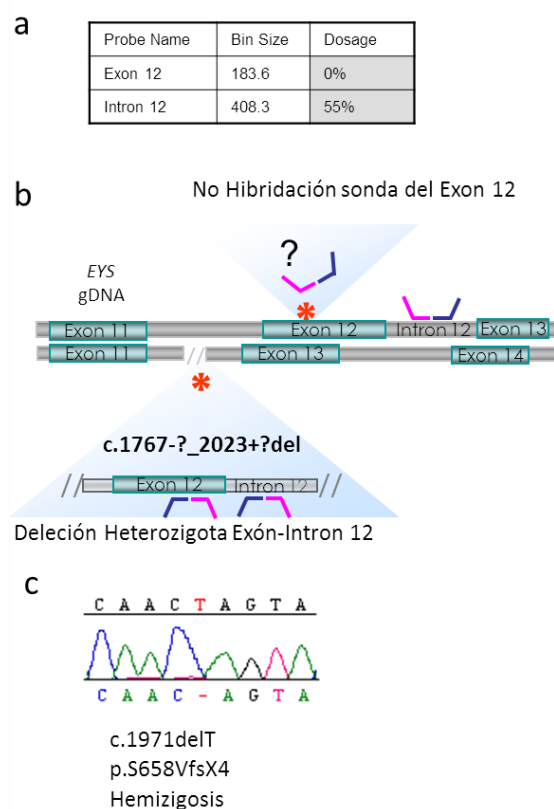


Figura 4.10 – Mutaciones identificadas en la familia RP 234.

a | Lecturas de dosis de MLPA y el tamaño de los fragmentos de las sondas para el exón y el intrón 12. **b** | Representación esquemática de las regiones de hibridación de las sondas de MLPA (en rosa y azul) de los exones 11-14 del gen *EYS*. Los asteriscos muestran la localización de las mutaciones y como éstas afectan al proceso de hibridación. **c** | Electroferograma de la secuenciación Sanger del paciente índice confirmando la delección hemicigota de 1 base (c.1971delT).

Esta situación puede ser explicada por la coexistencia de dos eventos patogénicos independientes que tienen lugar en alelos distintos. Uno de ellos es la deleción heterocigota del exón12-intrón12 y el otro sería un defecto subyacente en la región de ADN donde la sonda del MLPA debería haber hibridado. Tal y cómo esperábamos, la secuenciación posterior por el método de Sanger mostró una deleción de una 1pb en aparente homocigosis impidiendo la correcta hibridación de la sonda de MLPA (Figura 4.10). La segregación familiar de los cambios no pudo llevarse a cabo al no disponer de muestras de los familiares, no obstante el árbol familiar mostró que únicamente había un individuo afecto (Figura 4.11). Cabe destacar que tanto la gran deleción c.1767-?_2023+?del; p.C590Yfs*4, como la deleción de 1 una base hemicigota c.1971delT; p.S658Vfs*4 son mutaciones conocidas que fueron descritas previamente por nuestro grupo en otras familias afectas de RPar no relacionadas [Abd El-Aziz y cols., 2008b, Pieras y cols., 2011].

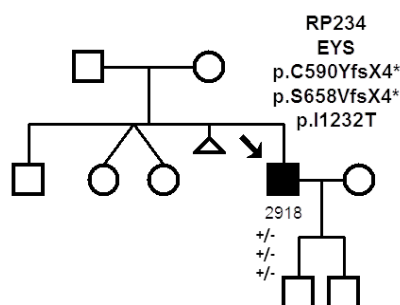


Figura 4.11 – Estructura de la familia RP 234.

*Mutaciones previamente descritas por nuestro grupo de investigación en otros pacientes RPar no relacionados [Abd El-Aziz y cols., 2008b, Pieras y cols., 2011].

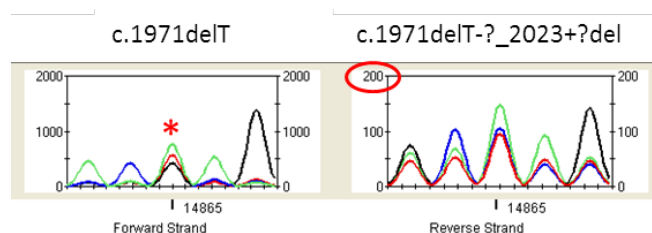


Figura 4.12 – Análisis de la secuencia flanqueante al nucleótido mutado mediante el programa GSEQ.

Las cadenas forward y reverse corresponden a cada uno de los alelos del paciente. El asterisco señala la base delecionada (c.1971delT) en la cadena forward que es leída como una indeterminación. Por otra parte, la intensidad de la cadena reverse es 10 veces menor (rodeado en rojo) indicando que este alelo está delecionado (c.1767-?_2023+?del).

En un intento de definir un perfil característico que permita la detección de estas mutaciones heterocigotas mediante nuestra micromatriz de resecuenciación, los datos fueron reanalizados y la intensidad (altura de los picos en el eje de ordenadas) de cada cadena fue evaluada. Los resultados mostrados en la Figura 4.12 revelan que la intensidad de la señal es coherente con los dos alelos mutados. La base T delecionada fue interpretada por el software como un nucleótido indeterminado (n) en la cadena *forward*, mientras que la gran deleción en el otro alelo (cadena *reverse*) se manifestó como una caída en la intensidad de la señal.

4.1.4 Secuenciación del exoma completo en familias RPar

Mediante la secuenciación del exoma completo en los miembros de las 8 familias seleccionadas, se detectaron un total de 11 variantes de secuencia potencialmente patogénicas (Tabla 4.10).

Todas las variantes fueron verificadas mediante secuenciación Sanger del exón mutado. De los 11 cambios de secuencia potencialmente patogénicos identificados, 4 eran mutaciones previamente descritas y 7 eran mutaciones nuevas.

Tabla 4.10 – Mutaciones encontradas mediante secuenciación del exoma completo.

Familia	Gen	Variante		Estado	Novel/ Referencia
		ADNc	Proteína		
RP 429	<i>USH2A</i>	c.4325T>C	p.F1442S	Heterocigosis	Novel
	<i>USH2A</i>	c.15188T>G	p.L5063R	Heterocigosis	Novel
RP 19	<i>ABCA4</i>	c.2041C>T	p.R681*	Heterocigosis	Maugueri y cols., 1999
	<i>ABCA4</i>	c.6088C>T	p.R2030*	Heterocigosis	Lewis y cols., 1999
RP 255	<i>C2ORF71</i>	c. 1975T>C	p.C599R	Homocigosis	Novel
RP 15	<i>RPGR</i>	c.2405-2406delAG	p.E802Gfs*31	Hemicigosis	Vervoort y cols., 2000
RP368	<i>BBS1</i>	c.1169T>C	p.M390R	Homocigosis	Mykytyn y cols., 2003
RP 42	<i>MKKS</i>	c.296>G	p.D90G	Heterocigosis	Novel
	<i>MKKS</i>	c.1186G>T	p.V396F	Heterocigosis	Novel
RP 258	<i>GPR98</i>	c.5368A>G	p.I1790V	Heterocigosis	Novel
RP 184	<i>PCDHA1</i>	c.1049T>G	p.L350R	Homocigosis	Novel

Para explicar cada uno de los cambios con más detalle, los resultados se han desglosado en tres categorías: familias con mutaciones en genes asociados previamente a la RPar, familias con mutaciones en genes no asociados a la RPar pero sí a otros tipos de DHR y familias con mutaciones en genes nuevos de DHR.

4.1.4.1 Mutaciones en genes asociados a RPar

En 3 de las familias analizadas (RP 429, RP 19 y RP 255) la secuenciación completa del exoma permitió la detección de variantes en genes asociados previamente a la patogénesis de la RPar.

En la familia RP 429 se identificaron dos cambios en heterocigosis compuesta en el gen *USH2A* (c.4325T>C, p.F1442S y c.15188T>G, p.L5063R). Se trata de variantes nuevas no reportadas con anterioridad. La segregación familiar se llevó a cabo en todos los miembros familiares disponibles (Figura 4.13). La presencia de ambas mutaciones en dos individuos supuestamente asintomáticos en el momento del estudio (II:2 y II:7), llevó a la reevaluación clínica de ambos, mostrando síntomas de afectación retiniana (ceguera nocturna y acúmulo de espículas en la periferia).

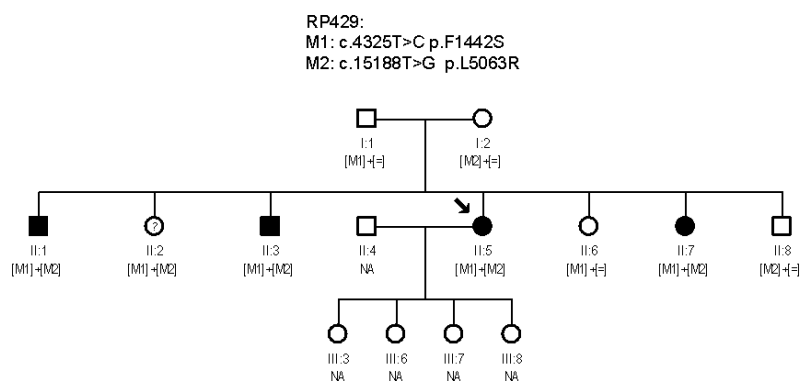


Figura 4.13 – Segregación familiar de la familia RP429.

Se muestra la segregación de ambas mutaciones en *USH2A* con la enfermedad.

Los resultados de los estudios *in silico* de predicción de patogenicidad sugieren que ambos cambios no serían tolerados por la proteína. Este punto de vista es corroborado por el alto grado de conservación de ambos residuos aminoacídicos en vertebrados (Figura 4.14) y por el hecho de que forman parte de un dominio proteico.

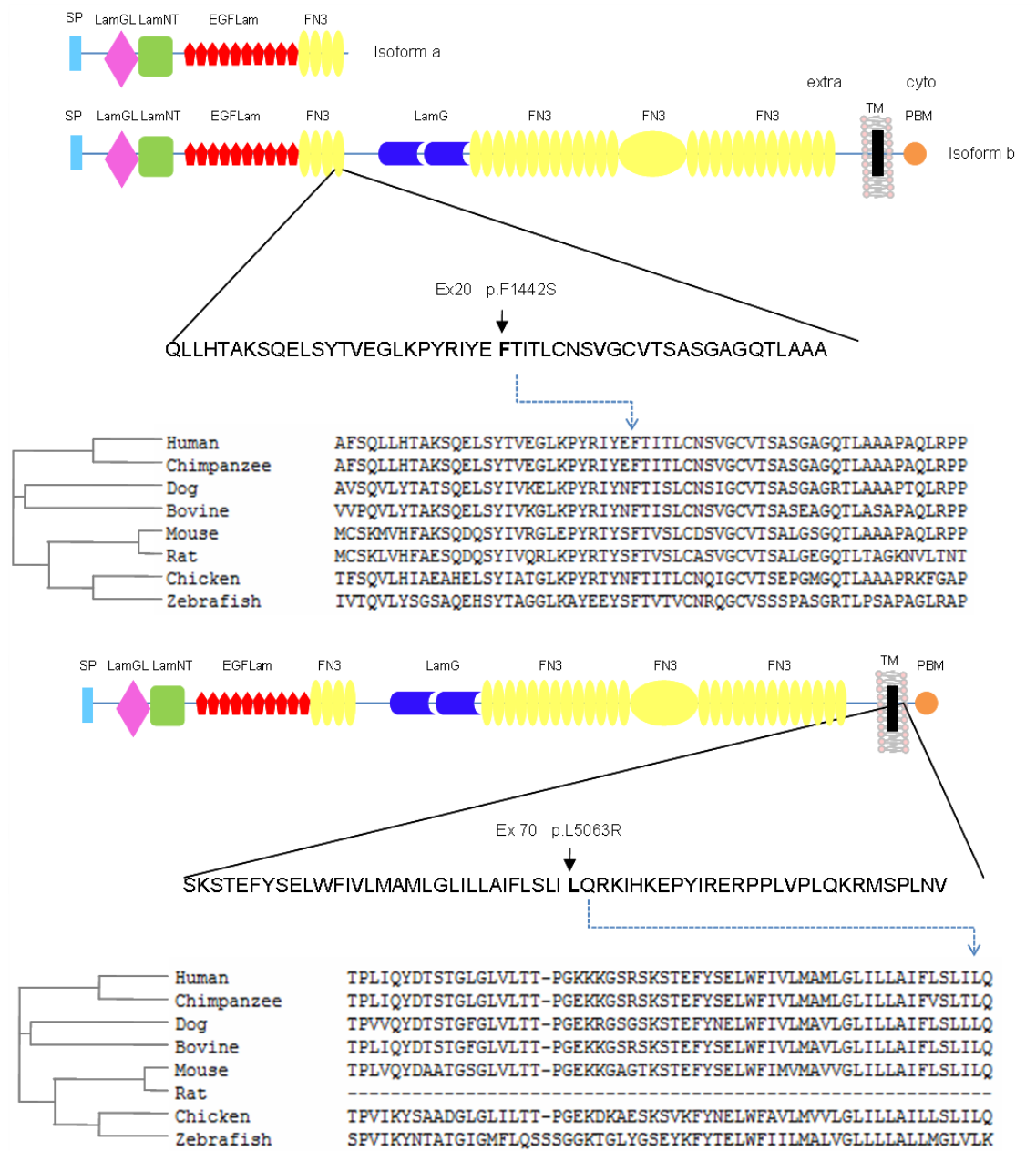


Figura 4.14 – Representación esquemática de la proteína usherina y los residuos mutados. La isoforma A más corta, arriba, y la isoforma B anclada a membrana más larga (abajo). Los aminoácidos mutados F1442S y L5063R, se encuentran indicados con flechas. El alineamiento filogenético entre distintas especies de vertebrados muestra la alta conservación de ambos residuos mutados.

La secuenciación del exoma del paciente índice de la familia RP19 permitió la identificación de dos mutaciones en heterocigosis compuesta en el gen *ABCA4*, p.R681* y p.R2030*. Se trata de dos mutaciones conocidas en las que se origina un codón de parada prematuro. El estudio mediante secuenciación Sanger en el resto de miembros familiares mostró la segregación de ambos cambios con la enfermedad (Figura 4.15).

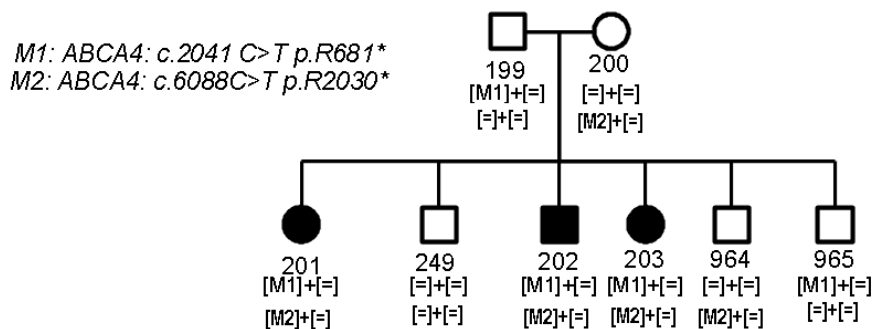


Figura 4.15 – Segregación familiar de la familia RP 19 de las mutaciones en ABCA4.

Los individuos afectados son portadores de ambas mutaciones en heterocigosis ([M1]+[=]; [M2]+[=]); los sanos muestran un genotipo silvestre [=]+[=] para al menos una de las mutaciones.

La secuenciación del exoma de la familia RP 255 identificó una mutación homocigota (c. 1975T>C; p.C599R) en el gen *C2orf71* (Figura 4.16). Se trata de una mutación rara. Los estudios bioinformáticos predicen que se trata de una mutación muy probablemente dañina (Polyphen score=0,979). Además, el residuo implicado (una cisteína) está muy conservado evolutivamente entre mamíferos (Figura 4.17) y podría, según las predicciones, estar formando un puente disulfuro con otra cisteína de la proteína. La segregación familiar y la ausencia en 200 controles refuerzan la patogenicidad de esta variante.

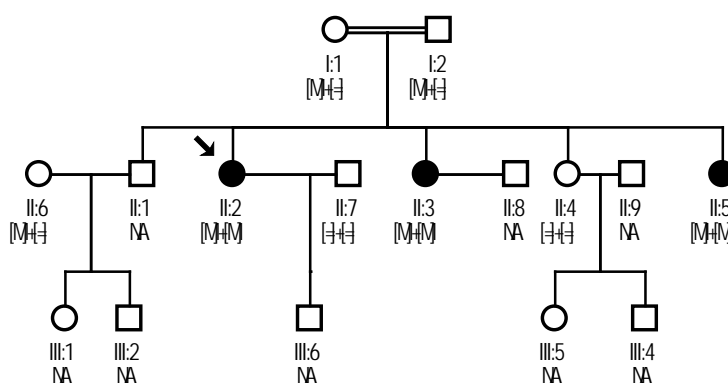


Figura 4.16 – Segregación familiar de la familia RP 255.

[M]: c. 1975T>C; p.C599R en *C2orf71*. Los individuos afectados presentan el genotipo homocigoto [M]+[M], mientras que los sanos son heterocigotos [M]+[=] o silvestres [=]+[=]. NA: muestra no disponible.

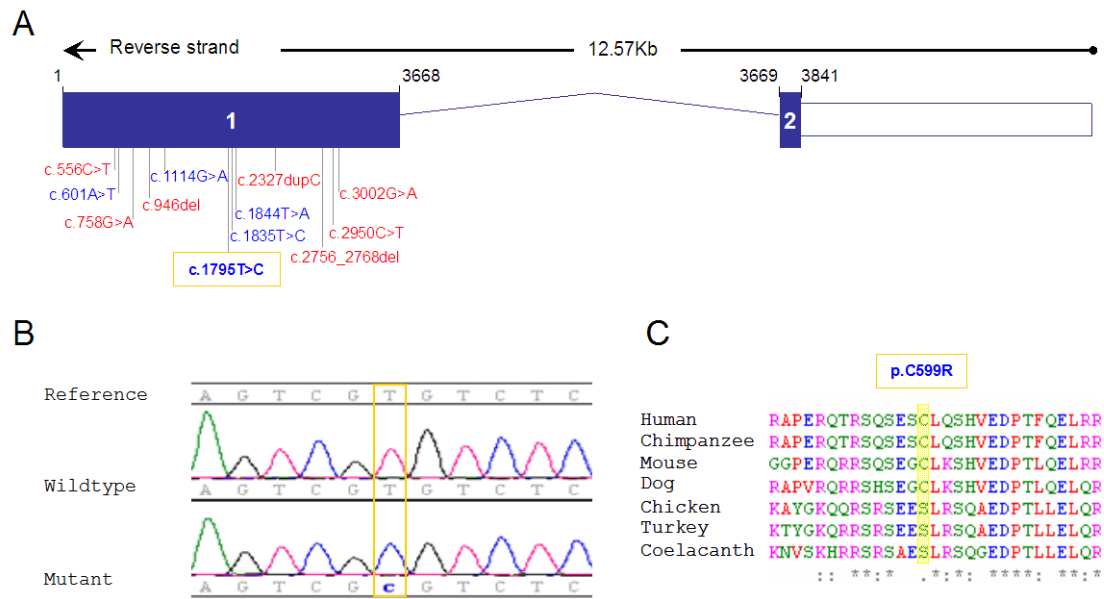


Figura 4.17 – Mutaciones en el exón 1 de C2ORF71

A) Organización génica de *C2ORF71* mostrando las mutaciones distribuidas a lo largo de todo su exón 1. En la imagen únicamente han sido incluidas las mutaciones predichas como patogénicas [Audo y cols., 2011, Nishimura y cols., 2010, Collin y cols., 2010]. La mutación identificada en el presente trabajo aparece dentro de un marco amarillo. Las mutaciones sin sentido y que originan un cambio en la pauta de lectura (frameshift) aparecen en rojo, mientras que las mutaciones con pérdida de sentido (missense) están en azul. B) Cromatogramas de la secuencia silvestre (*wildtype*) de *C2ORF71* y del paciente con la mutación homocigota (*mutant*) c.1795C>T. C) Alineamiento de las secuencias proteicas ortólogas de *C2ORF71* mostrando la conservación del residuo de cisteína únicamente entre mamíferos.

4.1.4.2 Mutaciones en genes asociados a otras DHR

En 4 de las familias analizadas (RP 15, RP 258, RP 368, RP 42), se detectaron mutaciones en genes no típicos de RPar aunque sí asociados a otros tipos de DHRs.

La familia RP 15 que fue inicialmente diagnosticada como RPar dada la falta de historia familiar previa y la estructura del pedigree, fue reclasificada a RPLX al detectarse una mutación en el gen *RPGR* localizado en el cromosoma X. Se trata de un cambio patogénico ya publicado [Vervoort y cols., 2000]. La segregación de la variante es compatible con el modo de herencia ligado al cromosoma X (Figura 4.18).

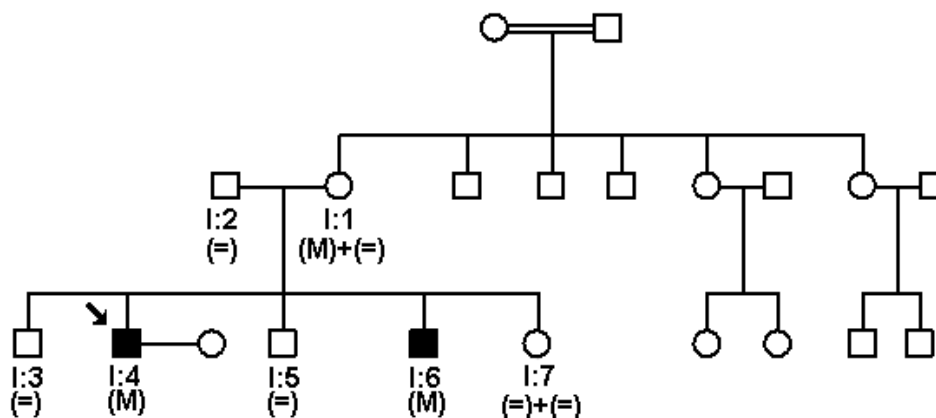


Figura 4.18 – Árbol familiar de la familia RP 15.
 (M): Genotipo Hemizigoto para la variante en el cromosoma X
 (=): Genotipo silvestre (♂)
 (M)+(=): Genotipo heterocigoto (mujer portadora)
 (=)+(=): Genotipo silvestre (♀)

En la familia RP 368 se detectó una mutación homocigota en el gen *BBS1* (c.1169T>C; p.M390R). Se trata de una mutación conocida y asociada al SBB [Mykytyn y cols., 2003]. La reevaluación clínica de los individuos afectados confirmó el diagnóstico leve de SBB en el paciente índice, mientras que los otros parientes afectados (Figura 4.19– II:5, II:8 y III:9) están diagnosticados de RPar no sintomática. En estos tres pacientes, el cambio en *BBS1* no cosegrega con la enfermedad indicando una causa genética de la enfermedad distinta en estos miembros.

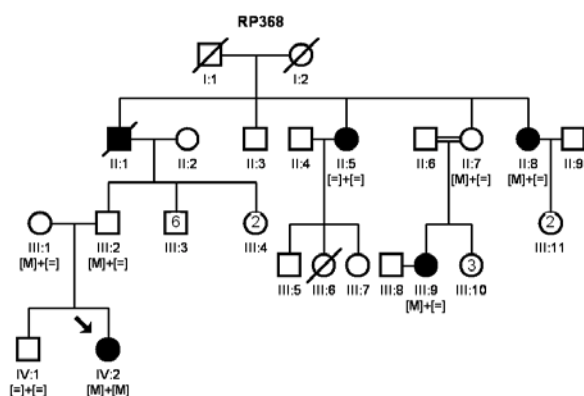


Figura 4.19 – Segregación familiar de la familia RP 368.
 [M]: p.M390R en *BBS1*. El individuo IV:2 está clínicamente diagnosticado de SBB, mientras que los individuos II:5, II:8 y III:9 están diagnosticados de RPar no sintomática. El cambio no cosegrega con la enfermedad en los individuos II:5, II:8 y II:9 aunque sí en el núcleo familiar secuenciado del paciente índice IV:2.

En el paciente índice de la familia RP 42 se detectaron dos mutaciones heterocigotas (c.296>G, p.D90G y c.1186G>T, p.V396F) en el gen *MKKS* (*BBS6*) (Figura 4.20).

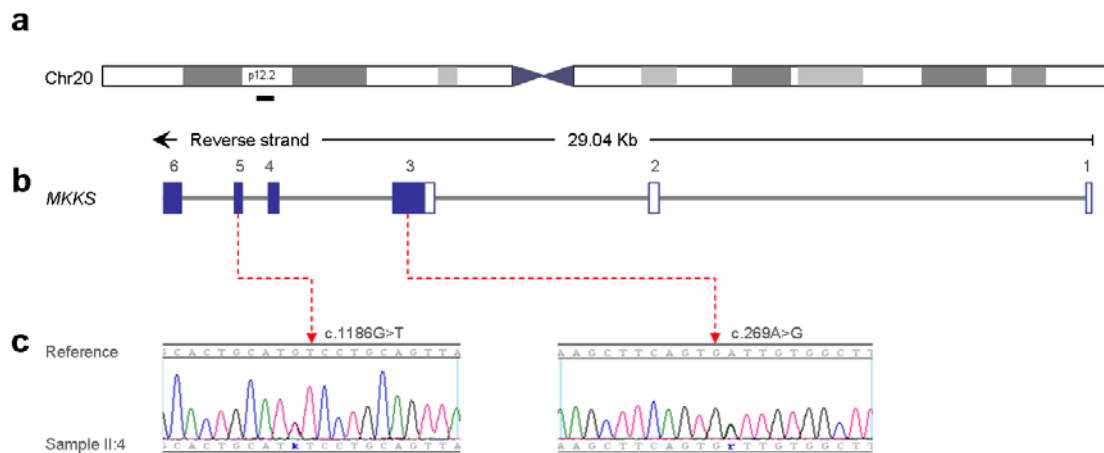


Figura 4.20 – Detección de mutaciones nuevas en el gen *MKKS*.

a| Representación del cromosoma 20, *MKKS* mapea en la región 20p12.2 (barra negra). b| *MKKS* se expande aproximadamente 29 Kb y está compuesta por 6 exones. Los recuadros rellenos reflejan los exones codificantes (exones 3-6) y los recuadros vacíos reflejan las regiones no codificantes (UTR). c| Representación del electroferograma del paciente índice (II:4) confirmando las mutaciones heterocigotas en los exones 3 y 5 del gen *MKKS*. Los códigos IUPAC para la nomenclatura de SNV se usaron para designar las sustituciones heterocigotas (“k” de keto para la sustitución G/T y “R” de puRina para A/G).

Las variantes identificadas en *MKKS* cosegregan con la enfermedad en el resto de familiares disponibles (Figura 4.21) y estaban ausente en los 200 individuos control analizados.

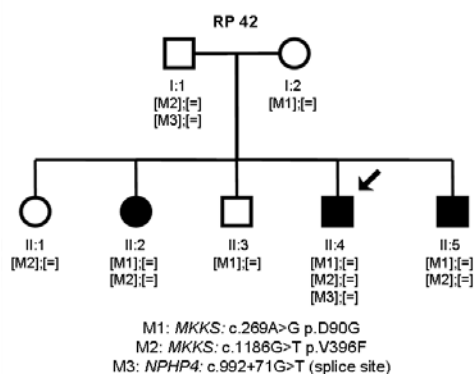


Figura 4.21 – Segregación familiar de las variantes identificadas en la familia RP 42.

Las variantes M1 y M2 se encuentran en el mismo gen (*MKKS*), mientras que la variante M3 se encuentra en otro loci, gen *NPHP4*.

[M1];[=]: Heterocigoto para la mutación #1 en *MKKS* (c.269A>G; p.D90G);

[M2];[=]: Heterocigoto para la mutación #2 en *MKKS* (c.1186G>T; p.V396F).

[M3];[=]: Heterocigoto para la mutación #3 en *NPHP4* (c.992+71G>T).

Se trata de un gen implicado en SBB y nunca anteriormente asociado a RP aislada. La reevaluación clínica de los individuos afectados mostró signos típicos de SBB como afectación retiniana en forma de RP, polidactilia y dificultades de aprendizaje, aunque la clínica en los tres hermanos es algo diferente. La Tabla 4.11 recoge los signos clínicos mostrados por cada uno de los pacientes afectados. El diagnóstico clínico de BBS requiere la presencia de al menos 4 signos primarios, o bien, la combinación de 3 signos primarios y 2 secundarios [Beales y cols., 1999, Rooryck y Lacombe, 2008, Putoux y cols., 2012]. Por tanto, el único individuo que cumple estrictamente los requisitos para recibir un diagnóstico de BBS es el paciente índice II:4.

Tabla 4.11 – Características clínicas de los afectados de la familia RP 42.

		RP 42			
		II 2	II 4	II 5	
Signos primarios de BBS	Retinitis Pigmentosa	√	√	√	
	Polidactilia postaxial	√ Ambos pies	√ Ambos pies	√ Sólo un pie	
	Ganacia anómala de peso	Normopeso	Obesidad	Sobrepeso	
	Dificultades de aprendizaje	√	√	√	
	Anomalías renales		-	√	-
				Poliquistosis renal	
Hipogonadismo en varones	-	-	-		
Signos secundarios de BBS	Torpeza psicomotriz, Ataxia	-	√	-	
	Trastornos del habla	-	-	-	
	Estrabismo	-	-	-	
	Braquidactilia/ Sindactilia	-	-	-	
	Retraso en el desarrollo	-	-	-	
	Polidipsia/Poliuria	-	-	-	
	Espasticidad leve	-	-	-	
	Anomalías en la dentición	-	-	-	
	Cardiopatías congénitas	-	-	-	
	Fibrosis hepática	-	-	-	
Diagnóstico clínico		SBB leve	SBB	SBB leve	

La mutación D90G afecta al dominio ecuatorial y la mutación V396F cae en el dominio intermedio que conecta los dominios ecuatorial y apical (Figura 4.22.a). El alineamiento de la secuencia aminoácida de MKKS de diversas especies ortólogas mostró que los residuos sustituidos (ácido aspártico en la posición 90 y valina en la

posición 396) están altamente conservados filogenéticamente (Figura 4.22.b). Las herramientas bioinformáticas predijeron que ambas variantes son probablemente dañinas según Polyphen-2 (score=1 para p.D90G y score=0,987 para p.V396F) y SIFT (score=0,01 para p.D90G and score=0 para p.V396F).

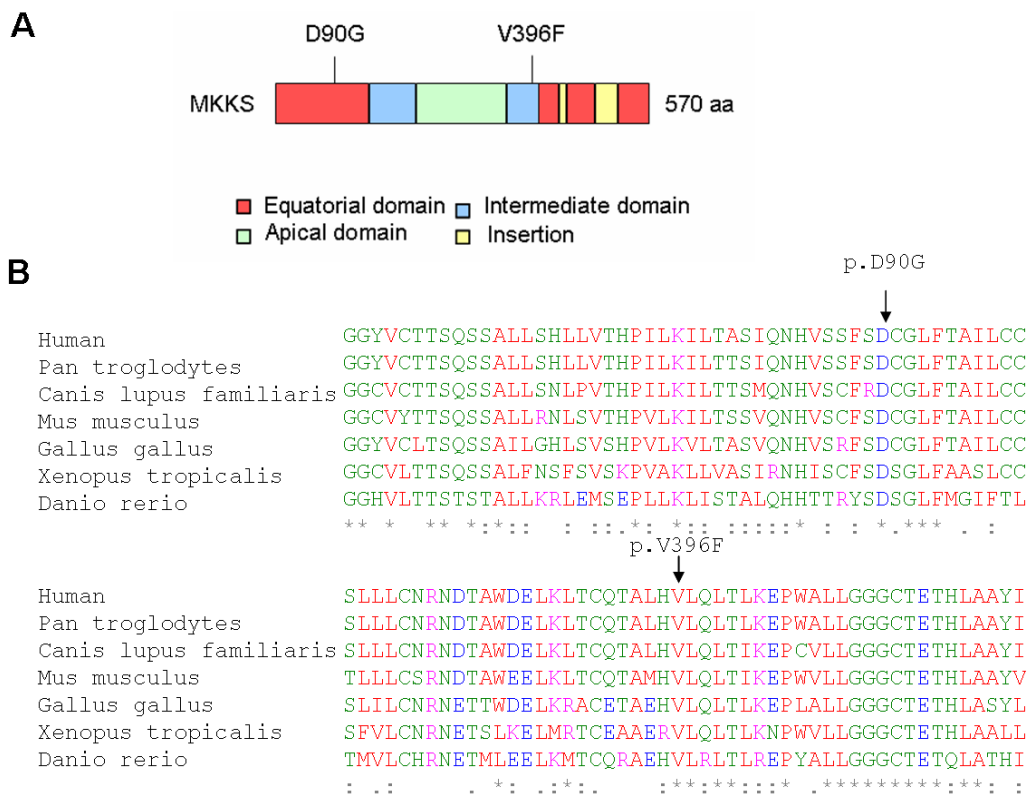


Figura 4.22 – Estructura proteica de la chaperona MKKS.

a) Representación esquemática de las variantes identificadas en cada uno de los dominios proteicos predichos, incluyendo los dominios típicos del grupo II de las chaperonas (ecuatorial, intermedio y apical). La organización de los dominios ha sido modificada de Stoetzel y cols. [2007]. b) Alineamiento de los ortólogos de distintas especies mostrando el grado de conservación filogenética de los residuos mutados. Los “*” (asteriscos) indican las posiciones que tienen un único residuo aminoacídico completamente conservado. Los “:” (dos puntos) indican conservación entre grupos de aminoácidos con propiedades físico-químicas bastante similares. Los “.” (puntos) indican conservación entre grupos de aminoácidos con propiedades algo similares

Los datos obtenidos de la secuenciación del exoma del paciente con el fenotipo más severo (II:4) fueron sometidos a una evaluación exhaustiva, prestando especial atención a la identificación de variantes adicionales que pudieran estar ejerciendo un posible efecto epistático, que agravaría el fenotipo del paciente. Aunque se identificaron un gran número de variantes en los 16 genes restantes asociados con la aparición del SBB: *ARL6*, *BBS1*, *BBS2*, *BBS4*, *BBS5*, *BBS7*, *BBS9*, *BBS10*, *BBS12*, *CEP290*, *INPP5E*, *LZTFL1*, *MKS1*, *SDCCAG8*, *TRIM32* y *TTC8*, ninguna de ellas parecía contribuir al fenotipo del paciente.

Otra posibilidad es que la poliquistosis renal (PKD) que afecta únicamente al paciente índice estuviera causada por mutaciones en otros loci responsables de ciliopatías relacionadas como los genes propios de la PKD o de la nefronoptisis (NPH). Para ello se revisó minuciosamente la secuencia exómica de los genes: *PKD1*, *PKD2* y *PKHD1*, *NPHP1*, *INVS*, *NPHP3*, *NPHP4*, *IQCB1*, *GLIS2*, *RPGRIP1L*, *NEK8*, *MKS1* y *TMEM67*.

Tabla 4.12 – Variantes de secuencia identificadas en el paciente índice de la familia RP42 en genes implicados en el SBB, poliquistosis renal, SLS y Nefronoptisis.

Gen	Posición genómica (Hg 19)	RS ID/ Novel	Genotipo
<i>BBS2</i>	16:56545175T>C	rs11373	[M]+[=]
<i>BBS4</i>	15:72987588G>T	rs4777527	[M]+[M]
<i>BBS4</i>	15:73002035G>A	rs8033604	[M]+[M]
<i>BBS4</i>	15:73007893G>A	rs730180	[M]+[M]
<i>BBS4</i>	15:73023937T>C	rs12914333	[M]+[M]
<i>BBS4</i>	15:73027478T>C	rs2277598	[M]+[=]
<i>BBS4</i>	15:73028375G>A	rs12324395	[M]+[M]
<i>BBS5</i>	2:170336024G>C	rs1879466	[M]+[M]
<i>BBS5</i>	2:170361415A>G	rs12692910	[M]+[M]
<i>BBS5</i>	2:170361426T>C	rs12692911	[M]+[M]
<i>BBS7</i>	4:122749541C>T	rs1507994	[M]+[=]
<i>BBS9</i>	7:33233240A>G	rs10270013	[M]+[M]
<i>BBS9</i>	7:33282577G>A	rs7793096	[M]+[M]
<i>BBS9</i>	7:33380598G>T	rs11981364	[M]+[=]
<i>BBS9</i>	7:33380673T>C	rs10486527	[M]+[=]
<i>BBS9</i>	7:33385852C>T	rs6974593	[M]+[M]
<i>BBS9</i>	7:33388618C>T	rs9785054	[M]+[M]
<i>BBS9</i>	7:33388829T>A	rs73101660	[M]+[=]
<i>CEP290</i>	12:88453608C>T	rs2471512	[M]+[=]
<i>CEP290</i>	12:88472996C>T	rs61941020	[M]+[=]
<i>CEP290</i>	12:88496838C>G	rs2471532	[M]+[=]
<i>CEP290</i>	12:88505078T>C	rs2468255	[M]+[=]
<i>GLIS2</i>	16:4386814T>C	rs669561	[M]+[=]
<i>GLIS2</i>	16:4388139G>A	rs653539	[M]+[=]
<i>INPP5</i>	9:139323201A>G	rs1128877	[M]+[=]
<i>INPP5</i>	9:139323311T>C	rs8413	[M]+[=]
<i>INPP5</i>	9:139324680C>T	rs4451431	[M]+[=]
<i>INPP5</i>	9:139324740C>T	rs10870182	[M]+[=]
<i>INPP5</i>	9:139327034A>G	rs10870194	[M]+[=]
<i>INPP5</i>	9:139327439A>G	rs10781542	[M]+[=]
<i>INPP5</i>	9:139328722G>T	rs7851507	[M]+[=]
<i>INVS</i>	9:102869846G>A	rs10988973	[M]+[M]
<i>INVS</i>	9:103015184T>C	rs2245216	[M]+[M]
<i>INVS</i>	9:103054941G>A	rs76868679	[M]+[=]
<i>INVS</i>	9:103054951T>C	rs2787374	[M]+[M]
<i>IQCB1</i>	3:121500699C>T	rs17849995	[M]+[=]
<i>IQCB1</i>	3:121526099A>G	rs4582090	[M]+[=]

<i>IQCB1</i>	3:121526204G>A	rs4543051	[M]+[=]
<i>MKKS</i>	20:10386013C>A	rs1545	[M]+[=]
<i>MKKS</i>	20:10386059G>A	rs1547	[M]+[=]
<i>MKKS</i>	20:10388350C>A	Novel patogénica	[M]+[=]
<i>MKKS</i>	20:10388506G>A	rs6133907	[M]+[M]
<i>MKKS</i>	20:10389218T>C	rs6133909	[M]+[=]
<i>MKKS</i>	20:10389480T>A	rs764266	[M]+[=]
<i>MKKS</i>	20:10393162A>C	rs6133917	[M]+[=]
<i>MKKS</i>	20:10393629G>A	rs17852625	[M]+[=]
<i>MKKS</i>	20:10393894T>C	Novel patogénica	[M]+[=]
<i>MKKS</i>	20:10394046G>A	rs16991547	[M]+[=]
<i>MKS1</i>	17:56290253C>T	rs115496661	[M]+[=]
<i>MKS1</i>	17:56290253C>T	rs115496661	[M]+[=]
<i>MKS3</i>	8:94768124C>G	rs74712633	[M]+[=]
<i>MKS3</i>	8:94794620C>T	rs3097427	[M]+[=]
<i>MKS3</i>	8:94808165A>G	rs3134031	[M]+[=]
<i>NEK</i>	4:170322819G>A	rs200710438	[M]+[=]
<i>NEK</i>	4:170354836C>T	rs7680152	[M]+[=]
<i>NEK</i>	4:170354873T>C	rs13139925	[M]+[=]
<i>NEK</i>	4:170398454T>C	rs34099167	[M]+[=]
<i>NEK</i>	4:170428331G>T	rs6855803	[M]+[=]
<i>NEK</i>	4:170428843C>A	rs17054977	[M]+[=]
<i>NEK</i>	4:170429359C>T	rs66509122	[M]+[=]
<i>NEK</i>	4:170482883A>G	rs56064008	[M]+[=]
<i>NEK</i>	4:170501850A>T	rs7665092	[M]+[=]
<i>NEK</i>	4:170501954T>C	rs7670271	[M]+[=]
<i>NEK</i>	4:170506703A>G	rs55679731	[M]+[=]
<i>NEK</i>	4:170532808A>G	rs28439336	[M]+[M]
<i>NPHP1</i>	2:110882699A>G	rs2048243	[M]+[M]
<i>NPHP1</i>	2:110886683C>T	rs111532194	[M]+[=]
<i>NPHP1</i>	2:110889108C>T	rs11240790	[M]+[M]
<i>NPHP1</i>	2:110902262G>A	rs3752863	[M]+[M]
<i>NPHP1</i>	2:110905664G>A	rs1509417	[M]+[M]
<i>NPHP1</i>	2:110906415T>C	rs7599788	[M]+[M]
<i>NPHP1</i>	2:110919321C>T	rs2271244	[M]+[M]
<i>NPHP1</i>	2:110922703C>T	rs11675767	[M]+[M]
<i>NPHP1</i>	2:110942150G>A	rs881302	[M]+[M]
<i>NPHP1</i>	2:110942496G>A	rs906815	[M]+[M]
<i>NPHP1</i>	2:110942656A>G	rs2018711	[M]+[M]
<i>NPHP1</i>	2:110942694T>C	rs1810097	[M]+[M]
<i>NPHP1</i>	2:110942816G>C	rs1810096	[M]+[M]
<i>NPHP1</i>	2:110959898C>G	rs11240794	[M]+[M]
<i>NPHP3</i>	3:132435532C>T	rs67092166	[M]+[=]
<i>NPHP3</i>	3:132435823C>T	rs11718115	[M]+[=]
<i>NPHP3</i>	3:132436967A>G	rs66564593	[M]+[=]
<i>NPHP4</i>	1:5923788T>G	rs11121648	[M]+[=]
<i>NPHP4</i>	1:5934490A>G	rs868163	[M]+[M]
<i>NPHP4</i>	1:5935162A>T	rs1287637	[M]+[M]
<i>NPHP4</i>	1:5935222T>C	rs963030	[M]+[=]
<i>NPHP4</i>	1:5937091T>C	rs1622955	[M]+[M]
<i>NPHP4</i>	1:5937391C>T	rs3747989	[M]+[M]
<i>NPHP4</i>	1:5939544T>G	rs11121915	[M]+[M]

<i>NPHP4</i>	1:5948677G>A	rs2282281	[M]+[M]
<i>NPHP4</i>	1:5964991T>C	rs3737234	[M]+[M]
<i>NPHP4</i>	1:5967064G>T	rs9628990	[M]+[M]
<i>NPHP4</i>	1:6007446C>T	rs551207	[M]+[M]
<i>NPHP4</i>	1:6008059C>A	Novel splicing	[M]+[=]
<i>NPHP4</i>	1:6027167C>A	rs875574	[M]+[M]
<i>NPHP4</i>	1:6027252A>G	rs875573	[M]+[M]
<i>NPHP4</i>	1:6038583G>C	rs4908639	[M]+[M]
<i>PKD1</i>	16:2160494C>T	rs79884128	[M]+[M]
<i>PKD2</i>	4:88959381G>A	rs2725221	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51483961T>C	rs9381994	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51491884T>C	rs4715227	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51492046T>G	rs9474033	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51512707T>C	rs2580009	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51524403G>A	rs34460237	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51538501G>A	rs62461292	[M]+[M]
<i>PKHD1</i>	6:51586771G>A	rs9349593	[M]+[M]
<i>PKHD1</i>	6:51613177C>T	rs765525	[M]+[M]
<i>PKHD1</i>	6:51618599G>A	rs6914483	[M]+[M]
<i>PKHD1</i>	6:51619890G>A	rs9395712	[M]+[M]
<i>PKHD1</i>	6:51628525T>C	rs9382015	[M]+[M]
<i>PKHD1</i>	6:51640751C>G	rs3920621	[M]+[M]
<i>PKHD1</i>	6:51649079A>G	rs4715232	[M]+[M]
<i>PKHD1</i>	6:51656236G>T	rs7765455	[M]+[M]
<i>PKHD1</i>	6:51682966C>T	rs7748507	[M]+[M]
<i>PKHD1</i>	6:51712492A>T	rs9370067	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51720838T>C	rs9349603	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51720872A>G	rs7452724	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51732598G>A	rs9382043	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51732628G>A	rs9382044	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51732807C>T	rs12210295	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51735261G>T	rs982874	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51798753G>A	rs1266888	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51798760T>A	rs1884953	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51799166T>C	rs1266889	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51875250A>C	rs2435322	[M]+[M]
<i>PKHD1</i>	6:51917968T>G	rs4715271	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51923409A>T	rs4715272	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51924774A>G	rs1896976	[M]+[M]
<i>PKHD1</i>	6:51935061T>G	rs4711996	[M]+[M]
<i>PKHD1</i>	6:51938242A>G	rs9474140	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51947237G>A	rs9474143	[M]+[=]
<i>PKHD1</i>	6:51947257G>A	rs6901799	[M]+[=]
<i>RPGRIP1L</i>	16:53634295C>T	rs1946155	[M]+[=]
<i>RPGRIP1L</i>	16:53635933A>T	rs4784319	[M]+[=]
<i>RPGRIP1L</i>	16:53672355C>T	rs7203525	[M]+[=]
<i>RPGRIP1L</i>	16:53699003G>A	rs4133017	[M]+[=]
<i>SDCCAG8</i>	1:243419429T>A	rs3904682	[M]+[=]
<i>SDCCAG8</i>	1:243471192A>G	rs953492	[M]+[=]
<i>SDCCAG8</i>	1:243481431A>G	rs2783972	[M]+[=]
<i>SDCCAG8</i>	1:243487371A>G	rs2484638	[M]+[M]
<i>SDCCAG8</i>	1:243493907A>T	rs2275155	[M]+[=]

<i>SDCCAG8</i>	1:243579112G>A	rs10927011	[M]+[=]
<i>SDCCAG8</i>	1:243651806C>T	rs12042298	[M]+[=]
<i>TRIM32</i>	9:119463189T>C	rs2281627	[M]+[=]
<i>TSC2</i>	16:2110795G>A	rs1800725	[M]+[=]
<i>TSC2</i>	16:2111779T>C	rs17135764	[M]+[=]
<i>TSC2</i>	16:2120402T>C	rs7187438	[M]+[=]
<i>TTC8</i>	14:89307320T>C	rs17700296	[M]+[=]

[M]+[=]: Variante identificada en heterocigosis

[M]+[M]: Variante identificada en homocigosis

Con esta aproximación genómica logramos identificar la presencia de una variante (c.992+71G>T) en el intrón 8-9 del gen *NPHP4* (responsable de NPH autosómica recesiva). La segregación familiar mostró la presencia de la variante heterocigota únicamente en el paciente índice y en su padre sano (Figura 4.21). Las herramientas bioinformáticas predijeron que la sustitución de una G>T en esa posición activa la utilización de un sitio críptico de splicing aceptor en el intrón 8-9 de *NPHP4* (Tabla 4.13). El cambio c.992+71G>T no fue detectado en 200 individuos control secuenciados. El análisis de la secuencia codificante completa de *NPHP4* permitió descartar la presencia de una segunda mutación en el mismo gen, apoyando el papel epistático de esta mutación.

Tabla 4.13 – Resultados de las predicciones in silico para el nuevo sitio aceptor de los alelos silvestre vs. mutante.

Alelo	Silvestre	Mutante c.992+71G>T
	Intron aggtcattt gt gc at gtc ag gtgt	Intron EXON Aggtcattt gt tc at gtc ag GTGT
NNSPLICE	0	0,71
ESEfinder		
3SS_U2_human (threshold: 6.632)	0	7,74
3SS_U2_mouse (threshold: 6.724)	0	7,26
BranchSite (threshold: 0)	0	2,07090 (tgttcat)
NetGene2	0	0,28

El nucleótido mutado está señalado en negrita. El sitio de splicing aceptor predicho se encuentra subrayado. 3SS_U2_Human: 3's splice sites (aceptor) de humanos (tipo U2). 3SS_U2_mouse: 3's splice sites (aceptor) de ratón (tipo U2). Branch Branch site: mammalian branch site (U2 type).

En la familia RP 258 se detectó una única mutación heterocigota en el gen *GPR98* (c.5368A>G; p.I1790V). La segunda mutación en ese gen no ha podido ser aún detectada mediante NGS. El gen *GPR98* está implicado en la patogénesis de USH. La reevaluación clínica de los pacientes confirmó el diagnóstico de RPar.

Al objeto de comprobar si el otro alelo del gen cosegregaba con la enfermedad, se llevó a cabo el estudio indirecto mediante una serie de marcadores microsatélites localizados en regiones del cromosoma 5 cercanas a *GPR98*. El estudio reveló que ambos alelos segregaban con la enfermedad en la familia. Los hermanos afectos comparten la misma combinación de marcadores microsatélites, mientras que el hermano sano ha heredado un alelo diferente (Figura 4.23). Actualmente se está trabajando en la detección de la causa genética de la enfermedad en dicha familia mediante una aproximación alternativa.

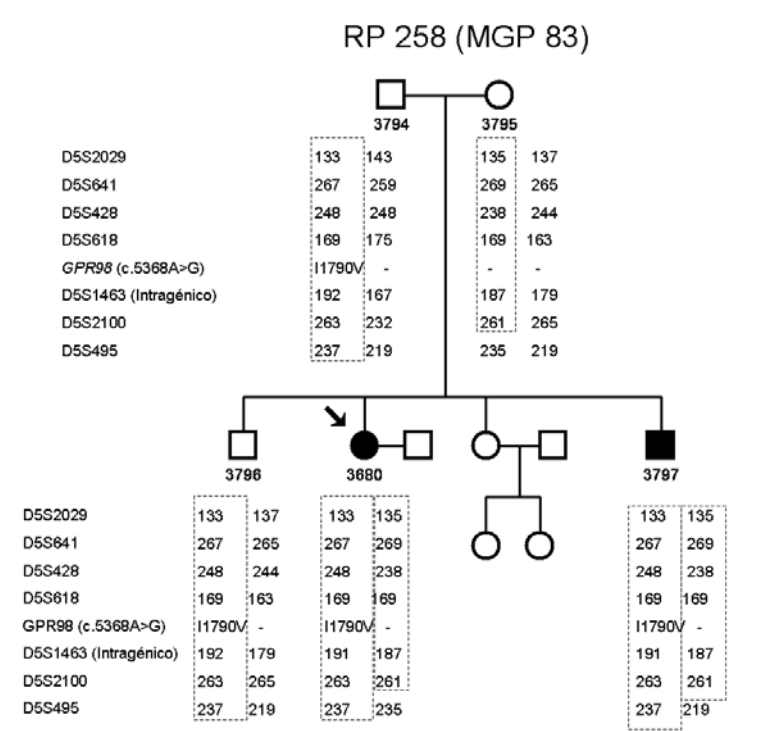


Figura 4.23 – Análisis indirecto de los miembros de la familia RP258 mediante marcadores microsatélites localizados en el cromosoma 5 en la región cercana al gen *GPR98*.
Los recuadros punteados marcan los alelos que segregan con la enfermedad.

4.1.4.3 Mutaciones en genes nuevos de DHR

En una familia (RP 184) se identificó una mutación de significancia desconocida en un gen nuevo nunca antes asociado a ningún tipo de DHR, el gen *PCDHA1*.

La mutación identificada (c.1049T>G; p.L350R) es del tipo sustitución nucleotídica y cosegrega con la enfermedad en todos los miembros de la familia analizados (Figura 4.24). La secuenciación Sanger de 200 individuos control descartó la presencia dicha mutación en dicha cohorte. Además el cambio está ausente en los 141 controles megasecuenciados en la plataforma del proyecto genoma médico y en las bases de datos de variantes 1.000 genomas, 5.000 genomas y Exome Variant Server. Todos estos datos nos darían una frecuencia de alelo minoritario (MAF) $\ll 0,01$ que es compatible con la prevalencia de la RPar.

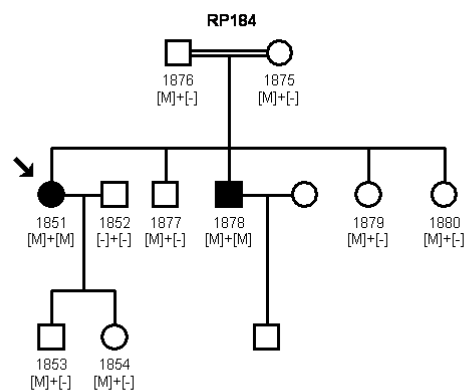


Figura 4.24 – Segregación familiar de la familia RP184.

La mutación [M]: c.1049T>G, p.L350R cosegrega con la enfermedad. Los individuos [M]+[M] son homocigotos para la mutación, los [M]+[-] son heterocigotos y los [-]+[-] presentan el genotipo silvestre.

La proteína codificada es una proteína transmembrana cuyo dominio extracelular está compuesto por 6 ectodominios tipo cadherina. La región variable codifica para los dominios extracelulares y transmembrana, mientras que la región constante codifica para el dominio citoplasmático (Figura 4.25).

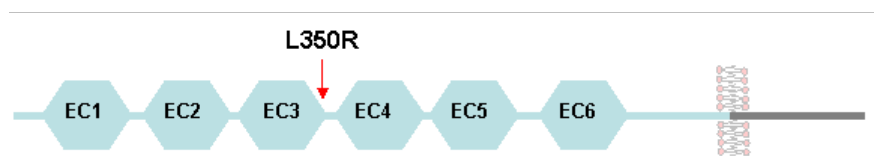


Figura 4.25 – Representación de los dominios proteicos de PCDHA1.

La proteína PCDHA1, como otros miembros del clúster de las α protocadherinas, es una proteína transmembrana constituida por un gran dominio extracelular (en azul) que contiene seis repeticiones de ectodominios tipo cadherina (EC1-6), un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático (en gris). La flecha indica la posición mutada en el dominio EC3.

Las herramientas bioinformáticas predicen que la sustitución del residuo de Leucina por una Arginina en la posición 350 de la proteína es probablemente dañina (Polyphen-v2 score=0,969 y SIFT Score=0). Además dicha variante parece afectar a la

formación de puentes disulfuro entre las cisteínas de la proteína. De los seis puentes disulfuro predichos en la proteína wildtype, únicamente permanecen inalterados dos de ellos en la proteína mutante, el resto de puentes disulfuro se establece entre residuos de cisteína diferentes (Figura 4.26).

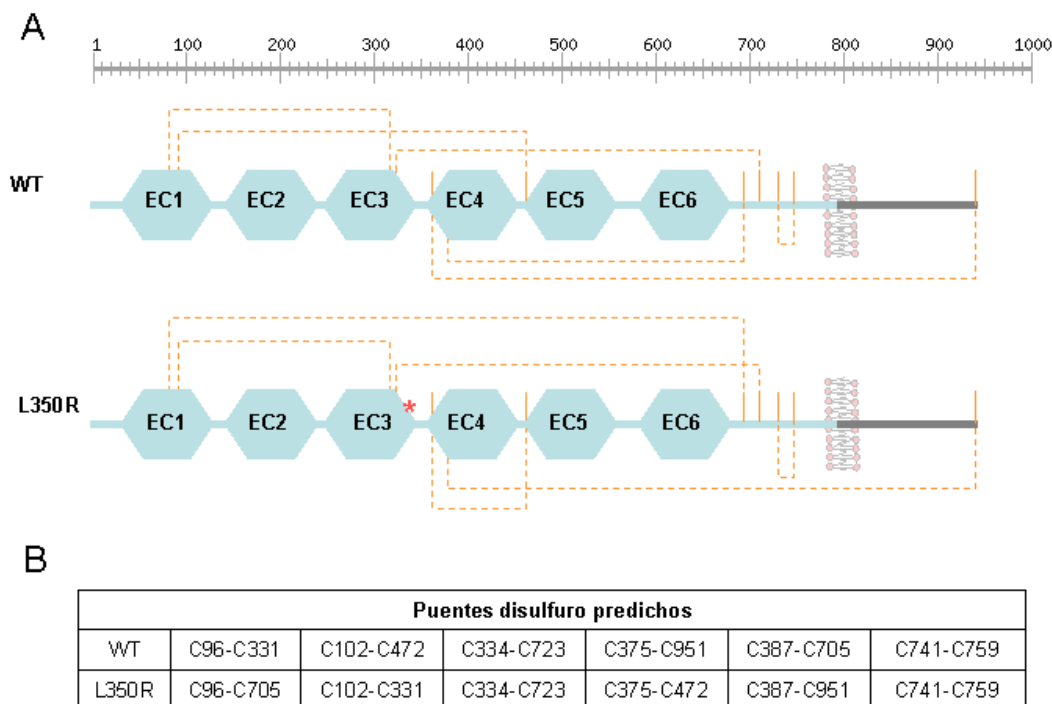


Figura 4.26. Predicción de los puentes disulfuro en la proteína PCDHA.

A. Representación esquemática de la estructura secundaria de la proteína PCDHA1 wildtype (WT) y mutante (L350R). Las líneas punteadas señalan los puentes disulfuro entre los distintos residuos de cisteína. El asterisco indica la posición mutada en el dominio EC3. **B.** Parejas de cisteínas implicadas en la formación de los puentes disulfuro de cada una de las proteínas WT y mutante. Para hacer la predicción de los puentes disulfuro se empleó la herramienta DiANNA disponible en la web <http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>.

4.1.5 Rastreo mutacional del exón I del gen *PCDHA1* en pacientes DHR

Con el objetivo de identificar mutaciones adicionales en otras familias de nuestra cohorte que reforzasen el papel patogénico del gen candidato *PCDHA1*, se procedió a la secuenciación directa del exón 1 en 95 pacientes afectados de distintas DHR. Sin embargo, el rastreo mutacional no permitió la identificación de ninguna mutación adicional en nuestra cohorte.

4.2 CORRELACIONES GENOTIPO-FENOTIPO

Mediante esta estrategia combinada se han logrado diagnosticar genéticamente a 23 familias afectas de DHR, de las cuales 5 presentaban mutaciones en *USH2A*, 4 en *RDH12*, 2 en *CERKL*, y el resto en *ABCA4*, *BBS1*, *C2orf71*, *CNGA1*, *CRB1*, *EYS*, *MERTK*, *MKKS*, *NR2E3*, *RHO*, *RPE65* y *RPGR*. En la Tabla 4.14 se resumen las características clínicas de cada una de las familias caracterizadas molecularmente.

Tabla 4.14 – Características clínicas de las familias genéticamente diagnosticadas.

Familia	Gen	Variante 1	Variante 2	Edad inicio síntomas	Edad de la primera visita	Síntoma Inicial	Síntomas en el momento de la primera consulta	Fondo de ojo	ERG	Diagnóstico clínico preliminar	Manifestaciones extraoculares
RP 19	ABCA4	p.R681*	p.R2030*	4	32	Disminución de la agudeza visual, hemeralopía	Campimetría muy alterada y poco valorable por la disminución de la agudeza visual, hemeralopía	Movilización pigmentaria, palidez papilar		RP con afectación macular precoz	No
RP 368	BBS1	p.M390R	p.M390R	6	12	Hemeralopía	Disminución campo y agudez visual, discromatopsia a los tres ejes	Granulación pigmentaria periférica, arterias estrechadas	Ausencia de respuesta	RPar (antecedentes familiares de RPar)	Polidactilia en ambos pies
RP 255	C2orf71	p.C599R	p.C599R	12	38	Hemeralopía	Hemeralopía, disminución del campo, disminución de la agudeza visual, fotofobia	Movilización pigmentaria, palidez papilar		RPar típica	No

Familia	Gen	Variante 1	Variante 2	Edad inicio síntomas	Edad de la primera visita	Síntoma Inicial	Síntomas en el momento de la primera consulta	Fondo de ojo	ERG	Diagnóstico clínico preliminar	Manifestaciones extraoculares
RP 76	CERKL	p.R257*	p.R257*	17	27	Hemeralopía	Hemeralopía, disminución del campo visual, disminución de la agudeza visual,	Movilización pigmentaria	Ausencia de respuesta	RPar típica	No
RP 206	CERKL	p.R257*	p.R257*	19	47	Hemeralopía	Hemeralopía, disminución del campo, disminución de la agudeza visual			RPar	No
RP 198	CNGA1	p.R28*	p.R28*	3	48	Hemeralopía	Hemeralopía, disminución del campo, disminución de la agudeza visual, fotofobia			RPar	No
RP 29	CRB1	p.C948Y	p.C948Y	1	17	Disminución de la agudeza visual, hemeralopía	Disminución del campo y de la agudeza visual, hemeralopía, fotofobia, estrabismo	Movilización pigmentaria	Ausencia de respuesta	RPar	No

Familia	Gen	Variante 1	Variante 2	Edad inicio síntomas	Edad de la primera visita	Síntoma Inicial	Síntomas en el momento de la primera consulta	Fondo de ojo	ERG	Diagnóstico clínico preliminar	Manifestaciones extraoculares
RP 234	EYS	c.1767-?_2023+?del	p.S658VfsX4	6	38	Hemeralopía	Hemeralopía, disminución del campo, disminución de la agudeza visual, fotofobia			RPar	No
RP 96	MERTK	c.1297-2A>G	c.1297-2A>G	6	41	Hemeralopía	Hemeralopía, disminución del campo y de la agudeza visual	Movilización pigmentaria, palidez papilar	Ausencia de respuesta	RPar	No
RP 42	MKKS	p.D90G	p.V396F	10	12	Hemeralopía	Hemeralopía, disminución del campo visual, disminución de la agudeza visual,	Movilización pigmentaria	Ausencia de respuesta	RPar sospecha de SBB	Polidactilia, riñon poliquístico, torpeza psicomotriz, dificultades de aprendizaje
RP 291	NR2E3	p.R311Q	p.R311Q	2	38	Hemeralopía	Hemeralopía, disminución del campo, disminución de la agudeza visual, cataratas en ambos ojos	Movilización pigmentaria		RPar	No

Familia	Gen	Variante 1	Variante 2	Edad inicio síntomas	Edad de la primera visita	Síntoma Inicial	Síntomas en el momento de la primera consulta	Fondo de ojo	ERG	Diagnóstico clínico preliminar	Manifestaciones extraoculares
RP 99	RDH12	p.A269Gfs*2	p.A269Gfs*2	7	35	Disminución de la agudeza visual	Disminución de la agudeza visual, disminución del campo visual, hemeralopía,		Ausencia de respuesta	RP no típica	No
RP 92	RDH12	p.L99I	p.L99I	7	38	Disminución del campo visual	Disminución de la agudeza visual, pérdida del 95% del campo visual,	Fondo de ojo severamente afectado		RPar	Pérdida de audición a los 25 años
RP 348	RDH12	p.L99I	p.L99I	2	18	Disminución del campo visual	Disminución del campo y de la agudeza visual,	Movilización pigmentaria	Ausencia de respuesta	RPar	No
RP 66	RDH12	p.R295*	p.R295*	1	28	Disminución de la agudeza visual	Disminución de la agudeza visual, hemeralopía, disminución del campo visual, Fotofobia, cataratas	Movilización pigmentaria, palidez papilar		RP con afectación macular precoz	No

Familia	Gen	Variante 1	Variante 2	Edad inicio síntomas	Edad de la primera visita	Síntoma Inicial	Síntomas en el momento de la primera consulta	Fondo de ojo	ERG	Diagnóstico clínico preliminar	Manifestaciones extraoculares
RP 322	RHO	p.T342M	p.T342M	14	23	Hemeralopía	Hemeralopía, disminución del campo, miopía	Movilización pigmentaria		RPar	No
VRP 4	RPE65	c.95-2A>T	c.95-2A>T	3		Hemeralopía				RPar	No
RP 15	RPGR	p.E802Gfs*31	Hemizigosis	5	29	Hemeralopía	Hemeralopía, disminución del campo visual, disminución de la agudeza visual, nistagmus	Movilización pigmentaria		RPLX	No
RP 112	USH2A	p.C759F	c.18412A>G	12	40	Hemeralopía	Hemeralopía, disminución del campo visual, disminución de la agudeza visual.	Movilización pigmentaria		RPar	No
RP 3	USH2A	p.C759F	p.T3571M	15	43	Hemeralopía	Hemeralopía, disminución del campo visual, disminución de la agudeza visual	Movilización pigmentaria		RPar	No

Familia	Gen	Variante 1	Variante 2	Edad inicio síntomas	Edad de la primera visita	Síntoma Inicial	Síntomas en el momento de la primera consulta	Fondo de ojo	ERG	Diagnóstico clínico preliminar	Manifestaciones extraoculares
RP 351	USH2A	p.C759F	p.E767Sfs*21	25	39	Hemeralopía	Hemeralopía, disminución del campo y de la agudeza visual, catarata en ojo derecho			RPar	No
RP 429	USH2A	p.F1442S	p.L5063R	41	52	Hemeralopía	Hemeralopía, disminución del campo visual, disminución de la agudeza visual, cataratas en ambos ojos	Movilización pigmentaria, palidez papilar, vasos estrechados, preservación de la mácula		RPar	No
RP 159	USH2A	p.H610P	p.C759F	31	40	Hemeralopía	Hemeralopía, disminución del campo, disminución de la agudeza visual, fotofobia, discromatopsia	Palidez papilar, estrechamiento vascular, atigrado, movilización pigmentaria		RPar típica	No

4.3 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN

4.3.1 Cuantificación de la expresión en ADNc de retina humana del gen *PCDHA1* mediante tecnología taqman

Con el objeto de investigar los niveles de expresión en retina de nuestro gen candidato, *PCDHA1*, se realizó un ensayo de PCR a tiempo real usando la tecnología Taqman® Gene Expression Assays. Para ello, se usó ADNc de retina humana y se comparó con el ADNc de cerebro, donde la expresión de *Pcdha1* está ampliamente documentada [Noguchi y cols., 2009, Hirayama y cols., 2006, Hirayama y cols., 2012].

De esta forma, pudimos comprobar que los niveles de expresión de *Pcdha1* en retina humana son muy bajos ($Ct=34,72$) e inferiores a los observados en cerebro (Figura 4.27).

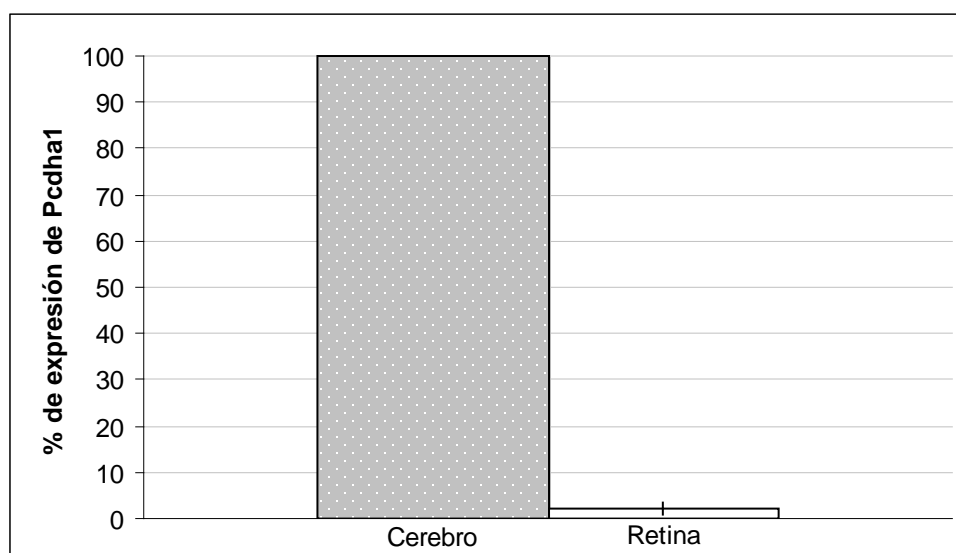


Figura 4.27 – Porcentaje de expresión de *Pcdha1* en ADNc de cerebro y de retina humanos.

5 DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta tesis ha sido la búsqueda de la causa genética responsable del fenotipo en una cohorte de 109 familias españolas que habían recibido un diagnóstico clínico inicial de RPar. A continuación, se discuten los resultados obtenidos y se hace una comparativa entre las distintas técnicas utilizadas, así como el análisis del espectro mutacional de los genes responsables de la enfermedad en nuestra cohorte.

5.1 CAPACIDAD DIAGNÓSTICA DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS

5.1.1 Micromatriz de genotipado específica para RPar

El empleo de micromatrices de genotipado específicas de RPar ha mostrado ser eficaz en la obtención de un diagnóstico genético en el 10,6% de las familias incluidas en el estudio (11 de 104) (Figura 4.1). De éstas, 7 presentaron un cambio en homocigosis y 4 presentaron dos variantes heterocigotas en alelos distintos de un mismo gen (heterocigosis compuesta).

De las 7 familias con mutaciones homocigotas, 4 presentaban mutaciones en el gen *RDH12* (Familias RP 348, RP 92, RP 99 y RP 66), una en el gen *NR2E3* (Familia RP 291), una en el gen *CNGA1* (RP 198) y otra en el gen *RPE65* (Familia VRP4). De las 4 familias con dos cambios en heterocigosis compuesta, todas ellas presentaban mutaciones en el gen *USH2A* (RP159, RP351, RP3 y RP112).

Nuestros resultados son coherentes con los encontrados por otros investigadores que, utilizando esta misma estrategia, obtuvieron un porcentaje de diagnóstico genético del 11% en población española [Avila-Fernandez y cols., 2010].

No obstante, también hay que tener en cuenta que el diseño de estas micromatrices está sometido a actualizaciones periódicas con el objetivo de incrementar el número de mutaciones a analizar. En el momento del estudio de nuestra cohorte, la micromatriz específica de RPar permitía testar 584 variantes. En el momento de la escritura de la presente tesis, el panel de mutaciones de Asper Biotech permitía el genotipado de 710 mutaciones asociadas a RPar [<http://www.AsperBiotech.com/asper-ophthalmics/autosomal-recessive-retinitis-pigmentosa-ar-rp/apex-based-test-details>], incrementando así el rendimiento de estas micromatrices.

Un aspecto a tener en cuenta es que no todas las variantes genotipadas son mutaciones patogénicas, de hecho, los cambios reportados en 10 de las familias analizadas eran SNPs no relacionados con RPar en estos pacientes.

En dos familias, el genotipo estaba mal anotado, ya que según Asper Biotech las mutaciones eran homocigotas. Sin embargo, la secuenciación Sanger de estas variantes

en nuestro laboratorio demostró que se trataba de cambios heterocigotos, por lo que se puede estimar una tasa del 1,8% de falsos positivos.

Como ya se ha comentado, la principal limitación de estas matrices es la imposibilidad de identificar mutaciones nuevas. Teniendo en cuenta que un gran porcentaje de las mutaciones responsables de RP son privadas y la frecuencia de mutaciones recurrentes es generalmente baja, es importante el uso de una técnica que permita la identificación de cambios no reportados con anterioridad.

Otro inconveniente es que se han diseñado para cada uno de los fenotipos (RP, ACL, USH, etc) y tipos de herencia (ar, ad y LX), por lo que un diagnóstico clínico no certero disminuye las probabilidades de éxito de esta estrategia.

A pesar de estas limitaciones, es una buena técnica para el cribado de nuestra cohorte, ya que por una parte permite el diagnóstico genético de un porcentaje (11% en RPar) significativo de pacientes con una relación tiempo-coste asequible y por otra, permite la selección de familias susceptibles de ser estudiadas por otras técnicas más costosas que permiten la identificación de nuevas mutaciones o genes.

5.1.2 Micromatriz de resecuenciación de diseño personalizado

El cribado de nuestra cohorte mediante el empleo de micromatrices de resecuenciación permitió la caracterización molecular completa del 5,1% (5 de 98) del total de las familias estudiadas y la identificación de un alelo mutado en el 9,2% (9 de 98) de las familias [Gonzalez-Del Pozo y cols., 2011]. Las cinco familias RPar caracterizadas mediante la micromatriz de diseño personalizado presentaban mutaciones en homocigosis en los genes *CERKL*, *CRBI*, *RHO* y *MERTK*.

El diagnóstico molecular de RP supone un reto debido a la gran heterogeneidad genética de esta enfermedad. Por tanto, es necesario un método de rastreo validado que permita la detección simultánea en numerosos genes en una única plataforma de alto rendimiento. La tecnología de las matrices de resecuenciación constituye un método rápido para la detección de mutaciones en enfermedades genéticamente muy heterogéneas como la RPar. La implementación de esta tecnología que permite analizar con detalle la secuencia nucleotídica de un gran número genes, presenta ciertas ventajas en comparación con otras técnicas disponibles actualmente. En primer lugar, las matrices de resecuenciación son de 5 a 10 veces más baratas que la secuenciación tradicional (Sanger) [Booij y cols., 2011] y aunque las matrices basadas en la tecnología APEX (Asper Biotech) son más baratas, los chips de resecuenciación aportan la gran ventaja de poder detectar variantes nuevas.

A pesar de que el rastreo mutacional de pacientes RPar mediante estas micromatrices de resecuenciación ha sido ya descrito [Booij y cols., 2011, Simpson y

cols., 2011, Clark y cols., 2010], la empleada por nosotros ofrece por primera vez la posibilidad de rastrear el gen *EYS*. Son numerosos los artículos que coinciden en que el gen *EYS* es uno de los de mayor prevalencia mundial en RPar [Abd El-Aziz y cols., 2008b, Barragan y cols., 2010, Audo y cols., 2010, Abd El-Aziz y cols., 2010, Huang y cols., 2010, Littink y cols., 2010b, Bandah-Rozenfeld y cols., 2010, Pieras y cols., 2011, Hosono y cols., 2012, Iwanami y cols., 2012]. En población española *EYS* es responsable del 15,9% de los casos de RPar [Barragan y cols., 2010]

La eficacia del método de las micromatrices de resecuenciación para detectar distintos tipos de mutaciones se comprobó incluyendo en el estudio 4 controles positivos con mutaciones previamente descritas por nuestro grupo de investigación. De los cuatro controles positivos fueron detectados correctamente tres de ellos, correspondientes a tres sustituciones nucleotídicas. El cambio que no pudo ser detectado corresponde a una inserción de dos pares de bases en el exón 4 del gen *EYS*, c.78-79insGC descrito en la familia RP 60 [Barragan y cols., 2010]. Aunque ya había sido descrita la dificultad de la técnica para detectar cambios del tipo inserciones y deleciones en heterocigosis [Mandal y cols., 2005, Kothiyal y cols., 2010] quisimos comprobarlo en nuestro propio diseño. Estas limitaciones pueden ser en parte solventadas con mejoras en el diseño de la matriz como la inclusión de sondas específicas de deleciones e inserciones [Karaman y cols., 2005, Liu y cols., 2007a, Kothiyal y cols., 2010], aunque esto únicamente permitiría la detección de cambios conocidos. Es por tanto conveniente actualizar periódicamente el diseño de las micromatrices conforme se vayan identificando nuevas inserciones y deleciones en los genes incluidos en el chip.

La detección de mutaciones tanto nuevas como conocidas en la micromatriz de diseño propio establece que la resecuenciación basada en matrices de ADN es una herramienta rápida y eficaz. Su incorporación con éxito al arsenal diagnóstico de la RPar ha quedado claramente justificada por los resultados obtenidos en el presente trabajo. La gran cantidad de datos generados es, sin duda, una fuente muy valiosa de conocimiento, no solo para el establecimiento de correlaciones genotipo-fenotipo, sino también para la mejor comprensión de la etiología y patogénesis de la enfermedad, permitiendo, en última instancia, un mejor manejo de los pacientes y sus familiares.

5.1.3 Multiplex-Ligation Probe Amplification (MLPA) del gen *EYS*

Debido a la alta prevalencia de los *CNVs* descritos recientemente en el gen *EYS* en familias españolas [Pieras y cols., 2011], decidimos aplicar la técnica del MLPA en aquellas familias RPar en las que se había identificado una mutación heterocigota en *EYS* mediante la micromatriz de resecuenciación. A pesar del limitado número de

familias analizadas (4 familias) por MLPA, los resultados obtenidos fueron muy interesantes y permitieron la caracterización molecular de 1 familia (RP 234).

Los valores de dosis obtenidos en el MLPA del paciente índice de la familia RP 234 (0% de dosis para el exón 12 y 50% de dosis para el intron 12) nos hizo plantearnos qué mutaciones podrían estar presentes. Los resultados obtenidos fueron compatibles con una doble mutación: por un lado la delección en heterocigosis que implicaba la pérdida de todo el exón 12-intron 12 (*c.1767-?_2023+?del*) y por otro, un defecto que impide la correcta hibridación de la sonda de MLPA correspondiente al exón 12. La subsiguiente secuenciación Sanger del exón 12, demostró la presencia de una delección de 1 pb (*c.1971delT*) en aparente homocigosis aunque en realidad se trata de una hemicigosis ya que el otro alelo se encuentra delecionado justo en esta región. Esto explica los porcentajes de dosis obtenidos para el exón 12 y el intron 12 del gen *EYS* en esta muestra.

La identificación de estos eventos patogénicos independientes sugiere que el MLPA es capaz de detectar de manera indirecta delecciones cortas de 1pb siempre que éstas se localicen en la región de hibridación de la sonda.

5.1.4 Secuenciación del exoma completo en familias RPar

El abordaje basado en la secuenciación del exoma completo permitió el diagnóstico genético del 85,7% (6 de 7) del total de familias analizadas. Además, de la identificación de un alelo mutado en la familia restante.

En 3 de las familias analizadas (RP 429, RP 19 y RP 255) la secuenciación del exoma completo permitió la detección de variantes en genes asociados previamente a la patogénesis de la RPar, concretamente en *USH2A* [Mendez-Vidal y cols., 2013], *ABCA4* y *C2ORF71*. En 4 de las familias analizadas (RP 15, RP 368, RP 42 y RP 258), se detectaron mutaciones en genes no típicos de RPar, concretamente: *RPGR*, *BBS1*, *MKKS* y *GPR98*.

Las estrategias diagnósticas utilizadas hasta la fecha estaban enfocadas en el rastreo de un número limitado de genes por cada fenotipo y tipo de herencia. Sin embargo, estas técnicas pueden fallar a la hora de obtener la caracterización genética por las razones que se desglosan a continuación.

En primer lugar, el diagnóstico clínico en muchas ocasiones no es preciso ya que es muy difícil asignar un diagnóstico clínico específico tanto en pacientes jóvenes como mayores. Cuando los pacientes son jóvenes es posible que no hayan manifestado síntomas extraoculares que se presentan a edades más avanzadas, tal es el caso de las familias RP 368 y RP 42 con mutaciones en *BBS1* y *MKKS* respectivamente. En ambas familias, el primer motivo de consulta fue la RP y el resto de manifestaciones

extraoculares fueron pasadas por alto hasta el hallazgo de mutaciones en genes sindrómicos. En pacientes mayores también es muy difícil el diagnóstico clínico ya que las distrofias de bastones y conos (RP) y las distrofias de conos y bastones (DCB) convergen en un final común en el cual ambos tipos de fotorreceptores se encuentran igualmente afectados, como ocurre en la familia RP 19 con mutaciones en el gen *ABCA4*.

En segundo lugar, la información disponible en la historia clínica muchas veces no permite asignar un patrón de herencia o si se asigna, éste puede ser erróneo. Se ha visto, que un porcentaje significativo de casos esporádicos ha resultado ser portador de mutaciones en genes asociados a RPLX [Branham y cols., 2012]. Tal es el caso de la familia RP 15 que mostró una mutación en el gen *RPGR* localizado en el cromosoma X.

Otra ventaja de analizar el exoma completo de manera simultánea es la posibilidad única de investigar la implicación de genes no asociados previamente al fenotipo, como es el caso de las familias RP 258 y RP 184. Los individuos afectados de la familia RP 258 portan una mutación en el gen *GPR98*, descrito hasta ahora como gen causal de USH-2. En la familia RP 184 fue identificada una variante predicha como patogénica en el gen de la protocadherina *PCDHA1*. Dicho gen nunca ha sido asociado a la aparición de ningún fenotipo. Por tanto, de confirmarse estos resultados, podríamos estar ante la identificación de dos nuevos genes candidatos de RPar.

Además, la NGS hace posible investigar el papel de mutaciones en otros *loci* secundarios que pueden estar modulando la expresión fenotípica de las DHR. Algunos estudios sugieren que tales interacciones pueden contribuir a un modo de herencia oligogénica, el cual desafía el concepto de DHR como enfermedades estrictamente mendelianas. La secuenciación de exomas nos ha permitido evaluar la presencia de alelos patogénicos en otros genes en las familias RPar y SBB analizadas. Estos estudios permitieron identificar la presencia de una variante que podría estar actuando como un modificador de la penetrancia en una familia afecta de SBB. Nuestro estudio respalda la hipótesis de que las interacciones epistáticas intervienen en la expresión clínica del SBB.

El hecho de poder secuenciar todos los genes en un experimento único permite una aproximación más global, libre de hipótesis prefijadas. Por tanto, la secuenciación de exomas ha logrado mejorar el rendimiento del diagnóstico genético en las enfermedades de retina, ya que es capaz de alcanzar un diagnóstico genético con independencia del diagnóstico clínico asignado y del patrón de herencia asumido.

5.2 ESPECTRO DE GENES Y MUTACIONES CAUSALES EN NUESTRA COHORTE DE PACIENTES.

5.2.1 Mutaciones en genes asociados al fenotipo en estudio. Correlaciones Genotipo-Fenotipo.

5.2.1.1 Mutaciones en *ABCA4*

La secuenciación del exoma de la familia RP 19 permitió la identificación de dos mutaciones en heterocigosis compuesta (c.2041C>T; p.R681* y c.6088C>T; p.R2030*) en el gen *ABCA4* como causa de su enfermedad.

La mutación p.R681* fue identificada por primera vez por Maugeri y cols. [1999] y la p.R2030* por Lewis y cols. [1999]. Ambas mutaciones fueron descritas en pacientes clínicamente diagnosticados de otra entidad clínica diferente como es la distrofia macular de Stargardt (STGD).

El paciente índice, que fue diagnosticado provisionalmente de RP con afectación macular precoz, acudió por primera vez a la consulta de genética a los 38 años cuando la enfermedad se encontraba en un estadio bastante avanzado. El inicio de los síntomas durante la primera década de vida, y la disminución de la agudeza visual podrían asemejarse más a un fenotipo de DCB. Los resultados de la campimetría no fueron valorables dada la acusada disminución en la agudeza visual. Esto estaría apoyado por un estudio reciente en población española en el que se cuestiona el papel del gen *ABCA4* en la RPar [Riveiro-Alvarez y cols., 2013]. En determinadas circunstancias es difícil distinguir clínicamente ambos fenotipos y es probable que muchos de los casos diagnosticados clínicamente de RP con mutaciones en *ABCA4* sean en realidad afectos de DCB en estadios avanzados de la enfermedad.

Con respecto a las mutaciones, ambas conducen a un codón de terminación prematuro y probablemente a transcritos captados y degradados por el mecanismo de NMD. Los resultados obtenidos en el presente trabajo son compatibles con el modelo genotipo-fenotipo propuesto por Shroyer y cols. [1999] mediante el cual la actividad de la proteína ABCR es inversamente proporcional a la severidad de la patología. Según esto, las mutaciones que causan pérdida de parte de la proteína o una severa alteración de su estructura originan patologías de inicio temprano que cursan con una rápida pérdida de fotorreceptores (DCB, RP). Mientras que la combinación de mutaciones no nulas, ocasionaría la lenta y progresiva degeneración de los fotorreceptores secundaria a la acumulación de productos tóxicos por la menor actividad flipasa de ABCR. En este caso, los fenotipos serían relativamente menos severos (STGD y FFM).

5.2.1.2 Mutaciones en *BBS1*

En la familia RP 368 se detectó una mutación homocigota en el gen *BBS1* (c.1169T>C; p.M390R). Se trata de una mutación conocida que causa el 80% de los casos de síndrome de Bardet-Biedl (SBB) en los que está implicado el gen *BBS1* [Mykytyn y cols., 2003].

Recientemente se ha publicado que esta mutación es responsable de la aparición de un amplio espectro de fenotipos que van desde RP no sindrómica al SBB [Estrada-Cuzcano y cols., 2012a].

La paciente índice tenía una historia familiar previa de RPar (dos tías abuelas y una tía segunda) y por ello fue clínicamente diagnosticada de esa patología. Sin embargo, la reevaluación de la historia clínica reveló que la paciente había sido intervenida de polidactilia postaxial en ambos pies a los dos años de vida. Como se ha comentado anteriormente, para recibir un diagnóstico de SBB es necesaria la presencia de 4 signos primarios o al menos, 3 primarios y 2 secundarios [Beales y cols., 1999, Putoux y cols., 2012]. Nuestra paciente con dos signos primarios no cumple estrictamente los criterios clínicos de SBB aunque tampoco puede considerarse que padezca RP no sindrómica.

La reevaluación clínica del resto de individuos afectos del pedigree confirmó el diagnóstico de RP no sindrómica. Además, en estos tres pacientes no segrega la variante en *BBS1* (Figura 4.19). Todo esto apunta a que se trata de dos fenotipos distintos con causas genéticas también distintas. Son necesarios estudios adicionales para identificar la mutación responsable de la RP no sindrómica en el resto de familiares.

5.2.1.3 Mutaciones en *C2ORF71*

La secuenciación del exoma de la familia RP 255 dio como resultado la identificación de una mutación homocigota (c. 1975T>C; p.C599R) en el gen *C2orf71*.

Los estudios bioinformáticos predijeron que se trata de una mutación probablemente dañina (Polyphen score=0,979) que afecta a una región evolutivamente muy conservada de la proteína. Las mutaciones que afectan a residuos de cisteína suelen ser deletéreas para la proteína, ya que estos residuos se encuentran formando puentes disulfuro que condicionan la estructura tridimensional de la proteína y su correcto funcionamiento. Los resultados de la segregación familiar y la ausencia en 200 controles refuerzan la patogenicidad de esta variante.

La mutación identificada (p.C599R), aunque está descrita con anterioridad (rs377190272) es una variante rara y nunca antes ha sido asociada a la RP. La presencia de la mutación p.C599R en una base de datos de exomas (Exome Variant Server) no

disminuye las probabilidades de que esta variante no sea patogénica, ya que únicamente se ha identificado un heterocigoto entre los 6.304 exomas secuenciados, siendo éste probablemente un portador asintomático. La naturaleza polimórfica del gen *C2orf71* ha sido previamente documentado [Sergouniotis y cols., 2011]. Además, teniendo en cuenta la alta prevalencia de portadores de mutaciones nulas en genes de RP entre la población control [Nishiguchi y Rivolta, 2012], y el gran número de experimentos en los que se reportan variantes identificadas mediante secuenciación de exomas, identificar mutaciones realmente nuevas es una tarea cada vez más difícil.

Mutaciones en *C2orf71* se han asociado a RPar [Nishimura y cols., 2010]. La familia RP 255 presenta las características de la RP típica: ceguera nocturna como primer síntoma, debut de la enfermedad a los 12 años de vida, disminución progresiva del campo visual periférico y disminución de la agudeza visual entre la tercera y la cuarta década de vida. El fondo de ojo era el típico de la RP con movilización pigmentaria y palidez papilar. Los signos y síntomas oftalmológicos observados en esta familia coinciden con lo descrito en estudios anteriores para variantes con pérdida de sentido (Ej. p.I201F) responsable de un fenotipo de RP típica [Nishimura y cols., 2010]. El diagnóstico genético ha permitido, por tanto, confirmar el diagnóstico clínico de RPar en esta familia.

5.2.1.4 Mutaciones en *CERKL*

En dos de las familias analizadas (RP 76 y RP 206) se identificó la mutación patogénica en homocigosis c.769C>T; p.R257* en el gen *CERKL*. Se trata de una mutación conocida publicada por Avila-Fernandez y cols. [2008].

Mutaciones en *CERKL* son la causa de la RP tipo 26 (RP26) (MIM 608380) de herencia autosómica recesiva [Tuson y cols., 2004] y de DCB [Aleman y cols., 2009]. Las dos familias con mutaciones en *CERKL* refieren ceguera nocturna como primer síntoma y edades de inicio parecidas (17 y 19 años). La evolución de la enfermedad es también similar en ambos casos y compatible con el diagnóstico clínico de RPar.

La gran heterogeneidad genética de la RP hace que la mayoría de los genes presenten cientos de alelos responsables de la enfermedad, sin embargo, en determinadas ocasiones alguno de estos alelos es predominante y las mutaciones son recurrentes. Un ejemplo es el alelo deletéreo c.769C>T de *CERKL*, que causa una proporción substancial de casos de RPar y de RP esporádico en España [Avila-Fernandez y cols., 2008, Avila-Fernandez y cols., 2010]. Esta mutación sin sentido conduce a un codón de terminación prematuro y probablemente a la captación y degradación del transcrito por el mecanismo de NMD. Esto conlleva la pérdida de la proteína *CERKL* y la aparición del fenotipo en estas familias.

5.2.1.5 Mutaciones en *CNGA1*

La familia RP 198 fue caracterizada molecularmente mediante la identificación de la mutación homocigota en el gen *CNGA1* (c.301C>T; p.R101*). La mutación conduce a un codón de parada prematuro originando un ARNm de menor tamaño que será probablemente captado y degradado por los mecanismos NMD.

Mutaciones en *CNGA1* se han asociado, principalmente, a fenotipos de inicio precoz [Paloma y cols., 2002, Zhang y cols., 2004]. Tal es el caso de la familia RP 198, cuyo paciente índice reportó ceguera nocturna desde los 3 años de vida, seguido de disminución progresiva y concéntrica del campo visual, disminución de la agudeza visual y fotofobia. La mutación identificada había sido previamente descrita en una familia española afecta de RPar por Paloma y cols. [2002]. El diagnóstico genético ha permitido confirmar el diagnóstico clínico de RPar juvenil en esta familia.

5.2.1.6 Mutaciones en *CRB1*

En los individuos afectados de la familia RP 29, se identificó la mutación en *CRB1* c.2843G>A; p.C948Y en homocigosis.

Se trata de una mutación patogénica ya descrita en una familia RPar [Den Hollander y cols., 1999]. La misma mutación ha sido también asociada a un fenotipo algo distinto al de RPar, como es la ACL tipo 8 (MIM 613835) [Lotery y cols., 2001]. La mutación c.2843G>A conduce a una sustitución de un residuo de cisteína por uno de tirosina en la posición 948 de la proteína. Es probable que la alteración de la estructura tridimensional de *CRB1*, condicionada por la formación de puentes di-sulfuro entre cisteínas, sea la responsable del fenotipo en esta familia.

Como se ha comentado anteriormente, mutaciones en *CRB1* se han asociado a varias distrofias de retina como la RPar [Den Hollander y cols., 1999], la ACL [Den Hollander y cols., 2001a, Lotery y cols., 2001], la RP con vasculopatía exudativa tipo Coats [Den Hollander y cols., 2001a], la RP con preservación del epitelio pararteriolar (PPRPE), y la atrofia coriorretinal paravenosa pigmentada (PPCRA) [Mckay y cols., 2005].

La familia RP 29 fue clasificada inicialmente como RPar. Sin embargo, la revisión de la historia clínica de los pacientes podría apuntar que los individuos afectados presentan un fenotipo juvenil con afectación generalizada de bastones y conos, reflejado por la disminución de la agudeza visual y hemeralopia como primeros síntomas al año de vida. Esto sumado a la ausencia de respuesta en el ERG y la rápida progresión de la enfermedad, podría apuntar hacia un fenotipo de ACL.

Se ha postulado que las mutaciones nulas en ambos alelos (ej. p.K801* en homocigosis) dan lugar a la aparición del fenotipo ACL, mientras que las mutaciones

con pérdida de sentido o que afectan a sitios de *splicing* dan lugar a RP y PPRPE y RP con Coats. No obstante, es bastante probable que el grado de funcionalidad que conserva la proteína *CRB1* mutada y la severidad de la enfermedad estén influenciados por el bagaje genético del individuo [Den Hollander y cols., 2004].

5.2.1.7 Mutaciones en *EYS*

En la familia RP 234 fueron identificadas dos mutaciones patogénicas en el gen *EYS* mediante MLPA y secuenciación directa del exón 12 (*c.1971delT* y *c.1767-?_2023+?del*).

Además, en esta misma familia se había detectado otra variante en *EYS* por resecuenciación (*c.3695T>C*; *p.I1232T*) que no estaba presente en controles y afectaba a un residuo evolutivamente muy conservado. Posiblemente podría tratarse de una variante de significancia desconocida (*VUS, Variant of unknown significance*). No obstante, estos datos deben ser interpretados con gran cautela siendo necesario un estudio pormenorizado en el resto familiares con el fin de determinar si se trata de una variante patogénica, modificadora del fenotipo o simplemente polimórfica.

Las variantes en el gen *EYS c.1971delT* y *c.1767-?_2023+?del* también han sido previamente detectadas en familias tanto españolas como francesas no relacionadas [Audo y cols., 2010, Pieras y cols., 2011]. Por tanto, el análisis de estos haplotipos podría ser valorado para determinar el origen de estas mutaciones. La identificación de mutaciones recurrentes en población caucásica y, más concretamente, en población española es de gran utilidad para el diagnóstico molecular de enfermedades tan heterogéneas como la RPar.

La clínica de estos pacientes responde a un fenotipo de RP típico con hemeralopia como síntoma inicial, pérdida progresiva del campo visual periférico y cierto grado de fotofobia. Tanto la edad de inicio como el resto de síntomas y signos oftalmológicos detectados en la familia coinciden con lo descrito en estudios anteriores para dichas mutaciones [Pieras y cols., 2011, Barragan y cols., 2010].

5.2.1.8 Mutaciones en *MERTK*

El análisis mediante micromatrices de resecuenciación permitió la identificación de la mutación homocigota en *MERTK (c.1297-2A>G)* en el paciente índice de la familia RP 96.

Esta mutación ya ha sido previamente asociada a RPar y consiste en la sustitución A>G en la posición consenso (-2) del sitio de *splicing* aceptor del exón 10 [Gal y cols., 2000]. Se ha demostrado que mutaciones en regiones consenso para la maquinaria de *splicing* del ARNm pueden alterar la función de la proteína, bien por la

omisión de un exón, o bien por el uso de un sitio de *splicing* críptico provocando la inclusión de un pseudoexón [Takahara y cols., 2002].

Mutaciones en el gen *MERTK* se han asociado a RPar. El fenotipo descrito en la familia RP 96, con ceguera nocturna como primer síntoma a los 6 años de edad, fondo de ojo típico de RP, disminución progresiva del campo visual periférico y disminución de la agudeza visual a los 41 años de edad, se asemeja al descrito para la misma mutación en el artículo de Gal y cols. [2000] y es compatible con el diagnóstico de RPar.

5.2.1.9 Mutaciones en *MKKS*

En el paciente índice de la familia RP 42 se detectaron dos mutaciones heterocigotas (*p.D90G* y *p.V396F*) en el gen *MKKS* (*BBS6*).

Mutaciones en *MKKS* se han asociado con dos fenotipos clínicamente solapantes al inicio como son el síndrome de McKusick-Kaufman (*MKKS*; MIM 236700) y el síndrome de Bardet-Biedl tipo 6 (*SBB6*) (MIM 209900).

Las dos mutaciones reportadas en la familia RP 42 son nuevas y nunca antes han sido asociadas a ningún fenotipo [Gonzalez-Del Pozo y cols., 2014]. La mutación *D90G* afecta a la región más conservada entre las chaperonas de los grupos I y II, el dominio ecuatorial. Este dominio es responsable de llevar a cabo la hidrólisis del ATP y la sustitución de un aminoácido por otro podría alterar esta función. La mutación *V396F* cae en el dominio intermedio que conecta los dominios ecuatorial y apical mediante ejes flexibles [Stone y cols., 2000]. Los análisis bioinformáticos predijeron la patogenicidad de ambas mutaciones. Las dos variantes cosegregaban con la enfermedad en el resto de miembros familiares analizados (Figura 4.21) y ninguna de ellas fue identificada en 200 individuos control.

La reevaluación clínica de los individuos afectados mostró signos típicos de *SBB* como afectación retiniana en forma de RP, polidactilia postaxial y dificultades de aprendizaje. No obstante, se trata de una familia que exhibe notables diferencias fenotípicas entre los tres hermanos afectados (Tabla 4.9). El individuo II:4 (Figura 4.21) es el que presenta el fenotipo más severo. La poliquistosis renal que manifiesta desde edad muy temprana (6a) le ha llevado incluso a tener que ser transplantado, mientras que ninguno de los otros dos hermanos afectados (II:2 y II:5) presentan indicios de afectación renal. Además, el individuo II:4 presentó una adquisición tardía de la deambulación, a los 22 meses, y actualmente manifiesta cierta torpeza psicomotriz.

Las diferencias clínicas encontradas entre miembros de la misma familia pueden ser explicadas, en parte, por la presencia de otras mutaciones en *loci* distintos que interactúan para modular la expresión y/o gravedad del fenotipo. En el caso de

SBB, además del gran número de genes implicados, la herencia oligogénica está bien documentada añadiendo una capa de complejidad a la caracterización genética de estos pacientes [Katsanis, 2004, Badano y cols., 2006a, Zaghoul y cols., 2010].

Una ventaja de analizar simultáneamente el exoma completo de un individuo es la posibilidad única de determinar el papel de otras mutaciones en *loci* secundarios que puedan estar ejerciendo un efecto epistático sobre el fenotipo SBB [Katsanis, 2004, Hjortshoj y cols., 2010, Beales y cols., 2003, Badano y cols., 2003]. Por ello, los datos obtenidos de la secuenciación del exoma fueron reanalizados. El estudio permitió la identificación de una variante novel heterocigota, localizada en el intrón 8-9 del gen de la nefrocistina 4 (*NPHP4*), que parece activar un nuevo sitio de *splicing* aceptor. Es probable que dicha activación cause la introducción de un codón de parada prematuro y la reducción de los niveles de ARNm de *NPHP4*. La presencia de dicha mutación únicamente en el paciente con el fenotipo más severo (II:4) y la ausencia de la variante en individuos control parece indicar su papel en la patogénesis del SBB.

NPHP4 es una proteína ciliar que pertenece a un complejo multifuncional y co-localiza con *RPGRIP1*, *RPGR* y el antígeno-8. El antígeno-8, serológicamente definido en cáncer de colon (*SDCCAG8*), es una proteína que forma parte del interactoma de *RPGRIP1* y está implicada también en ciliopatías con afectación retina-riñón [Won y cols., 2011, Roepman y cols., 2005, Patil y cols., 2012]. Mutaciones en *NPHP4* se han asociado a la aparición de dos de estas ciliopatías como la NPH (MIM 606966) [Mollet y cols., 2002, Hoefele y cols., 2004] y el SLS (MIM 606996) [Schuermann y cols., 2002, Otto y cols., 2002].

Se han descrito algunas variantes que pueden afectar a sitios de *splicing* e influir o modular la expresión clínica de enfermedades pleiotrópicas como las ciliopatías. Un ejemplo es el alelo C430T de *MGC1203* que favorece la utilización de un sitio de *splicing* aceptor críptico, causando la introducción de un codón de parada prematuro y la reducción de los niveles disponibles de *MGC1203* [Badano y cols., 2006a]. Se postula que la supresión de *MGC1203* ejerce un papel epistático en el desarrollo del fenotipo SBB. Por tanto, es tentador especular que el alelo *NPHP4* descrito en el presente trabajo pudiera ejercer un efecto similar. Nuestros resultados sugieren que la variante encontrada en el gen *NPHP4* podría estar actuando como un modificador del fenotipo agravando la clínica del paciente índice en combinación con las otras mutaciones en *MKKS*. Esto explicaría las diferencias clínicas observadas entre los tres afectos de esta familia. No obstante, son necesarios estudios adicionales para evaluar el papel patogénico o modificador de esta variante.

5.2.1.10 Mutaciones en *NR2E3*

La familia RP 291 presenta un cambio homocigoto en *NR2E3* (c.932G>A; p.R311Q). Se trata de una mutación conocida, descrita con anterioridad por [Gerber y cols., 2000].

Mutaciones en *NR2E3* son responsables del síndrome del S-cono aumentado (ESCS) (MIM 268100)[Haider y cols., 2000], de la RPar [Gerber y cols., 2000] y de la RPad tipo 37 (RP37) (MIM 611131) [Coppieters y cols., 2007]. La historia clínica de RP en la familia RP 291 empieza en la primera década de vida con ceguera nocturna, seguido durante la segunda y tercera décadas de una lenta reducción concéntrica del campo visual. La agudeza visual disminuye sobre los 40 años y el fondo mostró las manifestaciones típicas de RP. El fenotipo que presenta el paciente índice de la familia RP 291 se asemeja al descrito por Gerber y cols., (2000) y es compatible con la RPar.

Esta familia presenta además del cambio anterior, una variante en heterocigosis de significancia desconocida en el gen *RDH12* (c.701G>A; p.R234H) que en principio podría tratarse tanto de un polimorfismo o de una mutación. La hipótesis del polimorfismo se ha podido descartar mediante experimentos funcionales que indicaban que la actividad catalítica de *RDH12* con el cambio con pérdida de sentido en la histidina 234, se reducía un 44% con respecto a la construcción silvestre [Thompson y cols., 2005]. No obstante, a pesar de su patogenicidad, se necesitan estudios adicionales para determinar si dicha variante contribuye o no al desarrollo de la enfermedad en esta familia. Se ha postulado que la presencia de alelos modificadores podría explicar las diferencias fenotípicas observadas en pacientes de la misma familia con mutaciones en *NR2E3* [Escher y cols., 2009] o en *RPGR* [Walia y cols., 2008].

Sería interesante comparar los datos clínicos de individuos afectados que portasen la mutación heterocigota en *RDH12* con aquellos afectados que no la portasen. Sin embargo, no disponemos de este tipo de muestras (Figura 4.2) por lo que se requieren otros tipos de análisis para esclarecer la contribución de la variante en *RDH12* al fenotipo.

5.2.1.11 Mutaciones en *RDH12*

Las familias RP 348, RP 92, RP 99 y RP 66 presentaron mutaciones causales en gen *RDH12*.

Las familias RP 348 y RP 92 presentaron la misma mutación (rs28940315: c.295C>A; p.L99I) en el gen *RDH12*.

La alta frecuencia de esta mutación en RPar ya había sido descrita en población española [Valverde y cols., 2009]. La patogenicidad del cambio p.L99I fue comprobada mediante estudios *in vitro* que indican que el mutante I99 de *RDH12* presenta una

reducción considerable en la capacidad para convertir *todo-trans* RAL en *todo-trans* ROL [Thompson y cols., 2005]. Todos estos datos apuntan a que estamos ante una mutación común responsable de un porcentaje pequeño pero importante (1,8%) de casos de RPar en población española.

En la familia RP 99 fue identificada la mutación c.806_810del; p.A269Gfs*2. Esta mutación fue identificada por primera vez por Janecke y cols. [2004] en un paciente afecto de ACL tipo-13 (MIM 612712). No obstante, esta mutación también fue identificada en pacientes afectados de RPar de inicio precoz [Thompson y cols., 2005].

Por último, en la familia RP 66 fue identificada la mutación homocigota p.R295* que conduce a un codón de terminación prematuro.

A pesar de los estudios realizados, no se ha podido establecer una correlación genotipo-fenotipo clara. No obstante, mutaciones en este gen suelen estar asociadas a la manifestación temprana de la enfermedad (RPar juvenil). La revisión oftalmológica de las familias con mutaciones nulas en *NR2E3* (RP 99 y RP66), mostraron disminución de agudeza visual como primer síntoma a las edades de 7 y 1 años. Sin embargo, las familias con la mutación homocigota p.L99I debutaron con pérdida del campo visual a las edades de 7 y 2 años. La marcada disminución de la agudeza visual a edades tempranas y la rápida evolución de la enfermedad, parece apuntar hacia un fenotipo más severo tipo ACL y coincide con el descrito por Valverde y cols. [2009].

5.2.1.12 Mutaciones en *RHO*

En una familia analizada, RP 322, se identificó una mutación homocigota en el gen que codifica para la rodopsina (c.1025C>T; p.T342M). Dicha mutación ha sido previamente descrita [Stone y cols., 1993], aunque inicialmente se asoció a casos de herencia dominante, los pacientes aquí descritos atienden a un modelo de herencia recesivo (Figura 4.8). Es posible que estas mutaciones recesivas en *RHO* constituyan mutaciones excepcionalmente leves que son o bien toleradas por los fotorreceptores o bien conducen a la RP a edad más avanzada [Neidhardt y cols., 2006].

La revisión oftalmológica de los pacientes, con un inicio de los síntomas a los 14 años y ceguera nocturna como primer síntoma, confirman el diagnóstico inicial de RPar en esta familia.

El gen de la rodopsina está típicamente asociado a casos de herencia autosómica dominante (RPad). Sin embargo, la identificación de mutaciones en *RHO* en dos familias RPar parece indicar que este gen no solo desempeña un papel importante en la patogénesis de la RPad, sino también de la RPar y su análisis rutinario en estas familias debería ser considerado.

5.2.1.13 Mutaciones en *RPE65*

El paciente índice de la familia VRP4 es portador de la mutación homocigota en el intron 2 de *RPE65* (c.95-2A>T). Se trata de una mutación en un nucleótido consenso del sitio de *splicing* aceptor. Las herramientas bioinformáticas predicen que dicha variante origina una interrupción en la pauta de lectura de *RPE65*.

Mutaciones en *RPE65* se han asociado a la aparición de ACL tipo 2 (MIM 204100) [Marlhens y cols., 1997] y de RPar tipo 20 (MIM 613794) [Morimura y cols., 1999b].

La mutación c.95-2A>T fue identificada por primera vez por Hanein y cols. [2004] en una familia afecta de ACL caracterizada por presentar una edad de inicio en la primera década de vida, ceguera nocturna como síntoma inicial, afectación temprana de la retina periférica, pérdida progresiva del campo visual concéntrico, ERG abolido en ambos ojos y preservación de la agudeza visual [Hanein y cols., 2004]. Esta forma relativamente moderada de ACL es clínicamente muy similar a la RP juvenil. A pesar de no disponer de muchos datos oftalmológicos de nuestro paciente, el fenotipo parece asemejarse al descrito previamente.

5.2.1.14 Mutaciones en *RPGR*

En la familia RP 15 se detectó la mutación p.E802Gfs*31 en el exón orf15 del gen *RPGR*. Este gen se ha asociado con la aparición de RPLX. La estructura del pedigree compuesta por 4 hijos varones pero sólo 2 de ellos afectados (Figura 4.17) y la escasa historia familiar previa llevaron al diagnóstico provisional de RPar.

La mutación aquí observada fue identificada previamente por Vervoort y cols. [2000] en una familia de Reino Unido y se encuentra en una región “caliente” de mutaciones, el exón orf 15 de *RPGR*. Se trata de una región muy repetitiva que técnicamente representaba un reto para la captura mediante sondas de enriquecimiento de NimbleGen. Sin embargo, la correcta identificación de la mutación demostró la gran eficacia del sistema experimental empleado.

Una vez identificado y segregado el cambio, la familia fue reclasificada a RPLX y se procedió a informar a los miembros afectados y portadores. Tanto la edad de inicio de los síntomas (5 años), como el resto de síntomas y signos clínicos coinciden con lo descrito en estudios anteriores.

5.2.1.15 Mutaciones en *USH2A*

En todas las familias RPar con mutaciones en heterocigosis compuesta se halló la mutación c.2276G>T; p.C759F en el exón 13 de *USH2A*, representando un 8,7% de las 104 familias. Esta mutación se ha asociado previamente a casos de RPar no

sindrómica (fenotipo RP39; MIM 613809) [Rivolta y cols., 2000, Aller y cols., 2004]. Precisamente la misma mutación fue identificada por Rivolta y cols. [2000] en el 4,5% de los 224 pacientes RPar analizados. Estos datos indican la alta prevalencia de esta mutación en RPar en población española.

Para investigar la correlación genotipo-fenotipo de la mutación p.C759F en *USH2A*, Aller y cols. [2004] analizaron 191 pacientes españoles afectados de enfermedades de retina síndromicas y no síndromicas. Los investigadores encontraron que la mutación p.C759F, sola o en combinación con otra mutación nula (p.E767Sfs*21), fue siempre identificada en casos de RP no síndromica.

Las cuatro familias descritas con mutaciones en heterocigosis compuesta en el gen *USH2A* fueron clínicamente diagnósticas de RPar.

En las familias RP 159 y RP 3 se combinan dos mutaciones del tipo sustituciones aminoacídicas [p.C759F + p.H610P] y [p.C759F + p.T3571M] respectivamente. Mientras que en las familias RP 351 y RP 112 se combinan una mutación del tipo sustitución aminoacídica con una mutación nula [p.C759F + p.E767Sfs*21] o que afecta al splicing [p.C759F + c.1841-2A>G]. En ninguna de las familias RPar de nuestra cohorte, el fenotipo es originado por la presencia de mutaciones nulas en ambos alelos. Esto refuerza el modelo genotipo-fenotipo propuesto para las mutaciones en *USH2A*. Según este modelo las mutaciones responsables del USH son mutaciones nulas que conducen a la ausencia de la proteína, mientras que las mutaciones responsables de RPar suelen ser bien la combinación de una nula y una sustitución aminoacídica o dos sustituciones aminoacídicas, pero nunca dos mutaciones nulas [Kaiserman y cols., 2007].

Las mutaciones c.4325T>C, p.F1442S y c.15188T>G, p.L5063R, del gen *USH2A* fueron identificadas en la familia RP 429 en heterocigosis compuesta por secuenciación del exoma [Mendez-Vidal y cols., 2013]. Se trata de mutaciones nuevas no descritas con anterioridad. El diagnóstico clínico de esta familia es de RP de inicio tardío ya que los síntomas en el paciente índice aparecieron por encima de los 40 años, incluso dos miembros de la familia eran asintomáticos hasta las edades de 59 y 48 años (Figura 4.13– II:2 y II:7). Esto corrobora el hecho de que tanto la edad de inicio como la progresión de la enfermedad pueden variar enormemente de un paciente a otro, incluso dentro de la misma familia. La ausencia en controles fue comprobada mediante secuenciación directa de los exones 20 y 70 de *USH2A* en 200 individuos control. Los estudios bioinformáticos predijeron que ambos cambios son probablemente patogénicos. La segregación familiar de los cambios en el resto de miembros familiares reveló la presencia de dichas mutaciones en todos los miembros afectados.

La mutación p.F1442S está localizada en la región extracelular en el 4º dominio de Fibronectina III. La gran región extracelular se proyecta hacia la matriz periciliar y se cree que podría estar interaccionando con el cilio conector desempeñando una función estructural o de señalización [Liu y cols., 2007b]. Nosotros proponemos que esta mutación podría afectar a conexiones específicas entre USH2A y la red de proteínas con las que interacciona. La otra mutación, p.L5063R, está localizada en el dominio transmembrana y constituye la mutación más próxima al extremo C-terminal de la proteína identificada hasta la fecha (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>). Nosotros especulamos que la sustitución de una leucina (no polar) a una arginina (polar, básica) dentro del dominio transmembrana, puede resultar en un anclaje defectuoso de USH2A en la membrana, ya que variaciones en la polaridad de los aminoácidos pueden afectar a la inserción de la proteína en la membrana. No obstante, se requieren estudios adicionales para confirmar el efecto de estos cambios en la funcionalidad de USH2A. Además, el cambio p.F1442S afecta tanto a la isoforma larga como a la corta de USH2A, mientras que p.L5063R, afecta únicamente a la isoforma larga. Como la isoforma larga es la predominante de retina [Liu y cols., 2007b] y ambas copias de la proteína larga son defectuosas en los individuos afectados, nosotros proponemos que la RP no sindrómica podría estar ocasionada por dos mutaciones en la isoforma larga. La función residual de usherina sería suficiente para el correcto funcionamiento de los estereocilios del oído interno pero insuficiente para el mantenimiento de la integridad de los fotorreceptores. Esto es compatible con los bajos niveles de transcrito correspondientes a la isoforma larga detectados en la cóclea [Van Wijk y cols., 2004].

5.2.2 Mutaciones en genes no asociados previamente al fenotipo en estudio

5.2.2.1 Mutaciones en *GPR98*

En la familia RP 258 se ha detectado una única mutación heterocigota en el gen *GPR98* (c.5368A>G; p.I1790V). Se trata de una mutación no descrita previamente. La segunda mutación en ese gen no ha podido ser detectada aún mediante NGS.

Los estudios de predicción de patogenicidad *in silico* no consideran que la mutación sea maligna, sin embargo, no está presente en 200 controles analizados y, a falta de encontrar el segundo cambio, cosegrega con la enfermedad. Para comprobar si el otro alelo cosegregaba con la enfermedad, se realizó un estudio indirecto mediante una serie de marcadores microsatélites localizados en regiones del cromosoma 5 cercanas a *GPR98*. Este estudio dio como resultado la segregación de ambos alelos con la enfermedad en nuestra familia (Figura 4.23).

El gen *GPR98* está implicado en la patogénesis de USH-2. El solapamiento genético entre USH y RP se ha descrito anteriormente, ya que mutaciones en los genes *USH2A* y *CLRN1* se han visto asociadas a ambos fenotipos [Rivolta y cols., 2000, Khan y cols., 2011]. Con respecto a *USH2A* se ha adoptado un modelo genotipo-fenotipo mediante el cual las mutaciones nulas son responsables de la aparición de USH-2, mientras que mutaciones del tipo cambio con pérdida de sentido (*missense*), el fenotipo que se manifiesta es RP no sindrómica. Si aplicamos este modelo a nuestra familia RPar con una mutación en *GPR98*, esperaríamos que la mutación en el otro alelo fuera deletérea, ya que la que hemos encontrado hasta ahora es benigna. Esto explicaría el fenotipo de RP aislada en esta familia.

La isoforma más larga del gen *GPR98* consta de 90 exones por lo que secuenciar este alto número de exones mediante secuenciación Sanger resultaría lento y costoso. Además, el hecho de que la mutación no se haya podido detectar mediante la secuenciación del exoma, podría indicar que se trata de un cambio indetectable también mediante secuenciación Sanger.

Podría ocurrir que el segundo alelo mutado se encuentre en regiones profundas de los intrones, regiones promotoras o reguladoras del gen, no analizadas en el estudio del exoma. Se ha observado que mutaciones deletéreas en ambos alelos de *CEP290* causan ciliopatías sindrómicas, mientras que una mutación intrónica en la que se inserta un nuevo exón críptico en la secuencia del ARNm de *CEP290* es responsable de la ACL (ACL tipo 10), cuyo fenotipo se encuentra confinado exclusivamente al ojo [Den Hollander y cols., 2006]. *OFD1* es otro gen que normalmente causa ciliopatías sindrómicas asociadas al cromosoma X. Sin embargo, una mutación intrónica es la responsable de la aparición de RP no sindrómica en una familia [Webb y cols., 2012]. Hay que destacar que ambos trabajos señalan el papel que juegan los intrones en la aparición de la enfermedad y la importancia de su análisis.

Otra posibilidad es que existan grandes deleciones o duplicaciones heterocigotas que no hayan podido ser detectadas mediante secuenciación. Actualmente se están implantando protocolos para la detección de *CNVs* a partir de datos de NGS principalmente basados en métodos que estudian la profundidad de la cobertura de una región de tal manera que variaciones repentinas en la cobertura de una región podrían correlacionarse con deleciones o duplicaciones de gran tamaño [Teo y cols., 2012, Klambauer y cols., 2012, Wu y cols., 2012]. Sin embargo, a pesar del gran número de algoritmos distintos que se han desarrollado, la aplicación con éxito de estas aproximaciones sigue constituyendo un reto. Este método ha sido aplicado en nuestra familia aunque no logramos obtener resultados.

Otra razón que explicaría que no hayamos encontrado el segundo alelo mutado en *GPR98*, sería porque estuviera en otro gen interactivo, es decir digenismo. Se ha descrito que mutaciones en los genes *GPR98* y *PDZD7* cosegregan en una misma familia afectada de USH2 siguiendo un modelo de digenismo [Ebermann y cols., 2010].

También podría ocurrir que la variante identificada en *GPR98* fuera en realidad un simple polimorfismo no relacionado con el fenotipo familiar. Sin embargo, su ausencia en 200 controles y en las bases de datos de 1000 genomas y de Exome Variant Server indica que, al menos, estamos ante una variante rara con una frecuencia alélica compatible con RP. Tampoco debemos obviar el hecho de que los pacientes pueden ser portadores de dicha mutación, debido a la gran carga mutacional en la población general. Se estima que aproximadamente un 22% de la población general es portadora de una mutación nula en un gen DHR [Nishiguchi y Rivolta, 2012].

Actualmente, se está trabajando en la detección de la causa genética de la enfermedad en esta familia mediante una aproximación alternativa.

5.2.3 Mutaciones en genes nuevos de DHR

5.2.3.1 Mutaciones en *PCDHA1*

Mediante secuenciación exómica hemos identificado una variante con pérdida de sentido (p.L350R) en la región variable (exón 1) del gen *PCDHA1* en una familia afectada de RPar (RP 184). Se trata de una mutación nueva que cosegrega con la enfermedad en los siete miembros familiares (Figura 4.24) y está ausente en 200 controles secuenciados por Sanger y en los 140 controles secuenciados en el proyecto genoma médico (GBPA, Sevilla). Además no aparece registrada en las bases de datos de 1000 genomas, 5000 genomas ni en el Exome Variant Server.

Las herramientas bioinformáticas predijeron que la mutación L350R es probablemente patogénica y altera drásticamente la formación de puentes disulfuro entre las cisteínas de la proteína. La formación de puentes disulfuro condiciona la estructura terciaria de las proteínas ya que defectos en el patrón de puentes disulfuro afecta tanto el plegamiento de la proteína como sus interacciones intra- e intermoleculares y previsiblemente también su función.

Otras protocadherinas han sido previamente asociadas a la aparición de distintos tipos de DHR sindrómicas y no sindrómicas, aunque ninguna de ellas pertenece al clúster de las alfa protocadherinas (Tabla 5.1).

Tabla 5.1 – Protocadherinas implicadas en distintos tipos de DHR.

Gen	Localización	Fenotipo	MIM	Referencias
<i>CDHR1</i>	10q.23.1	Distrofia de conos y bastones 15	613660	[Ostergaard y cols., 2010, Bolz y cols., 2005]
		Retinitis pigmentosa 65	613660	[Henderson y cols., 2010]
<i>PCDH15</i>	10q21.1	Síndrome de Usher, tipo 1D	601067	[Zheng y cols., 2005]
		Síndrome de Usher, tipo 1F	602083	[Ahmed y cols., 2001, Ahmed y cols., 2008, Alagramam y cols., 2001a, Alagramam y cols., 2001b]
<i>CDH23</i>	10q22.1	Síndrome de Usher, tipo 1D	601067	[Bolz y cols., 2001, Bork y cols., 2001b, Astuto y cols., 2002b, Di Palma y cols., 2001, Zheng y cols., 2005]
<i>CDH3</i>	16q22.1	Distrofia macular con displasia ectodérmica y ectrodactilia	225280	[Kjaer y cols., 2005]
		Distrofia macular juvenil con hipotricosis congénita	601553	[Sprecher y cols., 2001, Indelman y cols., 2002]

Hoy día se desconoce el mecanismo por el cual las mutaciones en estas protocadherinas conducen a la muerte de los fotorreceptores. Sin embargo, se han demostrado que determinadas protocadherinas como *PCDH15* y *CDH23*, responsables del síndrome de Usher tipo 1, interactúan entre sí para formar unas estructuras filamentosas extracelulares llamadas “tip links”. Dichas estructuras conectan parejas de células pilosas en el oído interno y se encargan de transmitir la señal a los canales mecanosensitivos. En el establecimiento de estas uniones “tip-links” intervienen los dominios tipo E-cadherina (EC) de *CDH23* y de *PCDH15* y es un mecanismo dependiente de calcio [Lelli y cols., 2010]. Posteriormente se comprobó que ambas proteínas, *PCDH15* y *CDH23*, estaban estrechamente enlazadas por las repeticiones de sus dominios proteicos EC1 y EC2 [Sotomayor y cols., 2012]. Por otro lado, en un modelo murino de sordera se ha comprobado que la mutación con pérdida de sentido p.I108N en el dominio EC1 de *pcdh15* afecta a la interacción con el EC2 de *cdh23*. Dicha mutación impide la formación de la unión “tip-link” y provoca que los canales de mecanotransducción no sean capaces de permanecer abiertos en reposo dando lugar a la aparición del fenotipo [Geng y cols., 2013].

Estos mecanismos patogénicos demostrados en protocadherinas estructuralmente similares a nuestro gen candidato, nos ha llevado a postular que la mutación p.L350R localizada en el tercer dominio EC podría estar impidiendo la correcta unión con sus proteínas interactoras en el contexto de las células fotorreceptoras.

El clúster de genes de las alfa-protocadherinas, los cuales se expresan en el cerebro de los vertebrados, codifica diversas proteínas de membrana cuyas funciones

no están totalmente esclarecidas. A nivel del SNC parecen estar relacionadas con la proyección axonal, el aprendizaje y la memoria.

5.2.4 Rastreo mutacional del exón I del gen *PCDHA1* en pacientes DHR

El cribado del exón 1 de *PCDHA1* en una selección de 96 familias no resueltas de nuestra cohorte no mostró ninguna variante patogénica. El resto de exones de *PCDHA1* no fueron analizados, ya que se trata de exones comunes para el resto de miembros del clúster.

5.2.5 Prevalencia de cada uno de los genes en nuestra cohorte

Mediante las diversas estrategias de rastreo, se han identificado mutaciones en 21 genes: *USH2A*, *RDH12*, *EYS*, *CRB1*, *CERKL*, *RPE65*, *PDE6B*, *CNGA1*, *RHO*, *ABCA4*, *C2orf71*, *MERTK*, *NR2E3*, *PROM1*, *RLBP1*, *SAG*, *TULP1*, *GPR98*, *RPGR*, *BBS1* y *MKKS* (Figura 5.1). Los cambios con alta probabilidad de no ser patogénicos no se tuvieron en cuenta en el análisis sobre la distribución de genes.

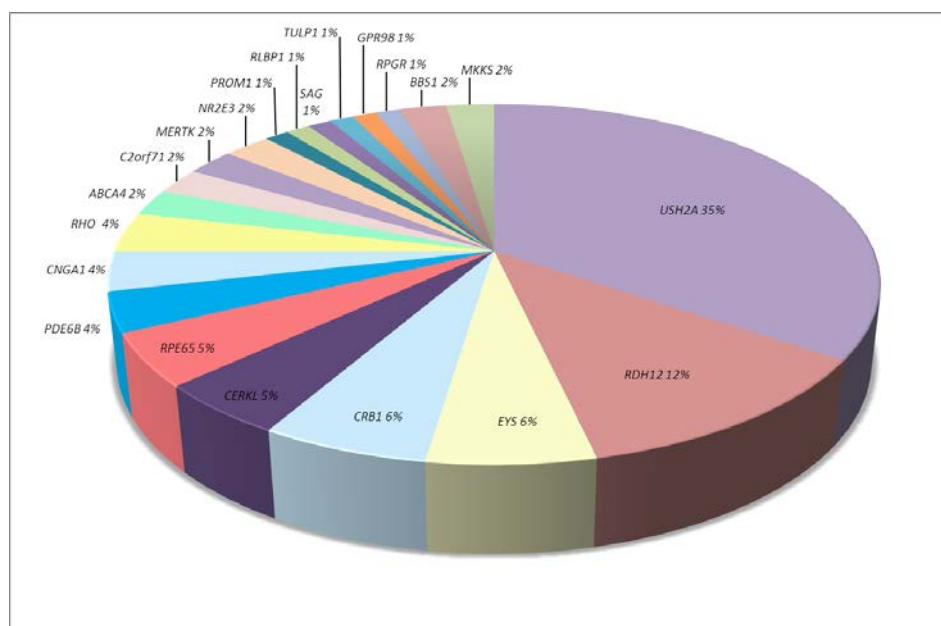


Figura 5.1 – Contribución parcial de cada uno de los genes en nuestra cohorte.

El cálculo se ha efectuado mediante el cómputo total de alelos mutados para cada uno de los genes estudiados entre el total de alelos mutados.

El gen que con mayor frecuencia se ha encontrado mutado es el gen *USH2A*, seguido del gen *RDH12*. No obstante, hay que tener en cuenta en gran parte de los pacientes que integran la cohorte de la presente tesis doctoral se descartó previamente la implicación del gen *EYS* mediante secuenciación directa de sus 43 exones [Barragan

y cols., 2010], de ahí que los datos de prevalencia de *EYS* obtenidos en el presente trabajo sean algo menores de lo esperado. Además, el elevado número de mutaciones identificadas en *USH2A* puede explicarse, en parte, a que la micromatriz de genotipado de Asper Biotech incluía el análisis de 584 variantes conocidas de las cuales 188 ($\approx 32\%$) están localizadas en el gen *USH2A* (Tabla 3.12).

5.2.6 Categorización funcional de los genes responsables de la enfermedad en nuestra cohorte de pacientes.

Los genes que se han encontrado mutados en el presente trabajo afectan a numerosos aspectos de la estructura y funciones celulares (Figura 5.2). A pesar de lo que se creía anteriormente, muchos de los genes que causan RP se expresan de manera generalizada en otros tejidos y no son específicos de los fotorreceptores. Las mutaciones que afectan a funciones específicas de los fotorreceptores como la fototransducción o el ciclo visual son sólo ligeramente más numerosas que las mutaciones que afectan a funciones más generales como la interacción célula-célula, la matriz extracelular o el metabolismo lipídico.

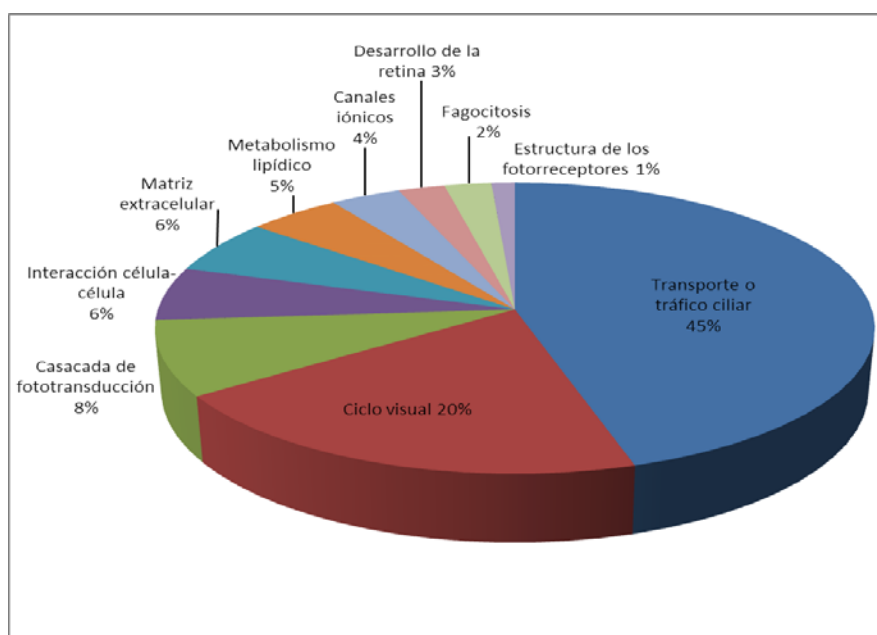


Figura 5.2 – Clasificación funcional de los genes que se encuentran mutados en nuestra cohorte.

La categoría con un mayor número de mutaciones es la del tráfico ciliar de los fotorreceptores. El talón de aquiles de los fotorreceptores parece ser el cilio modificado que conecta el segmento interno con el segmento externo (Figura 1.3.a). El segmento externo no es capaz de sintetizar las proteínas y discos membranosos necesarios para la fototransducción, por tanto, estos deben viajar masivamente a través de los cilios

conectores [Wolfrum y Schmitt, 2000]. Casi un cuarto de los genes que causan la degeneración de los fotorreceptores están asociados con la estructura o función ciliar [Wright y cols., 2010]. Esto podría reflejar la gran complejidad del proteoma ciliar de los vertebrados, en los que se han identificado más de 1000 proteínas [Gherman y cols., 2006]. Muchas proteínas ciliares se expresan también en otros compartimentos celulares, las cuales están implicadas en la aparición de signos extraoculares asociados a cuadros sindrómicos como el USH-2 o el SBB, aunque también hay ciliopatías no sindrómicas como la ACL.

5.2.7 Mutaciones frecuentes

La mayoría de las mutaciones que afectan a familias de RP son raras con una frecuencia del alelo minoritario (MAF) $<<0,01$, pero existe un porcentaje menor de mutaciones que han sido identificadas en más de una familia. Por ejemplo, el alelo [c.2276G>T; p.C759F] de *USH2A* ha sido identificado en 9 familias y el alelo [c.2299delG; p.E767Sfs*21] también de *USH2A* en 4 familias RPar. Ambas mutaciones causan un porcentaje sustancial de casos de RP y de USH-2, pero son raras en la población general [Dreyer y cols., 2000, Hartong y cols., 2006].

La mutación c.2299delG de *USH2A* puede ser la causa más probable de RP en humanos. La alta frecuencia y la amplia distribución geográfica de esta mutación captaron la atención de Dreyer y cols. [2001] que investigaron si se trataba de una mutación procedente de un ancestro común o representaba un punto caliente de mutaciones del gen *USH2A*. Para ello llevaron a cabo el análisis de haplotipos en 116 pacientes afectados de USH-2 procedentes de 14 países distintos. Los datos determinaron que la amplia distribución geográfica de la mutación c.2299delG es el resultado de una mutación ancestral que se extendió por toda Europa y América debido a las migraciones poblacionales [Dreyer y cols., 2001].

5.3 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN

5.3.1.1 Cuantificación de la expresión del gen *PCDHAI* en retina humana

Los niveles de expresión de *Pcdha1* en retina fueron determinados mediante PCR cuantitativa usando sondas Taqman específicas para *Pcdha1* y ADNc comercial de retina adulta humana. Los niveles de *Pcdha1* son bajos (Ct=34,72) comparados con los obtenidos en ADNc de cerebro (Ct=29,66). Estos niveles bajos en retina no descartarían el papel patogénico de dicho gen, ya que es posible que la mutación identificada en la familia RP 184 de lugar a una ganancia de función, a un cambio en la localización o impida la unión con otras proteínas interactoras.

Por tanto, son necesarios estudios adicionales para esclarecer el papel de *PCDHA1* en la aparición del fenotipo RPar.

5.4 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS GLOBALES OBTENIDOS

Con esta estrategia de trabajo combinada hemos logrado diagnosticar genéticamente a 23 de las 109 familias de nuestra cohorte que carecían de un diagnóstico genético ($\approx 21\%$) (Figura 5.3 y Figura 5.4). El porcentaje de familias donde se identificó un único alelo mutado fue del 29,4% (32 de 109).

Tras analizar las 104 familias RPar mediante las micromatrices de genotipado, fueron caracterizadas genéticamente 11 de ellas. Las familias no caracterizadas genéticamente mediante este método (93 familias) fueron analizadas mediante la micromatriz de resecuenciación de diseño personalizado, junto con otras 9 familias adicionales (5 tenían causa genética desconocida y las otras 4 eran controles positivos de mutaciones). De las 98 familias con causa genética desconocida, se lograron diagnosticar 5 de ellas. Además, el análisis por MLPA del gen *EYS* llevó a la caracterización de 1 familia más. Finalmente, 7 de las familias no caracterizadas, fueron seleccionadas para su estudio mediante secuenciación de nueva generación. La secuenciación del exoma de estos individuos consiguió identificar la causa genética de la enfermedad en 6 de las familias analizadas.

En patologías como la RP, las características oftalmológicas raramente predicen cuál de los ≈ 60 genes conocidos es responsable de la enfermedad en una familia. Tal y como se ejemplifica en pacientes con diferentes mutaciones en el gen *ABCA4* [Allikmets y cols., 1997, Cremers y cols., 1998] o *RDH12* [Sun y cols., 2007], en los que variantes en el mismo gen pueden estar asociados con un gran número de entidades clínicas distintas. Esto hace que la secuenciación por técnicas convencionales (Sanger) sea demasiado lenta y costosa. Actualmente, la posibilidad de secuenciar el exoma ofrece nuevas perspectivas.

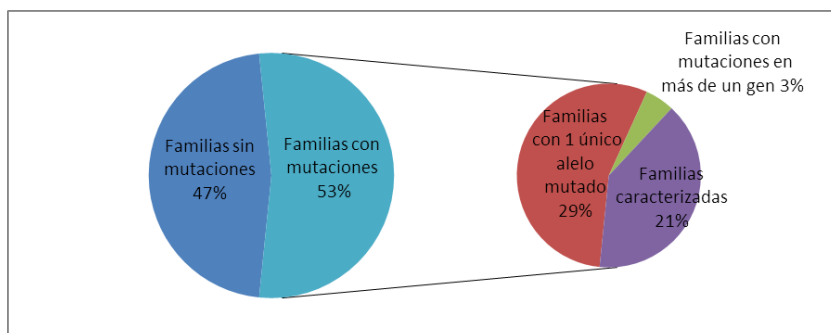


Figura 5.3 – Familias analizadas y resultados obtenidos.

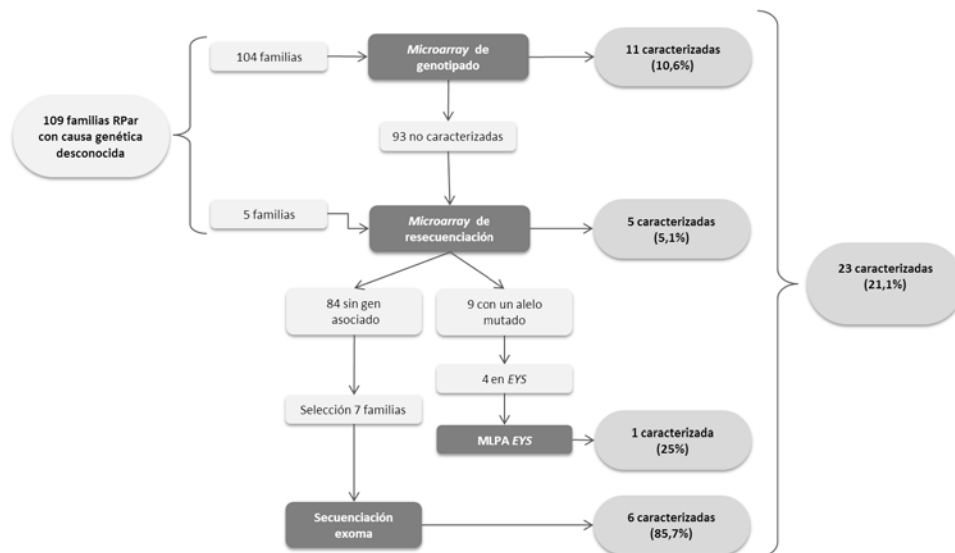


Figura 5.4 – Resultados obtenidos tras el análisis con las diversas técnicas empleadas.

Los porcentajes de diagnóstico alcanzados con cada una de las técnicas están calculados familias diagnosticadas/familias analizadas.

Los resultados aquí expuestos han mostrado por que en algunos casos fue tan difícil detectar la causa genética subyacente hasta la aplicación de las técnicas de secuenciación masiva.

En determinados casos, presuntas discrepancias entre el defecto molecular y los resultados clínicos han justificado una reevaluación de los pacientes y las familias, tal es el caso de las familias RP 368 y RP 42 con mutaciones en genes sindrómicos (BBS1 y MKKS respectivamente), y de la familia RP15 con mutaciones en un gen asociado a RPLX (*RPGR*).

La problemática asociada al diagnóstico clínico y genético de las DHR afecta directamente a los pacientes, que es probable que requieran una explicación detallada y consejo genético. Este trabajo recalca la necesidad de integrar el fenotipo clínico, la historia familiar y los hallazgos genéticos como un nuevo paso crucial en el diagnóstico de las distrofias hereditarias de retina.

6 CONCLUSIONES

1. El empleo de una micromatriz de genotipado específica de RPar ha permitido caracterizar genéticamente al 10,6% de las familias incluidas en el estudio, así como la identificación de un alelo mutado en un 21% de los individuos analizados.
2. El empleo de la micromatriz de diseño personalizado ha permitido la caracterización molecular del 5,1% del total de las familias estudiadas. Además de la identificación de un alelo mutado en el 9,2% de las familias.
3. La micromatriz de diseño personalizado es una herramienta eficaz en la detección de variaciones de un nucleótido único aunque no permite la detección de mutaciones del tipo inserciones o deleciones.
4. El análisis mediante MLPA de familias españolas donde se había identificado un cambio patogénico en un solo alelo del gen *EYS* ha permitido diagnosticar molecularmente a una familia. Esta técnica se ha mostrado eficaz en la detección directa de grandes deleciones y duplicaciones, así como, en la detección indirecta de la deleción de un nucleótido localizada en la zona de hibridación de la sonda.
5. El descenso selectivo en la intensidad de la señal fluorescente medida en una de las cadenas resecuenciadas podría servir de aproximación para detectar grandes deleciones heterocigotas mediante la micromatriz de resecuenciación.
6. El empleo de la tecnología de secuenciación de nueva generación ha permitido la identificación de la causa genética de la enfermedad en el 75% (6 de 8) del total de familias analizadas.
7. Los resultados derivados de la secuenciación exómica han permitido la reasignación del tipo de herencia en una de las familias de RPar a RPLX.
8. La detección de una variante del tipo deleción de dos pares de bases en el exón ORF 15 del gen *RPGR*, una región altamente repetitiva y problemática para la captura, ha demostrado la eficacia del método empleado y su validez para fines diagnósticos.
9. La identificación de la causa genética de la enfermedad en dos de nuestras familias con mutaciones en genes responsables de DHR sindrómicas ha permitido la rectificación del diagnóstico clínico inicial.

10. La secuenciación exómica en una familia afecta de SBB ha permitido la identificación de una variante de secuencia que podría estar actuando como alelo modificador del fenotipo agravando la clínica del paciente que lo porta.
11. La detección de una variante patogénica en un gen típico de USH-2 (GPR98) en una familia RPar podría permitir la asociación de un nuevo fenotipo a este gen.
12. La detección de una variante potencialmente patogénica en el gen candidato *PCDHA1* podría permitir la identificación de un nuevo gen de RPar.
13. Esta estrategia combinada ha permitido la caracterización molecular del 21% de las familias analizadas.

7 BIBLIOGRAFÍA

- 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., Bhattacharya, S. S. Large-scale molecular analysis of a 34 Mb interval on chromosome 6q: major refinement of the RP25 interval. *Ann Hum Genet*, 72, 463-77 (2008a).
- 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., Shah, A., Cheetham, M. E., Carter, N. P., Chakarova, C., Ponting, C. P., Bhattacharya, S. S., Antinolo, G. EYS, encoding an ortholog of *Drosophila* spacemaker, is mutated in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 40, 1285-7 (2008b).
- Abd El-Aziz, M. M., El-Ashry, M. F., Barragan, I., Marcos, I., Borrego, S., Antinolo, G., Bhattacharya, S. S. Molecular genetic analysis of two functional candidate genes in the autosomal recessive retinitis pigmentosa, RP25, locus. *Curr Eye Res*, 30, 1081-7 (2005).
- 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., 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 (2010).
- Abd El-Aziz, M. M., Patel, R. J., El-Ashry, M. F., Barragan, I., Marcos, I., Borrego, S., Antinolo, G., Bhattacharya, S. S. Exclusion of four candidate genes, KHDRBS2, PTP4A1, KIAA1411 and OGFRL1, as causative of autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Res*, 38, 19-23 (2006).
- Adato, A., Lefevre, G., Delprat, B., Michel, V., Michalski, N., Chardenoux, S., Weil, D., El-Amraoui, A., Petit, C. Usherin, the defective protein in Usher syndrome type IIA, is likely to be a component of interstereocilia ankle links in the inner ear sensory cells. *Hum Mol Genet*, 14, 3921-32 (2005).
- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., Sunyaev, S. R. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7, 248-9 (2010).
- Ahmed, Z. M., Riazuddin, S., Aye, S., Ali, R. A., Venselaar, H., Anwar, S., Belyantseva, P. P., Qasim, M., Riazuddin, S., Friedman, T. B. Gene structure and mutant alleles of PCDH15: nonsyndromic deafness DFNB23 and type 1 Usher syndrome. *Hum Genet*, 124, 215-23 (2008).
- Ahmed, Z. M., Riazuddin, S., Bernstein, S. L., Ahmed, Z., Khan, S., Griffith, A. J., Morell, R. J., Friedman, T. B., Riazuddin, S., Wilcox, E. R. Mutations of the protocadherin gene PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *Am J Hum Genet*, 69, 25-34 (2001).
- Ahmed, Z. M., Riazuddin, S., Wilcox, E. R. The molecular genetics of Usher syndrome. *Clin Genet*, 63, 431-44 (2003).
- Al-Jandal, N., Farrar, G. J., Kiang, A. S., Humphries, M. M., Bannon, N., Findlay, J. B., Humphries, P., Kenna, P. F. A novel mutation within the rhodopsin gene (Thr-94-Ile) causing autosomal dominant congenital stationary night blindness. *Hum Mutat*, 13, 75-81 (1999).

- Alagramam, K. N., Murcia, C. L., Kwon, H. Y., Pawlowski, K. S., Wright, C. G., Woychik, R. P. The mouse Ames waltzer hearing-loss mutant is caused by mutation of *Pcdh15*, a novel protocadherin gene. *Nat Genet*, 27, 99-102 (2001a).
- Alagramam, K. N., Yuan, H., Kuehn, M. H., Murcia, C. L., Wayne, S., Srisailpathy, C. R., Lowry, R. B., Knaus, R., Van Laer, L., Bernier, F. P., Schwartz, S., Lee, C., Morton, C. C., Mullins, R. F., Ramesh, A., Van Camp, G., Hageman, G. S., Woychik, R. P., Smith, R. J. Mutations in the novel protocadherin *PCDH15* cause Usher syndrome type 1F. *Hum Mol Genet*, 10, 1709-18 (2001b).
- 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., Inglehearn, C. F., Kumaramanickavel, G., Stone, E. M., Fishman, G. A., Jacobson, S. G. CERKL mutations cause an autosomal recessive cone-rod dystrophy with inner retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 5944-54 (2009).
- Aller, E., Jaijo, T., Beneyto, M., Najera, C., Oltra, S., Ayuso, C., Baiget, M., Carballo, M., Antinolo, G., Valverde, D., Moreno, F., Vilela, C., Collado, D., Perez-Garrigues, H., Navea, A., Millan, J. M. Identification of 14 novel mutations in the long isoform of *USH2A* in Spanish patients with Usher syndrome type II. *J Med Genet*, 43, e55 (2006).
- Aller, E., Najera, C., Millan, J. M., Oltra, J. S., Perez-Garrigues, H., Vilela, C., Navea, A., Beneyto, M. Genetic analysis of 2299delG and C759F mutations (*USH2A*) in patients with visual and/or auditory impairments. *Eur J Hum Genet*, 12, 407-10 (2004).
- Allikmets, R., Singh, N., Sun, H., Shroyer, N. F., Hutchinson, A., Chidambaram, A., Gerrard, B., Baird, L., Stauffer, D., Peiffer, A., Rattner, A., Smallwood, P., Li, Y., Anderson, K. L., Lewis, R. A., Nathans, J., Leppert, M., Dean, M., Lupski, J. R. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (*ABCR*) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet*, 15, 236-46 (1997).
- Antinolo, G., Sanchez, B., Borrego, S., Rueda, T., Chaparro, P., Cabeza, J. C. Identification of a new mutation at codon 171 of rhodopsin gene causing autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet*, 3, 1421 (1994).
- Arshavsky, V. Y., Lamb, T. D., Pugh, E. N., Jr. G proteins and phototransduction. *Annu Rev Physiol*, 64, 153-87 (2002).
- Astuto, L. M., Bork, J. M., Weston, M. D., Askew, J. W., Fields, R. R., Orten, D. J., Ohliger, S. J., Riazuddin, S., Morell, R. J., Khan, S., Kremer, H., Van Hauwe, P., Moller, C. G., Cremers, C. W., Ayuso, C., Heckenlively, J. R., Rohrschneider, K., Spandau, U., Greenberg, J., Ramesar, R., Reardon, W., Bitoun, P., Millan, J., Legge, R., Friedman, T. B., Kimberling, W. J. *CDH23* mutation and phenotype heterogeneity: a profile of 107 diverse families with Usher syndrome and nonsyndromic deafness. *Am J Hum Genet*, 71, 262-75 (2002a).
- Astuto, L. M., Bork, J. M., Weston, M. D., Askew, J. W., Fields, R. R., Orten, D. J., Ohliger, S. J., Riazuddin, S., Morell, R. J., Khan, S., Riazuddin, S., Kremer, H., Van Hauwe, P., Moller, C. G., Cremers, C. W., Ayuso, C., Heckenlively, J. R., Rohrschneider, K., Spandau, U., Greenberg, J., Ramesar, R., Reardon, W., Bitoun, P., Millan, J., Legge, R., Friedman, T. B., Kimberling, W. J. *CDH23* mutation and phenotype heterogeneity: a profile of 107 diverse families with

- Usher syndrome and nonsyndromic deafness. *Am J Hum Genet*, 71, 262-75 (2002b).
- Audo, I., Lancelot, M. E., Mohand-Said, S., Antonio, A., Germain, A., Sahel, J. A., Bhattacharya, S. S., Zeitz, C. Novel C2orf71 mutations account for approximately 1% of cases in a large French arRP cohort. *Hum Mutat*, 32, E2091-103 (2011).
- 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., Bhattacharya, S. S., Zeitz, C. EYS is a major gene for rod-cone dystrophies in France. *Hum Mutat*, 31, E1406-35 (2010).
- Avila-Fernandez, A., Cantalapiedra, D., Aller, E., Vallespin, E., Aguirre-Lamban, J., Blanco-Kelly, F., Corton, M., Riveiro-Alvarez, R., Allikmets, R., Trujillo-Tiebas, M. J., Millan, J. M., Cremers, F. P., Ayuso, C. Mutation analysis of 272 Spanish families affected by autosomal recessive retinitis pigmentosa using a genotyping microarray. *Mol Vis*, 16, 2550-8 (2010).
- Avila-Fernandez, A., Riveiro-Alvarez, R., Vallespin, E., Wilke, R., Tapias, I., Cantalapiedra, D., Aguirre-Lamban, J., Gimenez, A., Trujillo-Tiebas, M. J., Ayuso, C. CERKL mutations and associated phenotypes in seven Spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49, 2709-13 (2008).
- Ayuso, C., Garcia-Sandoval, B., Najera, C., Valverde, D., Carballo, M., Antinolo, G. Retinitis pigmentosa in Spain. The Spanish Multicentric and Multidisciplinary Group for Research into Retinitis Pigmentosa. *Clin Genet*, 48, 120-2 (1995).
- Ayuso, C., Millan, J. M. Retinitis pigmentosa and allied conditions today: a paradigm of translational research. *Genome Med*, 2, 34 (2010).
- Ayuso, C., Trujillo, M. J., Sanz, R., Garcia-Sandoval, B. Genetic epidemiology of retinitis pigmentosa in Spain. *Med Genetik*, 9, 33 (1997).
- Ayyagari, R., Demirci, F. Y., Liu, J., Bingham, E. L., Stringham, H., Kakuk, L. E., Boehnke, M., Gorin, M. B., Richards, J. E., Sieving, P. A. X-linked recessive atrophic macular degeneration from RPGR mutation. *Genomics*, 80, 166-71 (2002).
- Azarian, S. M., Travis, G. H. The photoreceptor rim protein is an ABC transporter encoded by the gene for recessive Stargardt's disease (ABCR). *FEBS Lett*, 409, 247-52 (1997).
- Badano, J. L., Kim, J. C., Hoskins, B. E., Lewis, R. A., Ansley, S. J., Cutler, D. J., Castellán, C., Beales, P. L., Leroux, M. R., Katsanis, N. Heterozygous mutations in BBS1, BBS2 and BBS6 have a potential epistatic effect on Bardet-Biedl patients with two mutations at a second BBS locus. *Hum Mol Genet*, 12, 1651-9 (2003).
- Badano, J. L., Leitch, C. C., Ansley, S. J., May-Simera, H., Lawson, S., Lewis, R. A., Beales, P. L., Dietz, H. C., Fisher, S., Katsanis, N. Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Nature*, 439, 326-30 (2006a).

- Badano, J. L., Mitsuma, N., Beales, P. L., Katsanis, N. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 7, 125-48 (2006b).
- Bainbridge, J. W., Smith, A. J., Barker, S. S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., Viswanathan, A., Holder, G. E., Stockman, A., Tyler, N., Petersen-Jones, S., Bhattacharya, S. S., Thrasher, A. J., Fitzke, F. W., Carter, B. J., Rubin, G. S., Moore, A. T., Ali, R. R. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*, 358, 2231-9 (2008).
- Bandah-Rozenfeld, D., Littink, K. W., Ben-Yosef, T., Strom, T. M., Chowers, I., Collin, R. W., Den Hollander, A. I., Van Den Born, L. I., Zonneveld, M. N., Merin, S., Banin, E., Cremers, F. P., Sharon, D. Novel null mutations in the EYS gene are a frequent cause of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Israeli population. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 4387-94 (2010).
- Banerjee, P., Kleyn, P. W., Knowles, J. A., Lewis, C. A., Ross, B. M., Parano, E., Kovats, S. G., Lee, J. J., Penchaszadeh, G. K., Ott, J., Jacobson, S. G., Gilliam, T. C. TULP1 mutation in two extended Dominican kindreds with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 18, 177-9 (1998).
- Banin, E., Mizrahi-Meissonnier, L., Neis, R., Silverstein, S., Magyar, I., Abeliovich, D., Roepman, R., Berger, W., Rosenberg, T., Sharon, D. A non-ancestral RPGR missense mutation in families with either recessive or semi-dominant X-linked retinitis pigmentosa. *Am J Med Genet A*, 143A, 1150-8 (2007).
- Barragan, I., Abd El-Aziz, M. M., Borrego, S., El-Ashry, M. F., O'driscoll, C., Bhattacharya, S. S., Antinolo, G. Linkage validation of RP25 Using the 10K genechip array and further refinement of the locus by new linked families. *Ann Hum Genet*, 72, 454-62 (2008a).
- Barragan, I., Borrego, S., Abd El-Aziz, M. M., El-Ashry, M. F., Abu-Safieh, L., Bhattacharya, S. S., Antinolo, G. Genetic analysis of FAM46A in Spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa: characterisation of novel VNTRs. *Ann Hum Genet*, 72, 26-34 (2008b).
- 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., Audo, I., Zeitz, C., Littink, K. W., Dopazo, J., Bhattacharya, S. S., Antinolo, G. Mutation spectrum of EYS in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Mutat*, 31, E1772-800 (2010).
- Barragan, I., Marcos, I., Borrego, S., Antinolo, G. Molecular analysis of RIM1 in autosomal recessive Retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Res*, 37, 89-93 (2005a).
- Barragan, I., Marcos, I., Borrego, S., Antinolo, G. Mutation screening of three candidate genes, ELOVL5, SMAP1 and GLULD1 in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Int J Mol Med*, 16, 1163-7 (2005b).
- Beales, P. L., Badano, J. L., Ross, A. J., Ansley, S. J., Hoskins, B. E., Kirsten, B., Mein, C. A., Froguel, P., Scambler, P. J., Lewis, R. A., Lupski, J. R., Katsanis, N. Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet*, 72, 1187-99 (2003).

- Beales, P. L., Elcioglu, N., Woolf, A. S., Parker, D., Flinter, F. A. New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J Med Genet*, 36, 437-46 (1999).
- Beales, P. L., Warner, A. M., Hitman, G. A., Thakker, R., Flinter, F. A. Bardet-Biedl syndrome: a molecular and phenotypic study of 18 families. *J Med Genet*, 34, 92-8 (1997).
- Berger, W., Kloeckener-Gruissem, B., Neidhardt, J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res*, 29, 335-75 (2010).
- Bernal, S., Ayuso, C., Antinolo, G., Gimenez, A., Borrego, S., Trujillo, M. J., Marcos, I., Calaf, M., Del Rio, E., Baiget, M. Mutations in USH2A in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa: high prevalence and phenotypic variation. *J Med Genet*, 40, e8 (2003).
- Berson, E. L., Rosner, B., Sandberg, M. A., Hayes, K. C., Nicholson, B. W., Weigel-Diffrano, C., Willett, W. Vitamin A supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*, 111, 1456-9 (1993).
- Bolz, H., Ebermann, I., Gal, A. Protocadherin-21 (PCDH21), a candidate gene for human retinal dystrophies. *Mol Vis*, 11, 929-33 (2005).
- Bolz, H., Von Brederlow, B., Ramirez, A., Bryda, E. C., Kutsche, K., Nothwang, H. G., Seeliger, M., Del, C. S. C. M., Vila, M. C., Molina, O. P., Gal, A., Kubisch, C. Mutation of CDH23, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nat Genet*, 27, 108-12 (2001).
- Bonnet, C., El-Amraoui, A. Usher syndrome (sensorineural deafness and retinitis pigmentosa): pathogenesis, molecular diagnosis and therapeutic approaches. *Curr Opin Neurol*, 25, 42-9 (2012).
- Booij, J. C., Bakker, A., Kulumbetova, J., Moutaoukil, Y., Smeets, B., Verheij, J., Kroes, H. Y., Klaver, C. C., Van Schooneveld, M., Bergen, A. A., Florijn, R. J. Simultaneous mutation detection in 90 retinal disease genes in multiple patients using a custom-designed 300-kb retinal resequencing chip. *Ophthalmology*, 118, 160-167 e1-3 (2011).
- Bork, J. M., Peters, L. M., Riazuddin, S., Bernstein, S. L., Ahmed, Z. M., Ness, S. L., Polomeno, R., Ramesh, A., Schloss, M., Srisailpathy, C. R., Wayne, S., Bellman, S., Desmukh, D., Ahmed, Z., Khan, S. N., Kaloustian, V. M., Li, X. C., Lalwani, A., Bitner-Glindzicz, M., Nance, W. E., Liu, X. Z., Wistow, G., Smith, R. J., Griffith, A. J., Wilcox, E. R., Friedman, T. B., Morell, R. J. Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23. *Am J Hum Genet*, 68, 26-37 (2001a).
- Bork, J. M., Peters, L. M., Riazuddin, S., Bernstein, S. L., Ahmed, Z. M., Ness, S. L., Polomeno, R., Ramesh, A., Schloss, M., Srisailpathy, C. R., Wayne, S., Bellman, S., Desmukh, D., Ahmed, Z., Khan, S. N., Kaloustian, V. M., Li, X. C., Lalwani, A., Riazuddin, S., Bitner-Glindzicz, M., Nance, W. E., Liu, X. Z., Wistow, G., Smith, R. J., Griffith, A. J., Wilcox, E. R., Friedman, T. B., Morell, R. J. Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23. *Am J Hum Genet*, 68, 26-37 (2001b).

- Bornancin, F., Mechtcheriakova, D., Stora, S., Graf, C., Wlachos, A., Devay, P., Urtz, N., Baumruker, T., Billich, A. Characterization of a ceramide kinase-like protein. *Biochim Biophys Acta*, 1687, 31-43 (2005).
- Branham, K., Othman, M., Brumm, M., Karoukis, A. J., Atmaca-Sonmez, P., Yashar, B. M., Schwartz, S. B., Stover, N. B., Trzuppek, K., Wheaton, D., Jennings, B., Ciccarelli, M. L., Jayasundera, K. T., Lewis, R. A., Birch, D., Bennett, J., Sieving, P. A., Andreasson, S., Duncan, J. L., Fishman, G. A., Iannaccone, A., Weleber, R. G., Jacobson, S. G., Heckenlively, J. R., Swaroop, A. Mutations in RPGR and RP2 account for 15% of males with simplex retinal degenerative disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53, 8232-7 (2012).
- Brea-Fernandez, A. J., Pomares, E., Brion, M. J., Marfany, G., Blanco, M. J., Sanchez-Salorio, M., Gonzalez-Duarte, R., Carracedo, A. Novel splice donor site mutation in MERTK gene associated with retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol*, 92, 1419-23 (2008).
- Bridges, C. D. 11-Cis vitamin A in dark-adapted rod outer segments is a probable source of prosthetic groups for rhodopsin biosynthesis. *Nature*, 259, 247-8 (1976).
- Briscoe, A. D., Gaur, C., Kumar, S. The spectrum of human rhodopsin disease mutations through the lens of interspecific variation. *Gene*, 332, 107-18 (2004).
- Burstedt, M. S., Golovleva, I. Central retinal findings in Bothnia dystrophy caused by RLBP1 sequence variation. *Arch Ophthalmol*, 128, 989-95 (2010).
- Burstedt, M. S., Sandgren, O., Holmgren, G., Forsman-Semb, K. Bothnia dystrophy caused by mutations in the cellular retinaldehyde-binding protein gene (RLBP1) on chromosome 15q26. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40, 995-1000 (1999).
- Caberoy, N. B., Zhou, Y., Li, W. Tubby and tubby-like protein 1 are new MerTK ligands for phagocytosis. *EMBO J*, 29, 3898-910 (2010).
- Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M. Q., Krainer, A. R. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res*, 31, 3568-71 (2003).
- Carter-Dawson, L. D., Lavail, M. M. Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. *J Comp Neurol*, 188, 245-62 (1979a).
- Carter-Dawson, L. D., Lavail, M. M. Rods and cones in the mouse retina. II. Autoradiographic analysis of cell generation using tritiated thymidine. *J Comp Neurol*, 188, 263-72 (1979b).
- Clark, G. R., Crowe, P., Muszynska, D., O'prey, D., O'Neill, J., Alexander, S., Willoughby, C. E., McKay, G. J., Silvestri, G., Simpson, D. A. Development of a diagnostic genetic test for simplex and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*, 117, 2169-77 e3 (2010).
- Collin, R. W., Safieh, C., Littink, K. W., Shalev, S. A., Garzozzi, H. J., Rizel, L., Abbasi, A. H., Cremers, F. P., Den Hollander, A. I., Klevering, B. J., Ben-Yosef, T. Mutations in C2ORF71 cause autosomal-recessive retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet*, 86, 783-8 (2010).
- Collin, R. W., Van Den Born, L. I., Klevering, B. J., De Castro-Miro, M., Littink, K. W., Arimadyo, K., Azam, M., Yazar, V., Zonneveld, M. N., Paun, C. C.,

- Siemiatkowska, A. M., Strom, T. M., Hehir-Kwa, J. Y., Kroes, H. Y., De Faber, J. T., Van Schooneveld, M. J., Heckenlively, J. R., Hoyng, C. B., Den Hollander, A. I., Cremers, F. P. High-resolution homozygosity mapping is a powerful tool to detect novel mutations causative of autosomal recessive RP in the Dutch population. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 2227-39 (2011).
- Collins, C., Hutchinson, G., Kowbel, D., Riess, O., Weber, B., Hayden, M. R. The human beta-subunit of rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase: complete retinal cDNA sequence and evidence for expression in brain. *Genomics*, 13, 698-704 (1992).
- Coppieters, F., Leroy, B. P., Beysen, D., Hellemans, J., De Bosscher, K., Haegeman, G., Robberecht, K., Wuyts, W., Coucke, P. J., De Baere, E. 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 (2007).
- Cornwall, M. C., Fain, G. L. Bleached pigment activates transduction in isolated rods of the salamander retina. *J Physiol*, 480 (Pt 2), 261-79 (1994).
- Cremers, F. P., Van De Pol, D. J., Van Driel, M., Den Hollander, A. I., Van Haren, F. J., Knoers, N. V., Tijmes, N., Bergen, A. A., Rohrschneider, K., Blankenagel, A., Pinckers, A. J., Deutman, A. F., Hoyng, C. B. Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. *Hum Mol Genet*, 7, 355-62 (1998).
- Cukkemane, A., Seifert, R., Kaupp, U. B. Cooperative and uncooperative cyclic-nucleotide-gated ion channels. *Trends Biochem Sci*, 36, 55-64 (2011).
- Cutler, D. Acupuncture and opioids. *Trends Pharmacol Sci*, 22, 400-1 (2001).
- Cheng, H., Khanna, H., Oh, E. C., Hicks, D., Mitton, K. P., Swaroop, A. Photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 functions as a transcriptional activator in rod photoreceptors. *Hum Mol Genet*, 13, 1563-75 (2004).
- Churchill, J. D., Bowne, S. J., Sullivan, L. S., Lewis, R. A., Wheaton, D. K., Birch, D. G., Branham, K. E., Heckenlively, J. R., Daiger, S. P. Mutations in the X-linked retinitis pigmentosa genes RPGR and RP2 found in 8.5% of families with a provisional diagnosis of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54, 1411-6 (2013).
- Daiger, S. P., Bowne, S. J., Sullivan, L. S. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*, 125, 151-8 (2007).
- Daiger, S. P., Sullivan, L. S., Bowne, S. J. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clin Genet*, 84, 132-41 (2013).
- Danciger, M., Blaney, J., Gao, Y. Q., Zhao, D. Y., Heckenlively, J. R., Jacobson, S. G., Farber, D. B. Mutations in the PDE6B gene in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Genomics*, 30, 1-7 (1995).
- Darnall, H. J., Lythgoe, J. N. The spectral clustering of visual pigments. *Vision Res*, 5, 81-100 (1965).
- Demirci, F. Y., Rigatti, B. W., Wen, G., Radak, A. L., Mah, T. S., Baic, C. L., Traboulsi, E. I., Alitalo, T., Ramser, J., Gorin, M. B. X-linked cone-rod dystrophy (locus

- COD1): identification of mutations in RPGR exon ORF15. *Am J Hum Genet*, 70, 1049-53 (2002).
- Den Hollander, A. I., Black, A., Bennett, J., 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 (2010).
- 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., Handford, P. A., Roepman, R., Cremers, F. P. CRB1 mutation spectrum in inherited retinal dystrophies. *Hum Mutat*, 24, 355-69 (2004).
- 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., Wissinger, B., Cruysberg, J. R., Deutman, A. F., Brunner, H. G., Apfelstedt-Sylla, E., Hoyng, C. B., Cremers, F. P. 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 (2001a).
- Den Hollander, A. I., Johnson, K., De Kok, Y. J., Klebes, A., Brunner, H. G., Knust, E., Cremers, F. P. CRB1 has a cytoplasmic domain that is functionally conserved between human and Drosophila. *Hum Mol Genet*, 10, 2767-73 (2001b).
- Den Hollander, A. I., Koenekoop, R. K., Yzer, S., Lopez, I., Arends, M. L., Voeselek, K. E., Zonneveld, M. N., Strom, T. M., Meitinger, T., Brunner, H. G., Hoyng, C. B., Van Den Born, L. I., Rohrschneider, K., Cremers, F. P. Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet*, 79, 556-61 (2006).
- 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., Musarella, M. A., Van Den Born, L. I., Fishman, G. A., Maumenee, I. H., Rohrschneider, K., Cremers, F. P., Koenekoop, R. K. 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 (2007).
- 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., Hoyng, C. B., Westerveld, A., Brunner, H. G., Bleeker-Wagemakers, E. M., Deutman, A. F., Heckenlively, J. R., Cremers, F. P., Bergen, A. A. Mutations in a human homologue of Drosophila crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat Genet*, 23, 217-21 (1999).
- Dev Borman, A., Ocaka, L. A., Mackay, D. S., Ripamonti, C., Henderson, R. H., Moradi, P., Hall, G., Black, G. C., Robson, A. G., Holder, G. E., Webster, A. R., Fitzke, F., Stockman, A., Moore, A. T. Early onset retinal dystrophy due to mutations in LRAT: molecular analysis and detailed phenotypic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53, 3927-38 (2012).
- Dhallan, R. S., Macke, J. P., Eddy, R. L., Shows, T. B., Reed, R. R., Yau, K. W., Nathans, J. Human rod photoreceptor cGMP-gated channel: amino acid sequence, gene structure, and functional expression. *J Neurosci*, 12, 3248-56 (1992).

- Di Palma, F., Holme, R. H., Bryda, E. C., Belyantseva, I. A., Pellegrino, R., Kachar, B., Steel, K. P., Noben-Trauth, K. Mutations in *Cdh23*, encoding a new type of cadherin, cause stereocilia disorganization in waltzer, the mouse model for Usher syndrome type 1D. *Nat Genet*, 27, 103-7 (2001).
- Dowling, J. E. *The Retina: An Approachable Part of the Brain*, Belknap Press of Harvard University Press (1987).
- Dreyer, B., Tranebjaerg, L., Brox, V., Rosenberg, T., Moller, C., Beneyto, M., Weston, M. D., Kimberling, W. J., Cremers, C. W., Liu, X. Z., Nilssen, O. A common ancestral origin of the frequent and widespread 2299delG *USH2A* mutation. *Am J Hum Genet*, 69, 228-34 (2001).
- Dreyer, B., Tranebjaerg, L., Rosenberg, T., Weston, M. D., Kimberling, W. J., Nilssen, O. Identification of novel *USH2A* mutations: implications for the structure of *USH2A* protein. *Eur J Hum Genet*, 8, 500-6 (2000).
- Dry, K. L., Manson, F. D., Lennon, A., Bergen, A. A., Van Dorp, D. B., Wright, A. F. Identification of a 5' splice site mutation in the *RPGR* gene in a family with X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Hum Mutat*, 13, 141-5 (1999).
- Dryja, T. P., Berson, E. L., Rao, V. R., Oprian, D. D. Heterozygous missense mutation in the rhodopsin gene as a cause of congenital stationary night blindness. *Nat Genet*, 4, 280-3 (1993).
- Dryja, T. P., Hahn, L. B., Cowley, G. S., Mcgee, T. L., Berson, E. L. Mutation spectrum of the rhodopsin gene among patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 9370-4 (1991).
- Dryja, T. P., Hahn, L. B., Kajiwarra, K., Berson, E. L. Dominant and digenic mutations in the peripherin/RDS and *ROM1* genes in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38, 1972-82 (1997).
- Dryja, T. P., Li, T. Molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet*, 4 Spec No, 1739-43 (1995).
- Dryja, T. P., Mcgee, T. L., Reichel, E., Hahn, L. B., Cowley, G. S., Yandell, D. W., Sandberg, M. A., Berson, E. L. A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature*, 343, 364-6 (1990).
- Ebermann, I., Phillips, J. B., Liebau, M. C., Koenekoop, R. K., Schermer, B., Lopez, I., Schafer, E., Roux, A. F., Dafinger, C., Bernd, A., Zrenner, E., Claustres, M., Blanco, B., Nurnberg, G., Nurnberg, P., Ruland, R., Westerfield, M., Benzing, T., Bolz, H. J. *PDZD7* is a modifier of retinal disease and a contributor to digenic Usher syndrome. *J Clin Invest*, 120, 1812-23 (2010).
- Eichers, E. R., Green, J. S., Stockton, D. W., Jackman, C. S., Whelan, J., Mcnamara, J. A., Johnson, G. J., Lupski, J. R., Katsanis, N. Newfoundland rod-cone dystrophy, an early-onset retinal dystrophy, is caused by splice-junction mutations in *RLBP1*. *Am J Hum Genet*, 70, 955-64 (2002).
- Escher, P., Gouras, P., Roduit, R., Tiab, L., Bolay, S., Delarive, T., Chen, S., Tsai, C. C., Hayashi, M., Zernant, J., Merriam, J. E., Mermod, N., Allikmets, R., Munier, F. L., Schorderet, D. F. Mutations in *NR2E3* can cause dominant or recessive retinal degenerations in the same family. *Hum Mutat*, 30, 342-51 (2009).

- Estrada-Cuzcano, A., Koenekoop, R. K., Senechal, A., De Baere, E. B., De Ravel, T., Banfi, S., Kohl, S., Ayuso, C., Sharon, D., Hoyng, C. B., Hamel, C. P., Leroy, B. P., Ziviello, C., Lopez, I., Bazinet, A., Wissinger, B., Sliesoraityte, I., Avila-Fernandez, A., Littink, K. W., Vingolo, E. M., Signorini, S., Banin, E., Mizrahi-Meissonnier, L., Zrenner, E., Kellner, U., Collin, R. W., Den Hollander, A. I., Cremers, F. P., Klevering, B. J. BBS1 mutations in a wide spectrum of phenotypes ranging from nonsyndromic retinitis pigmentosa to Bardet-Biedl syndrome. *Arch Ophthalmol*, 130, 1425-32 (2012a).
- Estrada-Cuzcano, A., Roepman, R., Cremers, F. P., Den Hollander, A. I., Mans, D. A. Non-syndromic retinal ciliopathies: translating gene discovery into therapy. *Hum Mol Genet*, 21, R111-24 (2012b).
- Fargeas, C. A., Joester, A., Missol-Kolka, E., Hellwig, A., Huttner, W. B., Corbeil, D. Identification of novel Prominin-1/CD133 splice variants with alternative C-termini and their expression in epididymis and testis. *J Cell Sci*, 117, 4301-11 (2004).
- Farrar, G. J., Kenna, P., Redmond, R., McWilliam, P., Bradley, D. G., Humphries, M. M., Sharp, E. M., Inglehearn, C. F., Bashir, R., Jay, M., Et Al. Autosomal dominant retinitis pigmentosa: absence of the rhodopsin proline---histidine substitution (codon 23) in pedigrees from Europe. *Am J Hum Genet*, 47, 941-5 (1990).
- Fedan, J. S., Cutler, D. Hard metal-induced disease: effects of metal cations in vitro on guinea pig isolated airways. *Toxicol Appl Pharmacol*, 174, 199-206 (2001).
- Ferre, F., Clote, P. DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Res*, 33, W230-2 (2005).
- Fishman, G. A., Roberts, M. F., Derlacki, D. J., Grimsby, J. L., Yamamoto, H., Sharon, D., Nishiguchi, K. M., Dryja, T. P. 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 (2004).
- Fliegau, M., Benzing, T., Omran, H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 880-93 (2007).
- Forsythe, E., Beales, P. L. Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet*, 21, 8-13 (2013).
- Frings, S. Primary processes in sensory cells: current advances. *Adv Exp Med Biol*, 739, 32-58 (2012).
- Fu, Y., Yau, K. W. Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflugers Arch*, 454, 805-19 (2007).
- Fukui, T., Yamamoto, S., Nakano, K., Tsujikawa, M., Morimura, H., Nishida, K., Ohguro, N., Fujikado, T., Irifune, M., Kuniyoshi, K., Okada, A. A., Hirakata, A., Miyake, Y., Tano, Y. ABCA4 gene mutations in Japanese patients with Stargardt disease and retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 2819-24 (2002).
- Gal, A., Li, Y., Thompson, D. A., Weir, J., Orth, U., Jacobson, S. G., Apfelstedt-Sylla, E., Vollrath, D. Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 26, 270-1 (2000).

- Gal, A., Orth, U., Baehr, W., Schwinger, E., Rosenberg, T. Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in autosomal dominant stationary night blindness. *Nat Genet*, 7, 551 (1994).
- Gao, Y. Q., Danciger, M., Zhao, D. Y., Blaney, J., Piriev, N. I., Shih, J., Jacobson, S. G., Heckenlively, J. H., Farber, D. B. Screening of the PDE6B gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Exp Eye Res*, 62, 149-54 (1996).
- Garcia-Garcia, G., Aparisi, M. J., Jaijo, T., Rodrigo, R., Leon, A. M., Avila-Fernandez, A., Blanco-Kelly, F., Bernal, S., Navarro, R., Diaz-Llopis, M., Baiget, M., Ayuso, C., Millan, J. M., Aller, E. Mutational screening of the USH2A gene in Spanish USH patients reveals 23 novel pathogenic mutations. *Orphanet J Rare Dis*, 6, 65 (2011).
- Geng, R., Sotomayor, M., Kinder, K. J., Gopal, S. R., Gerka-Stuyt, J., Chen, D. H., Hardisty-Hughes, R. E., Ball, G., Parker, A., Gaudet, R., Furness, D., Brown, S. D., Corey, D. P., Alagramam, K. N. Noddy, a mouse harboring a missense mutation in protocadherin-15, reveals the impact of disrupting a critical interaction site between tip-link cadherins in inner ear hair cells. *J Neurosci*, 33, 4395-404 (2013).
- Gerber, S., Rozet, J. M., Takezawa, S. I., Dos Santos, L. C., Lopes, L., Gribouval, O., Penet, C., Perrault, I., Ducroq, D., Souied, E., Jeanpierre, M., Romana, S., Frezal, J., Ferraz, F., Yu-Umesono, R., Munnich, A., Kaplan, J. The photoreceptor cell-specific nuclear receptor gene (PNR) accounts for retinitis pigmentosa in the Crypto-Jews from Portugal (Marranos), survivors from the Spanish Inquisition. *Hum Genet*, 107, 276-84 (2000).
- Gerber, S., Rozet, J. M., Van De Pol, T. J., Hoyng, C. B., Munnich, A., Blankenagel, A., Kaplan, J., Cremers, F. P. Complete exon-intron structure of the retina-specific ATP binding transporter gene (ABCR) allows the identification of novel mutations underlying Stargardt disease. *Genomics*, 48, 139-42 (1998).
- Gherman, A., Davis, E. E., Katsanis, N. The ciliary proteome database: an integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia. *Nat Genet*, 38, 961-2 (2006).
- Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H. G., Veltman, J. A. Unlocking Mendelian disease using exome sequencing. *Genome Biol*, 12, 228 (2011).
- Gire, A. I., Sullivan, L. S., Bowne, S. J., Birch, D. G., Hughbanks-Wheaton, D., Heckenlively, J. R., Daiger, S. P. The Gly56Arg mutation in NR2E3 accounts for 1-2% of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Vis*, 13, 1970-5 (2007).
- Glenn, T. C. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour*, 11, 759-69 (2011).
- Glockle, N., Kohl, S., Mohr, J., Scheurenbrand, T., Sprecher, A., Weisschuh, N., Bernd, A., Rudolph, G., Schubach, M., Poloschek, C., Zrenner, E., Biskup, S., Berger, W., Wissinger, B., Neidhardt, J. Panel-based next generation sequencing as a reliable and efficient technique to detect mutations in unselected patients with retinal dystrophies. *Eur J Hum Genet*, (2013).
- Gollapalli, D. R., Maiti, P., Rando, R. R. RPE65 operates in the vertebrate visual cycle by stereospecifically binding all-trans-retinyl esters. *Biochemistry*, 42, 11824-30 (2003).

- Gonzalez-Del Pozo, M., Borrego, S., Barragan, I., Pieras, J. I., Santoyo, J., Matamala, N., Naranjo, B., Dopazo, J., Antinolo, G. Mutation screening of multiple genes in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa by targeted resequencing. *PLoS One*, 6, e27894 (2011).
- Gonzalez-Del Pozo, M., Mendez-Vidal, C., Santoyo-Lopez, J., Vela-Boza, A., Bravo-Gi, N., Rueda, A., García-Alonso, L., Vázquez-Marouschek, C., Dopazo, J., Borrego, S., Antinolo, G. Deciphering intrafamilial phenotypic variability by exome sequencing in a Bardet–Biedl family. *Mol Genet Genomic Med*, In press (2014).
- Grossman, G. H., Pauer, G. J., Narendra, U., Hagstrom, S. A. Tubby-like protein 1 (Tulp1) is required for normal photoreceptor synaptic development. *Adv Exp Med Biol*, 664, 89-96 (2010).
- Hagstrom, S. A., North, M. A., Nishina, P. L., Berson, E. L., Dryja, T. P. Recessive mutations in the gene encoding the tubby-like protein TULP1 in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 18, 174-6 (1998).
- Hagstrom, S. A., Watson, R. F., Pauer, G. J., Grossman, G. H. Tulp1 is involved in specific photoreceptor protein transport pathways. *Adv Exp Med Biol*, 723, 783-9 (2012).
- Haider, N. B., Jacobson, S. G., Cideciyan, A. V., Swiderski, R., Streb, L. M., Searby, C., Beck, G., Hockey, R., Hanna, D. B., Gorman, S., Duhl, D., Carmi, R., Bennett, J., Weleber, R. G., Fishman, G. A., Wright, A. F., Stone, E. M., Sheffield, V. C. Mutation of a nuclear receptor gene, NR2E3, causes enhanced S cone syndrome, a disorder of retinal cell fate. *Nat Genet*, 24, 127-31 (2000).
- Haim, M. Retinitis pigmentosa: problems associated with genetic classification. *Clin Genet*, 44, 62-70 (1993).
- Haim, M. Epidemiology of retinitis pigmentosa in Denmark. *Acta Ophthalmol Scand Suppl*, 1-34 (2002).
- Hamel, C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis*, 1, 40 (2006).
- Hamel, C. P., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Redmond, T. M. The gene for the retinal pigment epithelium-specific protein RPE65 is localized to human 1p31 and mouse 3. *Genomics*, 20, 509-12 (1994).
- Hamel, C. P., Tsilou, E., Pfeffer, B. A., Hooks, J. J., Detrick, B., Redmond, T. M. 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 (1993).
- Hamm, H. E. How activated receptors couple to G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 4819-21 (2001).
- Hanein, S., Perrault, I., Gerber, S., Tanguy, G., Barbet, F., Ducroq, D., Calvas, P., Dollfus, H., Hamel, C., Lopponen, T., Munier, F., Santos, L., Shalev, S., Zafeiriou, D., Dufier, J. L., Munnich, A., Rozet, J. M., Kaplan, J. Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. *Hum Mutat*, 23, 306-17 (2004).

- Hao, W., Fong, H. K. Blue and ultraviolet light-absorbing opsin from the retinal pigment epithelium. *Biochemistry*, 35, 6251-6 (1996).
- Hao, W., Fong, H. K. The endogenous chromophore of retinal G protein-coupled receptor opsin from the pigment epithelium. *J Biol Chem*, 274, 6085-90 (1999).
- Hartong, D. T., Berson, E. L., Dryja, T. P. Retinitis pigmentosa. *Lancet*, 368, 1795-809 (2006).
- Hartong, D. T., Dange, M., Mcgee, T. L., Berson, E. L., Dryja, T. P., Colman, R. F. Insights from retinitis pigmentosa into the roles of isocitrate dehydrogenases in the Krebs cycle. *Nat Genet*, 40, 1230-4 (2008).
- Hauswirth, W. W., Aleman, T. S., Kaushal, S., Cideciyan, A. V., Schwartz, S. B., Wang, L., Conlon, T. J., Boye, S. L., Flotte, T. R., Byrne, B. J., Jacobson, S. G. Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther*, 19, 979-90 (2008).
- Hebsgaard, S. M., Korning, P. G., Tolstrup, N., Engelbrecht, J., Rouze, P., Brunak, S. Splice site prediction in Arabidopsis thaliana pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Res*, 24, 3439-52 (1996).
- Henderson, R. H., Li, Z., Abd El Aziz, M. M., Mackay, D. S., Eljinini, M. A., Zeidan, M., Moore, A. T., Bhattacharya, S. S., Webster, A. R. Biallelic mutation of protocadherin-21 (PCDH21) causes retinal degeneration in humans. *Mol Vis*, 16, 46-52 (2010).
- Hessel, E., Muller, P., Herrmann, A., Hofmann, K. P. Light-induced reorganization of phospholipids in rod disc membranes. *J Biol Chem*, 276, 2538-43 (2001).
- Hims, M. M., Diager, S. P., Inglehearn, C. F. Retinitis pigmentosa: genes, proteins and prospects. *Dev Ophthalmol*, 37, 109-25 (2003).
- Hirayama, S., Yamazaki, Y., Kitamura, A., Oda, Y., Morito, D., Okawa, K., Kimura, H., Cyr, D. M., Kubota, H., Nagata, K. MKKS is a centrosome-shuttling protein degraded by disease-causing mutations via CHIP-mediated ubiquitination. *Mol Biol Cell*, 19, 899-911 (2008).
- Hirayama, T., Sasaki, A., Yagi, T. Evaluation of somatic alterations of Pcdh-alpha transcripts in the brain by cDNA analysis without PCR. *Genes Cells*, 11, 95-7 (2006).
- Hirayama, T., Tarusawa, E., Yoshimura, Y., Galjart, N., Yagi, T. CTCF is required for neural development and stochastic expression of clustered Pcdh genes in neurons. *Cell Rep*, 2, 345-57 (2012).
- Hjortshoj, T. D., Gronskov, K., Philp, A. R., Nishimura, D. Y., Riise, R., Sheffield, V. C., Rosenberg, T., Brondum-Nielsen, K. Bardet-Biedl syndrome in Denmark--report of 13 novel sequence variations in six genes. *Hum Mutat*, 31, 429-36 (2010).
- Hmani-Aifa, M., Benzina, Z., Zulfiqar, F., Dhoub, H., Shahzadi, A., Ghorbel, A., Rebai, A., Soderkvist, P., Riazuddin, S., Kimberling, W. J., Ayadi, H. Identification of two new mutations in the GPR98 and the PDE6B genes segregating in a Tunisian family. *Eur J Hum Genet*, 17, 474-82 (2009).

- Hoefele, J., Otto, E., Felten, H., Kuhn, K., Bley, T. A., Zauner, I., Hildebrandt, F., Neumann, H. P. Clinical and histological presentation of 3 sibilings with mutations in the NPHP4 gene. *Am J Kidney Dis*, 43, 358-64 (2004).
- Hong, D. H., Li, T. Complex expression pattern of RPGR reveals a role for purine-rich exonic splicing enhancers. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 3373-82 (2002).
- Hosono, K., Ishigami, C., Takahashi, M., Park, D. H., Hiram, Y., Nakanishi, H., Ueno, S., Yokoi, T., Hikoya, A., Fujita, T., Zhao, Y., Nishina, S., Shin, J. P., Kim, I. T., Yamamoto, S., Azuma, N., Terasaki, H., Sato, M., Kondo, M., Minoshima, S., Hotta, Y. Two novel mutations in the EYS gene are possible major causes of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Japanese population. *PLoS One*, 7, e31036 (2012).
- Huang, J. C., Arden, G. B., Voaden, M. J., Marshall, J. Survival of cone responses in postmortem human retina. *Doc Ophthalmol*, 83, 91-6 (1993).
- Huang, Y., Zhang, J., Li, C., Yang, G., Liu, M., Wang, Q. K., 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 (2010).
- Imai, H., Kefalov, V., Sakurai, K., Chisaka, O., Ueda, Y., Onishi, A., Morizumi, T., Fu, Y., Ichikawa, K., Nakatani, K., Honda, Y., Chen, J., Yau, K. W., Shichida, Y. Molecular properties of rhodopsin and rod function. *J Biol Chem*, 282, 6677-84 (2007).
- Indelman, M., Bergman, R., Lurie, R., Richard, G., Miller, B., Petronius, D., Ciubutaro, D., Leib, R., Sprecher, E. A missense mutation in CDH3, encoding P-cadherin, causes hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *J Invest Dermatol*, 119, 1210-3 (2002).
- Inglehearn, C. F. Molecular genetics of human retinal dystrophies. *Eye (Lond)*, 12 (Pt 3b), 571-9 (1998).
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., (1990) Optimization of PCRs. *In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J.J., White, T. J. (ed.) PCR protocols: a guide to methods and applications.* Academic Press, San Diego, CA: Harcourt Brace Jovanovich, publishers.
- Isackson, P. J., Ochs-Balcom, H. M., Ma, C., Harley, J. B., Peltier, W., Tarnopolsky, M., Sripathi, N., Wortmann, R. L., Simmons, Z., Wilson, J. D., Smith, S. A., Barboi, A., Fine, E., Baer, A., Baker, S., Kaufman, K., Cobb, B., Kilpatrick, J. R., Vladutiu, G. D. Association of common variants in the human eyes shut ortholog (EYS) with statin-induced myopathy: evidence for additional functions of EYS. *Muscle Nerve*, 44, 531-8 (2011).
- Ishikawa, K., Nagase, T., Suyama, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., Ohara, O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. X. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. *DNA Res*, 5, 169-76 (1998).
- Iwanami, M., Oshikawa, M., Nishida, T., Nakadomari, S., Kato, S. High prevalence of mutations in the EYS gene in Japanese patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53, 1033-40 (2012).

- Jahng, W. J., David, C., Nesnas, N., Nakanishi, K., Rando, R. R. A cleavable affinity biotinylating agent reveals a retinoid binding role for RPE65. *Biochemistry*, 42, 6159-68 (2003).
- Jaijo, T., Aller, E., Garcia-Garcia, G., Aparisi, M. J., Bernal, S., Avila-Fernandez, A., Barragan, I., Baiget, M., Ayuso, C., Antinolo, G., Diaz-Llopis, M., Kulm, M., Beneyto, M., Najera, C., Millan, J. M. Microarray-based mutation analysis of 183 Spanish families with Usher syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 1311-7 (2010).
- 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., Wissinger, B., Nurnberg, P., Gal, A. Mutations in RDH12 encoding a photoreceptor cell retinol dehydrogenase cause childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet*, 36, 850-4 (2004).
- Jaszai, J., Fargeas, C. A., Florek, M., Huttner, W. B., Corbeil, D. Focus on molecules: prominin-1 (CD133). *Exp Eye Res*, 85, 585-6 (2007).
- Jiang, M., Pandey, S., Fong, H. K. An opsin homologue in the retina and pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34, 3669-78 (1993).
- Jin, H., White, S. R., Shida, T., Schulz, S., Aguiar, M., Gygi, S. P., Bazan, J. F., Nachury, M. V. The conserved Bardet-Biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia. *Cell*, 141, 1208-19 (2010).
- Kaiserman, N., Obolensky, A., Banin, E., Sharon, D. Novel USH2A mutations in Israeli patients with retinitis pigmentosa and Usher syndrome type 2. *Arch Ophthalmol*, 125, 219-24 (2007).
- Kajiwara, K., Berson, E. L., Dryja, T. P. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science*, 264, 1604-8 (1994).
- Kalled, S. L., Cutler, A. H., Burkly, L. C. Apoptosis and altered dendritic cell homeostasis in lupus nephritis are limited by anti-CD154 treatment. *J Immunol*, 167, 1740-7 (2001).
- 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., Cremers, F. P., Roepman, R., Wijnholds, J. MPP5 recruits MPP4 to the CRB1 complex in photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 2192-201 (2005).
- Karaman, M. W., Groshen, S., Lee, C. C., Pike, B. L., Hacia, J. G. Comparisons of substitution, insertion and deletion probes for resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res*, 33, e33 (2005).
- Katsanis, N. The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet*, 13 Spec No 1, R65-71 (2004).
- Katsanis, N., Ansley, S. J., Badano, J. L., Eichers, E. R., Lewis, R. A., Hoskins, B. E., Scambler, P. J., Davidson, W. S., Beales, P. L., Lupski, J. R. Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science*, 293, 2256-9 (2001).
- Kaupp, U. B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bonigk, W., Stuhmer, W., Cook, N. J., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T., Et Al. Primary structure and functional

- expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature*, 342, 762-6 (1989).
- Kefalov, V. J., Cornwall, M. C., Fain, G. L. Physiological studies of the interaction between opsin and chromophore in rod and cone visual pigments. *Methods Mol Biol*, 652, 95-114 (2010).
- Khaliq, S., Hameed, A., Ismail, M., Mehdi, S. Q., Bessant, D. A., Payne, A. M., Bhattacharya, S. S. 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 (1999).
- Khan, M. I., Kersten, F. F., Azam, M., Collin, R. W., Hussain, A., Shah, S. T., Keunen, J. E., Kremer, H., Cremers, F. P., Qamar, R., Den Hollander, A. I. CLRN1 mutations cause nonsyndromic retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*, 118, 1444-8 (2011).
- Khanna, H., Davis, E. E., Murga-Zamalloa, C. A., Estrada-Cuzcano, A., Lopez, I., Den Hollander, A. I., Zonneveld, M. N., Othman, M. I., Waseem, N., Chakarova, C. F., Maubaret, C., Diaz-Font, A., Macdonald, I., Muzny, D. M., Wheeler, D. A., Morgan, M., Lewis, L. R., Logan, C. V., Tan, P. L., Beer, M. A., Inglehearn, C. F., Lewis, R. A., Jacobson, S. G., Bergmann, C., Beales, P. L., Attie-Bitach, T., Johnson, C. A., Otto, E. A., Bhattacharya, S. S., Hildebrandt, F., Gibbs, R. A., Koenekoop, R. K., Swaroop, A., Katsanis, N. A common allele in RPGRIP1L is a modifier of retinal degeneration in ciliopathies. *Nat Genet*, 41, 739-45 (2009).
- Khanna, H., Hurd, T. W., Lillo, C., Shu, X., Parapuram, S. K., He, S., Akimoto, M., Wright, A. F., Margolis, B., Williams, D. S., Swaroop, A. RPGR-ORF15, which is mutated in retinitis pigmentosa, associates with SMC1, SMC3, and microtubule transport proteins. *J Biol Chem*, 280, 33580-7 (2005).
- Kim, Y. O., Park, S. H., Kang, Y. J., Koh, H. J., Kim, S. H., Park, S. Y., Sohn, U., Huh, T. L. Assignment of mitochondrial NAD(+)-specific isocitrate dehydrogenase beta subunit gene (IDH3B) to human chromosome band 20p13 by in situ hybridization and radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet*, 86, 240-1 (1999).
- Kjaer, K. W., Hansen, L., Schwabe, G. C., Marques-De-Faria, A. P., Eiberg, H., Mundlos, S., Tommerup, N., Rosenberg, T. Distinct CDH3 mutations cause ectodermal dysplasia, ectrodactyly, macular dystrophy (EEM syndrome). *J Med Genet*, 42, 292-8 (2005).
- Klambauer, G., Schwarzbauer, K., Mayr, A., Clevert, D. A., Mitterecker, A., Bodenhofer, U., Hochreiter, S. cn.MOPS: mixture of Poissons for discovering copy number variations in next-generation sequencing data with a low false discovery rate. *Nucleic Acids Res*, 40, e69 (2012).
- Klevering, B. J., Deutman, A. F., Maugeri, A., Cremers, F. P., Hoyng, C. B. The spectrum of retinal phenotypes caused by mutations in the ABCA4 gene. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 243, 90-100 (2005).
- Klevering, B. J., Yzer, S., Rohrschneider, K., Zonneveld, M., Allikmets, R., Van Den Born, L. I., Maugeri, A., Hoyng, C. B., Cremers, F. P. 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 (2004).

- Kniazeva, M., Chiang, M. F., Morgan, B., Anduze, A. L., Zack, D. J., Han, M., Zhang, K. A new locus for autosomal dominant stargardt-like disease maps to chromosome 4. *Am J Hum Genet*, 64, 1394-9 (1999).
- Kobayashi, M., Takezawa, S., Hara, K., Yu, R. T., Umesono, Y., Agata, K., Taniwaki, M., Yasuda, K., Umesono, K. Identification of a photoreceptor cell-specific nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 4814-9 (1999).
- Kolesnikov, A. V., Golobokova, E. Y., Govardovskii, V. I. The identity of metarhodopsin III. *Vis Neurosci*, 20, 249-65 (2003).
- Kothiyal, P., Cox, S., Ebert, J., Husami, A., Kenna, M. A., Greinwald, J. H., Aronow, B. J., Rehm, H. L. High-throughput detection of mutations responsible for childhood hearing loss using resequencing microarrays. *BMC Biotechnol*, 10, 10 (2010).
- Krebs, W., Krebs, I. P. (1982) Quantitative morphology of the bovine eye. . In: Jg, H. (ed.) *The Structure of the Eye*. New York: Elsevier Biomedical.
- Kuhn, H., Wilden, U. Deactivation of photoactivated rhodopsin by rhodopsin-kinase and arrestin. *J Recept Res*, 7, 283-98 (1987).
- Kumar, P., Henikoff, S., Ng, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*, 4, 1073-81 (2009).
- Kumaramanickavel, G., Maw, M., Denton, M. J., John, S., Srikumari, C. R., Orth, U., Oehlmann, R., Gal, A. Missense rhodopsin mutation in a family with recessive RP. *Nat Genet*, 8, 10-1 (1994).
- La Cour, M., Tezel, T. H. (2005) The Retinal Pigment Epithelium. In: Fischbarg, J. (ed.) *Advances in Organ Biology*. Elsevier.
- Lamb, T. D., Pugh, E. N., Jr. G-protein cascades: gain and kinetics. *Trends Neurosci*, 15, 291-8 (1992).
- Lamb, T. D., Pugh, E. N., Jr. Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 5137-52 (2006).
- Lavail, M. M., Yasumura, D., Matthes, M. T., Lau-Villacorta, C., Unoki, K., Sung, C. H., Steinberg, R. H. Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39, 592-602 (1998).
- Le Quesne Stabej, P., Saihan, Z., Rangesh, N., Steele-Stallard, H. B., Ambrose, J., Coffey, A., Emmerson, J., Haralambous, E., Hughes, Y., Steel, K. P., Luxon, L. M., Webster, A. R., Bitner-Glindzicz, M. Comprehensive sequence analysis of nine Usher syndrome genes in the UK National Collaborative Usher Study. *J Med Genet*, 49, 27-36 (2012).
- Lelli, A., Kazmierczak, P., Kawashima, Y., Muller, U., Holt, J. R. Development and regeneration of sensory transduction in auditory hair cells requires functional interaction between cadherin-23 and protocadherin-15. *J Neurosci*, 30, 11259-69 (2010).
- Lewis, R. A., Shroyer, N. F., Singh, N., Allikmets, R., Hutchinson, A., Li, Y., Lupski, J. R., Leppert, M., Dean, M. Genotype/Phenotype analysis of a photoreceptor-

- specific ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, in Stargardt disease. *Am J Hum Genet*, 64, 422-34 (1999).
- Li, Y., Dong, B., Hu, A. L., Cui, T. T., Zheng, Y. Y. A novel RPGR gene mutation in a Chinese family with X-linked dominant retinitis pigmentosa. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 22, 396-8 (2005).
- Li, Y., Marcos, I., Borrego, S., Yu, Z., Zhang, K., Antinolo, G. Evaluation of the ELOVL4 gene in families with retinitis pigmentosa linked to the RP25 locus. *J Med Genet*, 38, 478-80 (2001).
- Lindahl, L., Post, L., Zengel, J., Gilbert, S. F., Strycharz, W. A., Nomura, M. Mapping of ribosomal protein genes by in vitro protein synthesis using DNA fragments of lambda_{dafus3} transducing phage DNA as templates. *J Biol Chem*, 252, 7365-83 (1977).
- Littink, K. W., Pott, J. W., Collin, R. W., Kroes, H. Y., Verheij, J. B., Blokland, E. A., De Castro Miro, M., Hoyng, C. B., Klaver, C. C., Koenekoop, R. K., Rohrschneider, K., Cremers, F. P., Van Den Born, L. I., Den Hollander, A. I. A novel nonsense mutation in CEP290 induces exon skipping and leads to a relatively mild retinal phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 3646-52 (2010a).
- 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., Den Hollander, A. I., Klevering, B. J. Mutations in the EYS gene account for approximately 5% of autosomal recessive retinitis pigmentosa and cause a fairly homogeneous phenotype. *Ophthalmology*, 117, 2026-33, 2033 e1-7 (2010b).
- Liu, C., Aronow, B. J., Jegga, A. G., Wang, N., Miethke, A., Mourya, R., Bezerra, J. A. Novel resequencing chip customized to diagnose mutations in patients with inherited syndromes of intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology*, 132, 119-26 (2007a).
- Liu, X., Bulgakov, O. V., Darrow, K. N., Pawlyk, B., Adamian, M., Liberman, M. C., Li, T. Usherin is required for maintenance of retinal photoreceptors and normal development of cochlear hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 4413-8 (2007b).
- Liu, X. Z., Hope, C., Liang, C. Y., Zou, J. M., Xu, L. R., Cole, T., Mueller, R. F., Bunday, S., Nance, W., Steel, K. P., Brown, S. D. A mutation (2314delG) in the Usher syndrome type IIA gene: high prevalence and phenotypic variation. *Am J Hum Genet*, 64, 1221-5 (1999).
- Liu, X. Z., Walsh, J., Mburu, P., Kendrick-Jones, J., Cope, M. J., Steel, K. P., Brown, S. D. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet*, 16, 188-90 (1997).
- Lorenz, B., Preising, M. N. Age matters--thoughts on a grading system for ABCA4 mutations. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 243, 87-9 (2005).
- Lotery, A. J., Malik, A., Shami, S. A., Sindhi, M., Chohan, B., Maqbool, C., Moore, P. A., Denton, M. J., Stone, E. M. CRB1 mutations may result in retinitis pigmentosa without para-arteriolar RPE preservation. *Ophthalmic Genet*, 22, 163-9 (2001).

- Ma, J., Zhang, J., Othersen, K. L., Moiseyev, G., Ablonczy, Z., Redmond, T. M., Chen, Y., Crouch, R. K. Expression, purification, and MALDI analysis of RPE65. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 1429-35 (2001).
- 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., Meyer, B., Webster, A. R., Moore, A. T. Novel mutations in MERTK associated with childhood onset rod-cone dystrophy. *Mol Vis*, 16, 369-77 (2010).
- Maguire, A. M., Simonelli, F., Pierce, E. A., Pugh, E. N., Jr., Mingozzi, F., Bencicelli, J., Banfi, S., Marshall, K. A., Testa, F., Surace, E. M., Rossi, S., Lyubarsky, A., Arruda, V. R., Konkle, B., Stone, E., Sun, J., Jacobs, J., Dell'osso, L., Hertle, R., Ma, J. X., Redmond, T. M., Zhu, X., Hauck, B., Zeleniaia, O., Shindler, K. S., Maguire, M. G., Wright, J. F., Volpe, N. J., McDonnell, J. W., Auricchio, A., High, K. A., Bennett, J. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*, 358, 2240-8 (2008).
- Mamanova, L., Coffey, A. J., Scott, C. E., Kozarewa, I., Turner, E. H., Kumar, A., Howard, E., Shendure, J., Turner, D. J. Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat Methods*, 7, 111-8 (2010).
- Mandal, M. N., Heckenlively, J. R., Burch, T., Chen, L., Vasireddy, V., Koenekoop, R. K., Sieving, P. A., Ayyagari, R. 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 (2005).
- Mandal, N. A., Tran, J. T., Saadi, A., Rahman, A. K., Huynh, T. P., Klein, W. H., Cho, J. H. Expression and localization of CERKL in the mammalian retina, its response to light-stress, and relationship with NeuroD1 gene. *Exp Eye Res*, 106, 24-33 (2013).
- Mariani, A. P. Photoreceptors of the larval tiger salamander retina. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 227, 483-92 (1986).
- Marlhens, F., Bareil, C., Griffoin, J. M., Zrenner, E., Amalric, P., Eliaou, C., Liu, S. Y., Harris, E., Redmond, T. M., Arnaud, B., Claustres, M., Hamel, C. P. Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet*, 17, 139-41 (1997).
- Martinez-Mir, A., Paloma, E., Allikmets, R., Ayuso, C., Del Rio, T., Dean, M., Vilageliu, L., Gonzalez-Duarte, R., Balcells, S. Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR. *Nat Genet*, 18, 11-2 (1998).
- Massof, R. W., Finkelstein, D. Supplemental vitamin A retards loss of ERG amplitude in retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*, 111, 751-4 (1993).
- Mata, N. L., Moghrabi, W. N., Lee, J. S., Bui, T. V., Radu, R. A., Horwitz, J., Travis, G. H. Rpe65 is a retinyl ester binding protein that presents insoluble substrate to the isomerase in retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem*, 279, 635-43 (2004).
- Mataftsi, A., Schorderet, D. F., Chachoua, L., Boussalah, M., Nouri, M. T., Barthelmes, D., Borruat, F. X., Munier, F. L. Novel TULP1 mutation causing leber congenital amaurosis or early onset retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 5160-7 (2007).

- Maugeri, A., Klevering, B. J., Rohrschneider, K., Blankenagel, A., Brunner, H. G., Deutman, A. F., Hoyng, C. B., Cremers, F. P. Mutations in the ABCA4 (ABCR) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy. *Am J Hum Genet*, 67, 960-6 (2000).
- Maugeri, A., Van Driel, M. A., Van De Pol, D. J., Klevering, B. J., Van Haren, F. J., Tijmes, N., Bergen, A. A., Rohrschneider, K., Blankenagel, A., Pinckers, A. J., Dahl, N., Brunner, H. G., Deutman, A. F., Hoyng, C. B., Cremers, F. P. The 2588G-->C mutation in the ABCR gene is a mild frequent founder mutation in the Western European population and allows the classification of ABCR mutations in patients with Stargardt disease. *Am J Hum Genet*, 64, 1024-35 (1999).
- Maw, M., Kumaramanickavel, G., Kar, B., John, S., Bridges, R., Denton, M. Two Indian siblings with Oguchi disease are homozygous for an arrestin mutation encoding premature termination. *Hum Mutat*, Suppl 1, S317-9 (1998).
- Maw, M. A., Corbeil, D., Koch, J., Hellwig, A., Wilson-Wheeler, J. C., Bridges, R. J., Kumaramanickavel, G., John, S., Nancarrow, D., Roper, K., Weigmann, A., Huttner, W. B., Denton, M. J. A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration. *Hum Mol Genet*, 9, 27-34 (2000).
- Maw, M. A., Kennedy, B., Knight, A., Bridges, R., Roth, K. E., Mani, E. J., Mukkadan, J. K., Nancarrow, D., Crabb, J. W., Denton, M. J. Mutation of the gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 17, 198-200 (1997).
- Maxam, A. M., Gilbert, W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 560-4 (1977).
- Mcgee, T. L., Seyedahmadi, B. J., Sweeney, M. O., Dryja, T. P., 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 (2010).
- Mckay, G. J., Clarke, S., Davis, J. A., Simpson, D. A., Silvestri, G. Pigmented paravenous chorioretinal atrophy is associated with a mutation within the crumbs homolog 1 (CRB1) gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 322-8 (2005).
- Mclaughlin, M. E., Ehrhart, T. L., Berson, E. L., Dryja, T. P. 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 (1995).
- Mclaughlin, M. E., Sandberg, M. A., Berson, E. L., Dryja, T. P. Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 4, 130-4 (1993).
- Mcmillan, D. R., Kayes-Wandover, K. M., Richardson, J. A., White, P. C. Very large G protein-coupled receptor-1, the largest known cell surface protein, is highly expressed in the developing central nervous system. *J Biol Chem*, 277, 785-92 (2002).
- Mchenry, C. L., Liu, Y., Feng, W., Nair, A. R., Feathers, K. L., Ding, X., Gal, A., Vollrath, D., Sieving, P. A., Thompson, D. A. 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 (2004).
- Mears, A. J., Hiriyan, S., Vervoort, R., Yashar, B., Gieser, L., Fahrner, S., Daiger, S. P., Heckenlively, J. R., Sieving, P. A., Wright, A. F., Swaroop, A. Remapping of the RP15 locus for X-linked cone-rod degeneration to Xp11.4-p21.1, and identification of a de novo insertion in the RPGR exon ORF15. *Am J Hum Genet*, 67, 1000-3 (2000).
- Meindl, A., Dry, K., Herrmann, K., Manson, F., Ciccodicola, A., Edgar, A., Carvalho, M. R., Achatz, H., Hellebrand, H., Lennon, A., Migliaccio, C., Porter, K., Zrenner, E., Bird, A., Jay, M., Lorenz, B., Wittwer, B., D'urso, M., Meitinger, T., Wright, A. A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Nat Genet*, 13, 35-42 (1996).
- Mendes, H. F., Van Der Spuy, J., Chapple, J. P., Cheetham, M. E. Mechanisms of cell death in rhodopsin retinitis pigmentosa: implications for therapy. *Trends Mol Med*, 11, 177-85 (2005).
- Mendez-Vidal, C., Gonzalez-Del Pozo, M., Vela-Boza, A., Santoyo-Lopez, J., Lopez-Domingo, F. J., Vazquez-Marouschek, C., Dopazo, J., Borrego, S., Antinolo, G. Whole-exome sequencing identifies novel compound heterozygous mutations in USH2A in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Mol Vis*, 19, 2187-95 (2013).
- Metzker, M. L. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*, 11, 31-46 (2010).
- Meyer, D. B., May, H. C., Jr. The topographical distribution of rods and cones in the adult chicken retina. *Exp Eye Res*, 17, 347-55 (1973).
- Michaelides, M., Gaillard, M. C., Escher, P., Tiab, L., Bedell, M., Borruat, F. X., Barthelmes, D., Carmona, R., Zhang, K., White, E., McClements, M., Robson, A. G., Holder, G. E., Bradshaw, K., Hunt, D. M., Webster, A. R., Moore, A. T., Schorderet, D. F., Munier, F. L. The PROM1 mutation p.R373C causes an autosomal dominant bull's eye maculopathy associated with rod, rod-cone, and macular dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 4771-80 (2010).
- Michaelides, M., Johnson, S., Poulson, A., Bradshaw, K., Bellmann, C., Hunt, D. M., Moore, A. T. An autosomal dominant bull's-eye macular dystrophy (MCDR2) that maps to the short arm of chromosome 4. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 1657-62 (2003).
- Millan, J. M., Aller, E., Jaijo, T., Blanco-Kelly, F., Gimenez-Pardo, A., Ayuso, C. An update on the genetics of usher syndrome. *J Ophthalmol*, 2011, 417217 (2011).
- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A. H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J. T., Bray, R. A., Waller, E. K., Buck, D. W. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, 90, 5013-21 (1997).
- Mohand-Said, S., Deudon-Combe, A., Hicks, D., Simonutti, M., Forster, V., Fintz, A. C., Leveillard, T., Dreyfus, H., Sahel, J. A. Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 8357-62 (1998).

- Mollet, G., Salomon, R., Gribouval, O., Silbermann, F., Bacq, D., Landthaler, G., Milford, D., Nayir, A., Rizzoni, G., Antignac, C., Saunier, S. The gene mutated in juvenile nephronophthisis type 4 encodes a novel protein that interacts with nephrocystin. *Nat Genet*, 32, 300-5 (2002).
- Morimura, H., Berson, E. L., Dryja, T. P. 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 (1999a).
- Morimura, H., Saindelle-Ribeauveau, F., Berson, E. L., Dryja, T. P. Mutations in RGR, encoding a light-sensitive opsin homologue, in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 23, 393-4 (1999b).
- 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 Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-73 (1986).
- Mustafi, D., Engel, A. H., Palczewski, K. Structure of cone photoreceptors. *Prog Retin Eye Res*, 28, 289-302 (2009).
- Mykytyn, K., Nishimura, D. Y., Searby, C. C., Beck, G., Bugge, K., Haines, H. L., Cornier, A. S., Cox, G. F., Fulton, A. B., Carmi, R., Iannaccone, A., Jacobson, S. G., Weleber, R. G., Wright, A. F., Riise, R., Hennekam, R. C., Luleci, G., Berker-Karauzum, S., Biesecker, L. G., Stone, E. M., Sheffield, V. C. Evaluation of complex inheritance involving the most common Bardet-Biedl syndrome locus (BBS1). *Am J Hum Genet*, 72, 429-37 (2003).
- Mykytyn, K., Nishimura, D. Y., Searby, C. C., Shastri, M., Yen, H. J., Beck, J. S., Braun, T., Streb, L. M., Cornier, A. S., Cox, G. F., Fulton, A. B., Carmi, R., Luleci, G., Chandrasekharappa, S. C., Collins, F. S., Jacobson, S. G., Heckenlively, J. R., Weleber, R. G., Stone, E. M., Sheffield, V. C. Identification of the gene (BBS1) most commonly involved in Bardet-Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome. *Nat Genet*, 31, 435-8 (2002).
- Nachury, M. V., Loktev, A. V., Zhang, Q., Westlake, C. J., Peranen, J., Merdes, A., Slusarski, D. C., Scheller, R. H., Bazan, J. F., Sheffield, V. C., Jackson, P. K. A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell*, 129, 1201-13 (2007).
- Nagatsuma, K., Hayashi, Y., Hano, H., Sagara, H., Murakami, K., Saito, M., Masaki, T., Lu, T., Tanaka, M., Enzan, H., Aizawa, Y., Tajiri, H., Matsuura, T. Lecithin: retinol acyltransferase protein is distributed in both hepatic stellate cells and endothelial cells of normal rodent and human liver. *Liver Int*, 29, 47-54 (2009).
- Nasonkin, I., Illing, M., Koehler, M. R., Schmid, M., Molday, R. S., Weber, B. H. Mapping of the rod photoreceptor ABC transporter (ABCR) to 1p21-p22.1 and identification of novel mutations in Stargardt's disease. *Hum Genet*, 102, 21-6 (1998).
- Nathans, J. Rhodopsin: structure, function, and genetics. *Biochemistry*, 31, 4923-31 (1992).
- Nathans, J., Hogness, D. S. Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 4851-5 (1984).

- Neidhardt, J., Barthelmes, D., Farahmand, F., Fleischhauer, J. C., Berger, W. Different amino acid substitutions at the same position in rhodopsin lead to distinct phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 1630-5 (2006).
- Neidhardt, J., Glaus, E., Lorenz, B., Netzer, C., Li, Y., Schambeck, M., Wittmer, M., Feil, S., Kirschner-Schwabe, R., Rosenberg, T., Cremers, F. P., Bergen, A. A., Barthelmes, D., Baraki, H., Schmid, F., Tanner, G., Fleischhauer, J., Orth, U., Becker, C., Wegscheider, E., Nurnberg, G., Nurnberg, P., Bolz, H. J., Gal, A., Berger, W. Identification of novel mutations in X-linked retinitis pigmentosa families and implications for diagnostic testing. *Mol Vis*, 14, 1081-93 (2008).
- Neveling, K., Collin, R. W., Gilissen, C., Van Huet, R. A., Visser, L., Kwint, M. P., Gijzen, S. J., Zonneveld, M. N., Wieskamp, N., De Ligt, J., Siemiatkowska, A. M., Hoefsloot, L. H., Buckley, M. F., Kellner, U., Branham, K. E., Den Hollander, A. I., Hoischen, A., Hoyng, C., Klevering, B. J., Van Den Born, L. I., Veltman, J. A., Cremers, F. P., Scheffer, H. Next-generation genetic testing for retinitis pigmentosa. *Hum Mutat*, 33, 963-72 (2012a).
- Neveling, K., Den Hollander, A. I., Cremers, F. P., Collin, R. W. Identification and analysis of inherited retinal disease genes. *Methods Mol Biol*, 935, 3-23 (2013).
- Neveling, K., Hollander, A. I., Cremers, F. P., Collin, R. W. (2012b) Identification and Analysis of Inherited Retinal Disease Genes #. *T Retinal Degeneration*.
- Nicoletti, A., Wong, D. J., Kawase, K., Gibson, L. H., Yang-Feng, T. L., Richards, J. E., Thompson, D. A. Molecular characterization of the human gene encoding an abundant 61 kDa protein specific to the retinal pigment epithelium. *Hum Mol Genet*, 4, 641-9 (1995).
- Nishiguchi, K. M., Rivolta, C. Genes associated with retinitis pigmentosa and allied diseases are frequently mutated in the general population. *PLoS One*, 7, e41902 (2012).
- Nishimura, D. Y., Baye, L. M., Perveen, R., Searby, C. C., Avila-Fernandez, A., Pereiro, I., Ayuso, C., Valverde, D., Bishop, P. N., Manson, F. D., Urquhart, J., Stone, E. M., Slusarski, D. C., Black, G. C., Sheffield, V. C. Discovery and functional analysis of a retinitis pigmentosa gene, C2ORF71. *Am J Hum Genet*, 86, 686-95 (2010).
- Noguchi, Y., Hirabayashi, T., Katori, S., Kawamura, Y., Sanbo, M., Hirabayashi, M., Kiyonari, H., Nakao, K., Uchimura, A., Yagi, T. Total expression and dual gene-regulatory mechanisms maintained in deletions and duplications of the Pcdha cluster. *J Biol Chem*, 284, 32002-14 (2009).
- North, M. A., Naggert, J. K., Yan, Y., Noben-Trauth, K., Nishina, P. M. 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 (1997).
- O'sullivan, J., Mullaney, B. G., Bhaskar, S. S., Dickerson, J. E., Hall, G., O'grady, A., Webster, A., Ramsden, S. C., Black, G. C. A paradigm shift in the delivery of services for diagnosis of inherited retinal disease. *J Med Genet*, 49, 322-6 (2012).

- Ostergaard, E., Batbayli, M., Duno, M., Vilhelmsen, K., Rosenberg, T. Mutations in PCDH21 cause autosomal recessive cone-rod dystrophy. *J Med Genet*, 47, 665-9 (2010).
- Ostergaard, E., Duno, M., Batbayli, M., Vilhelmsen, K., Rosenberg, T. A novel MERTK deletion is a common founder mutation in the Faroe Islands and is responsible for a high proportion of retinitis pigmentosa cases. *Mol Vis*, 17, 1485-92 (2011).
- Otto, E., Hoefele, J., Ruf, R., Mueller, A. M., Hiller, K. S., Wolf, M. T., Schuermann, M. J., Becker, A., Birkenhager, R., Sudbrak, R., Hennies, H. C., Nurnberg, P., Hildebrandt, F. A gene mutated in nephronophthisis and retinitis pigmentosa encodes a novel protein, nephroretinin, conserved in evolution. *Am J Hum Genet*, 71, 1161-7 (2002).
- Otto, E. A., Loeys, B., Khanna, H., Hellemans, J., Sudbrak, R., Fan, S., Muerb, U., O'toole, J. F., Helou, J., Attanasio, M., Utsch, B., Sayer, J. A., Lillo, C., Jimeno, D., Coucke, P., De Paepe, A., Reinhardt, R., Klages, S., Tsuda, M., Kawakami, I., Kusakabe, T., Omran, H., Imm, A., Tippens, M., Raymond, P. A., Hill, J., Beales, P., He, S., Kispert, A., Margolis, B., Williams, D. S., Swaroop, A., Hildebrandt, F. Nephrocystin-5, a ciliary IQ domain protein, is mutated in Senior-Loken syndrome and interacts with RPGR and calmodulin. *Nat Genet*, 37, 282-8 (2005).
- Palczewski, K. G protein-coupled receptor rhodopsin. *Annu Rev Biochem*, 75, 743-67 (2006).
- Paloma, E., Hjelmqvist, L., Bayes, M., Garcia-Sandoval, B., Ayuso, C., Balcells, S., Gonzalez-Duarte, R. Novel mutations in the TULP1 gene causing autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 656-9 (2000).
- Paloma, E., Martinez-Mir, A., Garcia-Sandoval, B., Ayuso, C., Vilageliu, L., Gonzalez-Duarte, R., Balcells, S. Novel homozygous mutation in the alpha subunit of the rod cGMP gated channel (CNGB1) in two Spanish sibs affected with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *J Med Genet*, 39, E66 (2002).
- Pandey, S., Blanks, J. C., Spee, C., Jiang, M., Fong, H. K. Cytoplasmic retinal localization of an evolutionary homolog of the visual pigments. *Exp Eye Res*, 58, 605-13 (1994).
- Patil, H., Tserentsoodol, N., Saha, A., Hao, Y., Webb, M., Ferreira, P. A. Selective loss of RPGRIP1-dependent ciliary targeting of NPHP4, RPGR and SDCCAG8 underlies the degeneration of photoreceptor neurons. *Cell Death Dis*, 3, e355 (2012).
- Pellikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., Mcglade, C. J., Ready, D. F., Tepass, U. Crumbs, the Drosophila homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature*, 416, 143-9 (2002).
- Peng, G. H., Ahmad, O., Ahmad, F., Liu, J., Chen, S. 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 (2005).
- Permanyer, J., Navarro, R., Friedman, J., Pomares, E., Castro-Navarro, J., Marfany, G., Swaroop, A., Gonzalez-Duarte, R. Autosomal recessive retinitis pigmentosa with early macular affection caused by premature truncation in PROM1. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 2656-63 (2010).

- Perrault, I., Hanein, S., Gerber, S., Barbet, F., Ducroq, D., Dollfus, H., Hamel, C., Dufier, J. L., Munnich, A., Kaplan, J., Rozet, J. M. Retinal dehydrogenase 12 (RDH12) mutations in leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet*, 75, 639-46 (2004).
- Phelan, J. K., Bok, D. A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes. *Mol Vis*, 6, 116-24 (2000).
- Piecznik, S. R., Neustadt, J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol*, 83, 84-92 (2007).
- Pieras, J. I., Barragan, I., Borrego, S., Audo, I., Gonzalez-Del Pozo, M., Bernal, S., Baiget, M., Zeitz, C., Bhattacharya, S. S., Antinolo, G. Copy-number variations in EYS: a significant event in the appearance of arRP. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 5625-31 (2011).
- Piriev, N. I., Shih, J. M., Farber, D. B. Defective RNA splicing resulting from a mutation in the cyclic guanosine monophosphate-phosphodiesterase beta-subunit gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39, 463-70 (1998).
- Putoux, A., Attie-Bitach, T., Martinovic, J., Gubler, M. C. Phenotypic variability of Bardet-Biedl syndrome: focusing on the kidney. *Pediatr Nephrol*, 27, 7-15 (2012).
- Radu, R. A., Yuan, Q., Hu, J., Peng, J. H., Lloyd, M., Nusinowitz, S., Bok, D., Travis, G. H. 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 (2008).
- Redmond, T. M., Yu, S., Lee, E., Bok, D., Hamasaki, D., Chen, N., Goletz, P., Ma, J. X., Crouch, R. K., Pfeifer, K. Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat Genet*, 20, 344-51 (1998).
- Reese, M. G., Eeckman, F. H., Kulp, D., Haussler, D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol*, 4, 311-23 (1997).
- Reiners, J., Nagel-Wolfrum, K., Jurgens, K., Marker, T., Wolfrum, U. Molecular basis of human Usher syndrome: deciphering the meshes of the Usher protein network provides insights into the pathomechanisms of the Usher disease. *Exp Eye Res*, 83, 97-119 (2006).
- Reiners, J., Van Wijk, E., Marker, T., Zimmermann, U., Jurgens, K., Te Brinke, H., Overlack, N., Roepman, R., Knipper, M., Kremer, H., Wolfrum, U. Scaffold protein harmonin (USH1C) provides molecular links between Usher syndrome type 1 and type 2. *Hum Mol Genet*, 14, 3933-43 (2005).
- Riazuddin, S. A., Iqbal, M., Wang, Y., Masuda, T., Chen, Y., Bowne, S., Sullivan, L. S., Waseem, N. H., Bhattacharya, S., Daiger, S. P., Zhang, K., Khan, S. N., Riazuddin, S., Hejtmancik, J. F., Sieving, P. A., Zack, D. J., Katsanis, N. A splice-site mutation in a retina-specific exon of BBS8 causes nonsyndromic retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet*, 86, 805-12 (2010).
- Riveiro-Alvarez, R., Lopez-Martinez, M. A., Zernant, J., Aguirre-Lamban, J., Cantalapiedra, D., Avila-Fernandez, A., Gimenez, A., Lopez-Molina, M. I., Garcia-Sandoval, B., Blanco-Kelly, F., Corton, M., Tatu, S., Fernandez-San Jose, P., Trujillo-Tiebas, M. J., Ramos, C., Allikmets, R., Ayuso, C. Outcome of ABCA4

- Disease-Associated Alleles in Autosomal Recessive Retinal Dystrophies: Retrospective Analysis in 420 Spanish Families. *Ophthalmology*, 120, 2332-7 (2013).
- Rivolta, C., Berson, E. L., Dryja, T. P. Paternal uniparental heterodisomy with partial isodisomy of chromosome 1 in a patient with retinitis pigmentosa without hearing loss and a missense mutation in the Usher syndrome type II gene USH2A. *Arch Ophthalmol*, 120, 1566-71 (2002a).
- Rivolta, C., Sharon, D., Deangelis, M. M., Dryja, T. P. Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Hum Mol Genet*, 11, 1219-27 (2002b).
- Rivolta, C., Sweklo, E. A., Berson, E. L., Dryja, T. P. Missense mutation in the USH2A gene: association with recessive retinitis pigmentosa without hearing loss. *Am J Hum Genet*, 66, 1975-8 (2000).
- Rizzolo, L. J., Peng, S., Luo, Y., Xiao, W. Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res*, 30, 296-323 (2011).
- Roepman, R., Letteboer, S. J., Arts, H. H., Van Beersum, S. E., Lu, X., Krieger, E., Ferreira, P. A., Cremers, F. P. Interaction of nephrocystin-4 and RPGRIP1 is disrupted by nephronophthisis or Leber congenital amaurosis-associated mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18520-5 (2005).
- Rooryck, C., Lacombe, D. [Bardet-Biedl syndrome]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 69, 463-71 (2008).
- Rosenfeld, P. J., Cowley, G. S., Mcgee, T. L., Sandberg, M. A., Berson, E. L., Dryja, T. P. A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 1, 209-13 (1992).
- Rozet, J. M., Perrault, I., Gigarel, N., Souied, E., Ghazi, I., Gerber, S., Dufier, J. L., Munnich, A., Kaplan, J. Dominant X linked retinitis pigmentosa is frequently accounted for by truncating mutations in exon ORF15 of the RPGR gene. *J Med Genet*, 39, 284-5 (2002).
- Ruiz, A., Borrego, S., Marcos, I., Antinolo, G. 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 (1998).
- Ruiz, A., Kuehn, M. H., Andorf, J. L., Stone, E., Hageman, G. S., Bok, D. Genomic organization and mutation analysis of the gene encoding lecithin retinol acyltransferase in human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 31-7 (2001).
- Sandberg, M. A., Rosner, B., Weigel-Difranco, C., Dryja, T. P., Berson, E. L. Disease course of patients with X-linked retinitis pigmentosa due to RPGR gene mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 1298-304 (2007).
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7 (1977).

- Scott, R. S., McMahon, E. J., Pop, S. M., Reap, E. A., Caricchio, R., Cohen, P. L., Earp, H. S., Matsushima, G. K. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature*, 411, 207-11 (2001).
- Schaefer, E., Durand, M., Stoetzel, C., Doray, B., Viville, B., Helle, S., Danse, J. M., Hamel, C., Bitoun, P., Goldenberg, A., Finck, S., Faivre, L., Sigaudy, S., Holder, M., Vincent, M. C., Marion, V., Bonneau, D., Verloes, A., Nisand, I., Mandel, J. L., Dollfus, H. Molecular diagnosis reveals genetic heterogeneity for the overlapping MKKS and BBS phenotypes. *Eur J Med Genet*, 54, 157-60 (2011).
- Schouten, J. P., Mcelgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., Pals, G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 30, e57 (2002).
- Schuermann, M. J., Otto, E., Becker, A., Saar, K., Ruschendorf, F., Polak, B. C., Ala-Mello, S., Hoefele, J., Wiedensohler, A., Haller, M., Omran, H., Nurnberg, P., Hildebrandt, F. Mapping of gene loci for nephronophthisis type 4 and Senior-Loken syndrome, to chromosome 1p36. *Am J Hum Genet*, 70, 1240-6 (2002).
- Senechal, A., Humbert, G., Surget, M. O., Bazalgette, C., Arnaud, B., Arndt, C., Laurent, E., Brabet, P., Hamel, C. P. Screening genes of the retinoid metabolism: novel LRAT mutation in leber congenital amaurosis. *Am J Ophthalmol*, 142, 702-4 (2006).
- Sergouniotis, P. I., Li, Z., Mackay, D. S., Wright, G. A., Borman, A. D., Devery, S. R., Moore, A. T., Webster, A. R. A survey of DNA variation of C2ORF71 in probands with progressive autosomal recessive retinal degeneration and controls. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 1880-6 (2011).
- Shanks, M. E., Downes, S. M., Copley, R. R., Lise, S., Broxholme, J., Hudspith, K. A., Kwasniewska, A., Davies, W. I., Hankins, M. W., Packham, E. R., Clouston, P., Seller, A., Wilkie, A. O., Taylor, J. C., Ragoussis, J., Nemeth, A. H. Next-generation sequencing (NGS) as a diagnostic tool for retinal degeneration reveals a much higher detection rate in early-onset disease. *Eur J Hum Genet*, 21, 274-80 (2013).
- Shichida, Y., Imai, H., Imamoto, Y., Fukada, Y., Yoshizawa, T. Is chicken green-sensitive cone visual pigment a rhodopsin-like pigment? A comparative study of the molecular properties between chicken green and rhodopsin. *Biochemistry*, 33, 9040-4 (1994).
- Shroyer, N. F., Lewis, R. A., Allikmets, R., Singh, N., Dean, M., Leppert, M., Lupski, J. R. The rod photoreceptor ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, and retinal disease: from monogenic to multifactorial. *Vision Res*, 39, 2537-44 (1999).
- Shu, X., Fry, A. M., Tulloch, B., Manson, F. D., Crabb, J. W., Khanna, H., Faragher, A. J., Lennon, A., He, S., Trojan, P., Giessl, A., Wolfrum, U., Vervoort, R., Swaroop, A., Wright, A. F. RPGR ORF15 isoform co-localizes with RPGRIP1 at centrioles and basal bodies and interacts with nucleophosmin. *Hum Mol Genet*, 14, 1183-97 (2005).
- Shu, X., Mcdowall, E., Brown, A. F., Wright, A. F. The human retinitis pigmentosa GTPase regulator gene variant database. *Hum Mutat*, 29, 605-8 (2008).

- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D., Higgins, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*, 7, 539 (2011).
- Sigrist, C. J., Cerutti, L., De Castro, E., Langendijk-Genevaux, P. S., Bulliard, V., Bairoch, A., Hulo, N. PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res*, 38, D161-6 (2010).
- Simpson, D. A., Clark, G. R., Alexander, S., Silvestri, G., Willoughby, C. E. Molecular diagnosis for heterogeneous genetic diseases with targeted high-throughput DNA sequencing applied to retinitis pigmentosa. *J Med Genet*, 48, 145-51 (2011).
- Smith, P. J., Zhang, C., Wang, J., Chew, S. L., Zhang, M. Q., Krainer, A. R. An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum Mol Genet*, 15, 2490-508 (2006).
- Smith, P. R., Bain, S. C., Good, P. A., Hattersley, A. T., Barnett, A. H., Gibson, J. M., Dodson, P. M. Pigmentary retinal dystrophy and the syndrome of maternally inherited diabetes and deafness caused by the mitochondrial DNA 3243 tRNA(Leu) A to G mutation. *Ophthalmology*, 106, 1101-8 (1999).
- Sohocki, M. M., Daiger, S. P., Bowne, S. J., Rodriguez, J. A., Northrup, H., Heckenlively, J. R., Birch, D. G., Mintz-Hittner, H., Ruiz, R. S., Lewis, R. A., Saperstein, D. A., Sullivan, L. S. Prevalence of mutations causing retinitis pigmentosa and other inherited retinopathies. *Hum Mutat*, 17, 42-51 (2001).
- Sotomayor, M., Weihofen, W. A., Gaudet, R., Corey, D. P. Structure of a force-conveying cadherin bond essential for inner-ear mechanotransduction. *Nature*, 492, 128-32 (2012).
- Souied, E., Gerber, S., Rozet, J. M., Bonneau, D., Dufier, J. L., Ghazi, I., Philip, N., Soubrane, G., Coscas, G., Munnich, A., Et Al. Five novel missense mutations of the rhodopsin gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet*, 3, 1433-4 (1994).
- Souied, E., Soubrane, G., Benlian, P., Coscas, G. J., Gerber, S., Munnich, A., Kaplan, J. Retinitis punctata albescens associated with the Arg135Trp mutation in the rhodopsin gene. *Am J Ophthalmol*, 121, 19-25 (1996).
- Sparkes, R. S., Heinzmann, C., Goldflam, S., Kojis, T., Saari, J. C., Mohandas, T., Klisak, I., Bateman, J. B., Crabb, J. W. Assignment of the gene (RLBP1) for cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) to human chromosome 15q26 and mouse chromosome 7. *Genomics*, 12, 58-62 (1992).
- Sprecher, E., Bergman, R., Richard, G., Lurie, R., Shalev, S., Petronius, D., Shalata, A., Anbinder, Y., Leibu, R., Perlman, I., Cohen, N., Szargel, R. Hypotrichosis with juvenile macular dystrophy is caused by a mutation in CDH3, encoding P-cadherin. *Nat Genet*, 29, 134-6 (2001).
- Stoetzel, C., Muller, J., Laurier, V., Davis, E. E., Zaghoul, N. A., Vicaire, S., Jacquelin, C., Plewniak, F., Leitch, C. C., Sarda, P., Hamel, C., De Ravel, T. J., Lewis, R. A., Friederich, E., Thibault, C., Danse, J. M., Verloes, A., Bonneau, D., Katsanis, N., Poch, O., Mandel, J. L., Dollfus, H. Identification of a novel BBS gene (BBS12)

- highlights the major role of a vertebrate-specific branch of chaperonin-related proteins in Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet*, 80, 1-11 (2007).
- Stone, D. L., Slavotinek, A., Bouffard, G. G., Banerjee-Basu, S., Baxevanis, A. D., Barr, M., Biesecker, L. G. Mutation of a gene encoding a putative chaperonin causes McKusick-Kaufman syndrome. *Nat Genet*, 25, 79-82 (2000).
- Stone, E. M., Vandenburg, K., Kimura, A. E., Lam, B. L., Fishman, G. A., Heckenlively, J. R., Castillo, T. A., Sheffield, V. C. Novel mutations in the peripherin (RDS) and rhodopsin genes associated with autosomal dominant retinis pigmentosa (ADRP). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 34, 1149 (1993).
- Stone, E. M., Webster, A. R., Vandenburg, K., Streb, L. M., Hockey, R. R., Lotery, A. J., Sheffield, V. C. Allelic variation in ABCR associated with Stargardt disease but not age-related macular degeneration. *Nat Genet*, 20, 328-9 (1998).
- Sun, H., Nathans, J. Stargardt's ABCR is localized to the disc membrane of retinal rod outer segments. *Nat Genet*, 17, 15-6 (1997).
- Sun, W., Gerth, C., Maeda, A., Lodowski, D. T., Van Der Kraak, L., Saperstein, D. A., Heon, E., Palczewski, K. Novel RDH12 mutations associated with Leber congenital amaurosis and cone-rod dystrophy: biochemical and clinical evaluations. *Vision Res*, 47, 2055-66 (2007).
- Swaroop, A., Kim, D., Forrest, D. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci*, 11, 563-76 (2010).
- Syvanen, A. C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet*, 2, 930-42 (2001).
- Tada, A., Wada, Y., Sato, H., Itabashi, T., Kawamura, M., Tamai, M., Nishida, K. Screening of the MERTK gene for mutations in Japanese patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Mol Vis*, 12, 441-4 (2006).
- Takahara, K., Schwarze, U., Imamura, Y., Hoffman, G. G., Toriello, H., Smith, L. T., Byers, P. H., Greenspan, D. S. Order of intron removal influences multiple splice outcomes, including a two-exon skip, in a COL5A1 acceptor-site mutation that results in abnormal pro- $\alpha 1(V)$ N-propeptides and Ehlers-Danlos syndrome type I. *Am J Hum Genet*, 71, 451-65 (2002).
- Teo, S. M., Pawitan, Y., Ku, C. S., Chia, K. S., Salim, A. Statistical challenges associated with detecting copy number variations with next-generation sequencing. *Bioinformatics*, 28, 2711-8 (2012).
- Thompson, D. A., Janecke, A. R., Lange, J., Feathers, K. L., Hubner, C. A., Mchenry, C. L., Stockton, D. W., Rammesmayr, G., Lupski, J. R., Antinolo, G., Ayuso, C., Baiget, M., Gouras, P., Heckenlively, J. R., Den Hollander, A., Jacobson, S. G., Lewis, R. A., Sieving, P. A., Wissinger, B., Yzer, S., Zrenner, E., Utermann, G., Gal, A. 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 (2005).
- Thompson, D. A., Li, Y., Mchenry, C. L., Carlson, T. J., Ding, X., Sieving, P. A., Apfelstedt-Sylla, E., Gal, A. Mutations in the gene encoding lecithin retinol

- acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet*, 28, 123-4 (2001).
- Thompson, D. A., Mchenry, C. L., Li, Y., Richards, J. E., Othman, M. I., Schwinger, E., Vollrath, D., Jacobson, S. G., Gal, A. Retinal dystrophy due to paternal isodisomy for chromosome 1 or chromosome 2, with homoallelism for mutations in RPE65 or MERTK, respectively. *Am J Hum Genet*, 70, 224-9 (2002).
- Tschernutter, M., Jenkins, S. A., Waseem, N. H., Saihan, Z., Holder, G. E., Bird, A. C., Bhattacharya, S. S., Ali, R. R., Webster, A. R. Clinical characterisation of a family with retinal dystrophy caused by mutation in the Mertk gene. *Br J Ophthalmol*, 90, 718-23 (2006).
- Tuson, M., Garanto, A., Gonzalez-Duarte, R., Marfany, G. Overexpression of CERKL, a gene responsible for retinitis pigmentosa in humans, protects cells from apoptosis induced by oxidative stress. *Mol Vis*, 15, 168-80 (2009).
- Tuson, M., Marfany, G., Gonzalez-Duarte, R. Mutation of CERKL, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26). *Am J Hum Genet*, 74, 128-38 (2004).
- Valverde, D., Baiget, M., Seminago, R., Del Rio, E., Garcia-Sandoval, B., Del Rio, T., Bayes, M., Balcells, S., Martinez, A., Grinberg, D., Ayuso, C. Identification of a novel R552O mutation in exon 13 of the beta-subunit of rod phosphodiesterase gene in a Spanish family with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Mutat*, 8, 393-4 (1996a).
- Valverde, D., Pereiro, I., Vallespin, E., Ayuso, C., Borrego, S., Baiget, M. Complexity of phenotype-genotype correlations in Spanish patients with RDH12 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 1065-8 (2009).
- Valverde, D., Solans, T., Grinberg, D., Balcells, S., Vilageliu, L., Bayes, M., Chivelet, P., Besmond, C., Goossens, M., Gonzalez-Duarte, R., Baiget, M. A novel mutation in exon 17 of the beta-subunit of rod phosphodiesterase in two RP sisters of a consanguineous family. *Hum Genet*, 97, 35-8 (1996b).
- Vallespin, E., Cantalapiedra, D., Garcia-Hoyos, M., Riveiro, R., Villaverde, C., Trujillo-Tiebas, M. J., Ayuso, C. Gene symbol: CRB1. Disease: Leber congenital amaurosis. Accession #Hm0534. *Hum Genet*, 118, 777 (2006).
- 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., Ayuso, C. Mutation screening of 299 Spanish families with retinal dystrophies by Leber congenital amaurosis genotyping microarray. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 5653-61 (2007).
- 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., Cremers, F. P., Wolfrum, U., Roepman, R., Kremer, H. 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 (2009).
- Van Wijk, E., Pennings, R. J., Te Brinke, H., Claassen, A., Yntema, H. G., Hoefsloot, L. H., Cremers, F. P., Cremers, C. W., Kremer, H. 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 (2004).
- Van Wijk, E., Van Der Zwaag, B., Peters, T., Zimmermann, U., Te Brinke, H., Kersten, F. F., Marker, T., Aller, E., Hoefsloot, L. H., Cremers, C. W., Cremers, F. P., Wolfrum, U., Knipper, M., Roepman, R., Kremer, H. The DFNB31 gene product whirlin connects to the Usher protein network in the cochlea and retina by direct association with USH2A and VLGR1. *Hum Mol Genet*, 15, 751-65 (2006).
- Vervoort, R., Lennon, A., Bird, A. C., Tulloch, B., Axton, R., Miano, M. G., Meindl, A., Meitinger, T., Ciccodicola, A., Wright, A. F. Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 25, 462-6 (2000).
- Vithana, E. N., Abu-Safieh, L., Pelosini, L., Winchester, E., Hornan, D., Bird, A. C., Hunt, D. M., Bustin, S. A., Bhattacharya, S. S. Expression of PRPF31 mRNA in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa: a molecular clue for incomplete penetrance? *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 4204-9 (2003).
- Walia, S., Fishman, G. A., Swaroop, A., Branham, K. E., Lindeman, M., Othman, M., Weleber, R. G. Discordant phenotypes in fraternal twins having an identical mutation in exon ORF15 of the RPGR gene. *Arch Ophthalmol*, 126, 379-84 (2008).
- Wang, J. S., Kefalov, V. J. The cone-specific visual cycle. *Prog Retin Eye Res*, 30, 115-28 (2011).
- Wassle, H., Boycott, B. B. Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev*, 71, 447-80 (1991).
- Webb, T. R., Parfitt, D. A., Gardner, J. C., Martinez, A., Bevilacqua, D., Davidson, A. E., Zito, I., Thiselton, D. L., Ressa, J. H., Aperi, M., Schwarz, N., Kanuga, N., Michaelides, M., Cheetham, M. E., Gorin, M. B., Hardcastle, A. J. Deep intronic mutation in OFD1, identified by targeted genomic next-generation sequencing, causes a severe form of X-linked retinitis pigmentosa (RP23). *Hum Mol Genet*, 21, 3647-54 (2012).
- Weber, B., Riess, O., Hutchinson, G., Collins, C., Lin, B. Y., Kowbel, D., Andrew, S., Schappert, K., Hayden, M. R. Genomic organization and complete sequence of the human gene encoding the beta-subunit of the cGMP phosphodiesterase and its localisation to 4p 16.3. *Nucleic Acids Res*, 19, 6263-8 (1991).
- Weier, H. U., Fung, J., Lersch, R. A. Assignment of protooncogene MERTK (a.k.a. c-mer) to human chromosome 2q14.1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 84, 91-2 (1999).
- Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A., Huttner, W. B. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 12425-30 (1997).
- Weil, D., Kussel, P., Blanchard, S., Levy, G., Levi-Acobas, F., Drira, M., Ayadi, H., Petit, C. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet*, 16, 191-3 (1997).

- Weleber, R. G., Carr, R. E., Murphey, W. H., Sheffield, V. C., Stone, E. M. Phenotypic variation including retinitis pigmentosa, pattern dystrophy, and fundus flavimaculatus in a single family with a deletion of codon 153 or 154 of the peripherin/RDS gene. *Arch Ophthalmol*, 111, 1531-42 (1993).
- Wenzel, A., Oberhauser, V., Pugh, E. N., Jr., Lamb, T. D., Grimm, C., Samardzija, M., Fahl, E., Seeliger, M. W., Reme, C. E., Von Lintig, J. The retinal G protein-coupled receptor (RGR) enhances isomerohydrolase activity independent of light. *J Biol Chem*, 280, 29874-84 (2005).
- West, R. W., Dowling, J. E. Anatomical evidence for cone and rod-like receptors in the gray squirrel, ground squirrel, and prairie dog retinas. *J Comp Neurol*, 159, 439-60 (1975).
- Weston, M. D., Eudy, J. D., Fujita, S., Yao, S., Usami, S., Cremers, C., Greenberg, J., Ramesar, R., Martini, A., Moller, C., Smith, R. J., Sumegi, J., Kimberling, W. J. Genomic structure and identification of novel mutations in usherin, the gene responsible for Usher syndrome type IIa. *Am J Hum Genet*, 66, 1199-210 (2000).
- Whitlock, G. G., Lamb, T. D. Variability in the time course of single photon responses from toad rods: termination of rhodopsin's activity. *Neuron*, 23, 337-51 (1999).
- Wijnholds, J., Aartsen, W., Alves, H., Dudok, J., Hoek, R., Lundvig, D., Park, B., Pellissier, L., Vos, R., Cremers, F. P. M., Hollander, A. I. D., Roepman, R., Knust, E., Gurudev, N., Firmino, J., Klose, S., Muschalik, N., Blawid, R., Pocha, S., Kumichel, A., Luz, M., Bivic, A. L., Massey, D., Mottola, G., Baron-Gaillar, C., Barthélémy, M., Ricard, C., Bazellières, E., Vacca, B., Rashbass, P., Dillon, J., Law, C., Momiji, H., Boroviak, T., Murtaza, M., Seeliger, M., Fahl, E., Tanimoto, N., Beck, S. C., Bauer, R., Fischer, D., Seßler, G., Huber, G. (2008) *CRUMBS IN SIGHT* [Online]. Available: <http://crfb.univ-mrs.fr/Crumbs>.
- Wolfrum, U., Schmitt, A. Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 46, 95-107 (2000).
- Won, J., Marin De Evsikova, C., Smith, R. S., Hicks, W. L., Edwards, M. M., Longo-Guess, C., Li, T., Naggert, J. K., Nishina, P. M. NPHP4 is necessary for normal photoreceptor ribbon synapse maintenance and outer segment formation, and for sperm development. *Hum Mol Genet*, 20, 482-96 (2011).
- Wright, A. F., Chakarova, C. F., Abd El-Aziz, M. M., Bhattacharya, S. S. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat Rev Genet*, 11, 273-84 (2010).
- Wu, J., Grzeda, K. R., Stewart, C., Grubert, F., Urban, A. E., Snyder, M. P., Marth, G. T. Copy Number Variation detection from 1000 Genomes Project exon capture sequencing data. *BMC Bioinformatics*, 13, 305 (2012).
- Wu, Q., Zhang, T., Cheng, J. F., Kim, Y., Grimwood, J., Schmutz, J., Dickson, M., Noonan, J. P., Zhang, M. Q., Myers, R. M., Maniatis, T. Comparative DNA sequence analysis of mouse and human protocadherin gene clusters. *Genome Res*, 11, 389-404 (2001).
- Xi, Q., Pauer, G. J., Ball, S. L., Rayborn, M., Hollyfield, J. G., Peachey, N. S., Crabb, J. W., Hagstrom, S. A. Interaction between the photoreceptor-specific tubby-like

- protein 1 and the neuronal-specific GTPase dynamin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 2837-44 (2007).
- Xi, Q., Pauer, G. J., Marmorstein, A. D., Crabb, J. W., Hagstrom, S. A. Tubby-like protein 1 (TULP1) interacts with F-actin in photoreceptor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 4754-61 (2005).
- Yang, Z., Chen, Y., Lillo, C., Chien, J., Yu, Z., Michaelides, M., Klein, M., Howes, K. A., Li, Y., Kaminoh, Y., Chen, H., Zhao, C., Al-Sheikh, Y. T., Karan, G., Corbeil, D., Escher, P., Kamaya, S., Li, C., Johnson, S., Frederick, J. M., Zhao, Y., Wang, C., Cameron, D. J., Huttner, W. B., Schorderet, D. F., Munier, F. L., Moore, A. T., Birch, D. G., Baehr, W., Hunt, D. M., Williams, D. S., Zhang, K. Mutant prominin 1 found in patients with macular degeneration disrupts photoreceptor disk morphogenesis in mice. *J Clin Invest*, 118, 2908-16 (2008).
- Yau, K. W. Cyclic nucleotide-gated channels: an expanding new family of ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 3481-3 (1994a).
- Yau, K. W. Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35, 9-32 (1994b).
- Yau, K. W., Hardie, R. C. Phototransduction motifs and variations. *Cell*, 139, 246-64 (2009).
- Young, R. W., Bok, D. Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol*, 42, 392-403 (1969).
- Zaghloul, N. A., Katsanis, N. Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *J Clin Invest*, 119, 428-37 (2009).
- Zaghloul, N. A., Liu, Y., Gerdes, J. M., Gascue, C., Oh, E. C., Leitch, C. C., Bromberg, Y., Binkley, J., Leibel, R. L., Sidow, A., Badano, J. L., Katsanis, N. Functional analyses of variants reveal a significant role for dominant negative and common alleles in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 10602-7 (2010).
- Zalocchi, M., Delimont, D., Meehan, D. T., Cosgrove, D. Regulated vesicular trafficking of specific PCDH15 and VLRG1 variants in auditory hair cells. *J Neurosci*, 32, 13841-59 (2012).
- Zangerl, B., Goldstein, O., Philp, A. R., Lindauer, S. J., Pearce-Kelling, S. E., Mullins, R. F., Graphodatsky, A. S., Ripoll, D., Felix, J. S., Stone, E. M., Acland, G. M., Aguirre, G. D. Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod-cone degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans. *Genomics*, 88, 551-63 (2006a).
- Zangerl, B., Sun, Q., Pillardy, J., Johnson, J. L., Schweitzer, P. A., Hernandez, A. G., Liu, L., Acland, G. M., Aguirre, G. D. Development and characterization of a normalized canine retinal cDNA library for genomic and expression studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 2632-8 (2006b).
- Zelhof, A. C., Hardy, R. W., Becker, A., Zuker, C. S. Transforming the architecture of compound eyes. *Nature*, 443, 696-9 (2006).
- Zhang, Q., Zulfiqar, F., Riazuddin, S. A., Xiao, X., Ahmad, Z., Riazuddin, S., Hejtmancik, J. F. Autosomal recessive retinitis pigmentosa in a Pakistani family

- mapped to CNGA1 with identification of a novel mutation. *Mol Vis*, 10, 884-9 (2004).
- Zhang, Q., Zulfiqar, F., Xiao, X., Riazuddin, S. A., Ahmad, Z., Caruso, R., Macdonald, I., Sieving, P., Riazuddin, S., Hejtmancik, J. F. Severe retinitis pigmentosa mapped to 4p15 and associated with a novel mutation in the PROM1 gene. *Hum Genet*, 122, 293-9 (2007).
- Zheng, Q. Y., Yan, D., Ouyang, X. M., Du, L. L., Yu, H., Chang, B., Johnson, K. R., Liu, X. Z. Digenic inheritance of deafness caused by mutations in genes encoding cadherin 23 and protocadherin 15 in mice and humans. *Hum Mol Genet*, 14, 103-11 (2005).
- Zinn, K. M., Marmor, M. F. *The Retinal pigment epithelium*, Harvard University Press (1979).
- Znoiko, S. L., Crouch, R. K., Moiseyev, G., Ma, J. X. Identification of the RPE65 protein in mammalian cone photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 1604-9 (2002).

8 ANEXOS

ANEXO I: CONSENTIMIENTO INFORMADO**ANEXO II: PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO**

1. Gonzalez-del Pozo M, Borrego S, Barragan I, Pieras JI, Santoyo J, Matamala N, Naranjo B, Dopazo J, Antinolo G. 2011. Mutation screening of multiple genes in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa by targeted resequencing. *PLoS One* 6(12):e27894.
2. Mendez-Vidal C, Gonzalez-Del Pozo M, Vela-Boza A, Santoyo-Lopez J, Lopez-Domingo FJ, Vazquez-Marouschek C, Dopazo J, Borrego S, Antinolo G. 2013. Whole-exome sequencing identifies novel compound heterozygous mutations in *USH2A* in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 19:2187-95.
3. Gonzalez-del Pozo M, Mendez-Vidal C, Santoyo-Lopez J, Vela-Boza A, Bravo-Gil N, Rueda A, García-Alonso L, Vázquez-Marouschek, Dopazo J, Borrego S, Antinolo G. 2014. Deciphering intrafamilial phenotypic variability by exome sequencing in a Bardet–Biedl family. *Mol Genet Genomic Med*. En prensa.

HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA QUE SEAN OBTENIDAS EN EL CURSO DE PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS, TERAPÉUTICOS O QUIRÚRGICOS

INTRODUCCIÓN

Durante el procedimiento diagnóstico al que va a ser sometido se obtendrán muestras biológicas. Se le propone donar la muestra biológica sobrante del procedimiento al que va a ser sometido, con el fin de poder utilizarla en investigaciones biomédicas.

Dichas muestras podrán ser utilizadas para investigaciones biomédicas relacionadas o no con la enfermedad o proceso que padece, siempre que estén relacionadas con el ámbito de la genética.

Para progresar en el campo de la medicina, y en este caso, de la genética, es necesario que se realicen investigaciones sobre diversas muestras biológicas, investigaciones a través de las cuales se obtendrán datos que permitirán mejorar el conocimiento sobre la aparición, desarrollo y tratamiento de multitud de enfermedades.

Esta hoja de información puede contener palabras que usted no entienda. Por favor, pídale al facultativo que le explique todas las palabras o la información que usted no comprenda.

Tómese el tiempo necesario para decidir si quiere o no donar sus muestras biológicas, consulte a personas de su confianza y pregunte cuanto sea necesario.

Si no otorga su consentimiento para donar sus muestras, o después de haber otorgado su consentimiento, lo revocase, no supondrá perjuicio alguno en su asistencia sanitaria actual o futura.

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra biológica se obtendrá en el curso del procedimiento al que va a someterse. Lo que se le propone es que done el excedente que pudiera quedar de dicha muestra para que, en lugar de ser desechada, pueda ser utilizada en investigaciones biomédicas relacionadas o no con la enfermedad o proceso que padece, siempre y cuando estén relacionadas con el ámbito de la genética.

Por tanto, no existe riesgo añadido alguno para su salud, ya que no tendrá que someterse a ningún procedimiento adicional, sino que la muestra que dona es el excedente de la muestra recabada dentro del procedimiento.

UTILIZACIÓN DE LA MUESTRA

Usted autoriza a que el sobrante de la muestra sea utilizado para investigaciones biomédicas relacionadas o no con la enfermedad o proceso que padece, siempre que estén relacionadas con el ámbito de la genética.

Dichas investigaciones biomédicas se realizarán siempre con el dictamen favorable del Comité de Ética de Investigación correspondientes, así como serán debidamente aprobadas por la autoridad sanitaria competente, contarán con la conformidad del centro sanitario, y cumplirán las exigencias legales y los principios éticos que rigen la investigación en salud.

GRATUIDAD

La donación y la utilización de muestras será gratuita, Asimismo, la donación que realice, implica su renuncia a cualquier derecho de naturaleza económica o de otro tipo sobre los resultados que

podieran derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con dichas muestras.

BENEFICIOS ESPERADOS

Como se indicó anteriormente, es necesario contar con muestras biológicas para avanzar en el conocimiento de diversas enfermedades.

Si bien es posible que la información obtenida de las investigaciones no genere un beneficio directo para su persona, habrá contribuido al avance de la medicina y del conocimiento de diversas enfermedades, lo que supondrá, sin duda, un beneficio para la Sociedad.

INCONVENIENTES VINCULADOS CON LA DONACIÓN

No existe ningún inconveniente adicional derivado de la donación de la muestra, ya que dicha muestra es un excedente de la obtenida en el curso del procedimiento.

No obstante lo anterior, cabe la posibilidad de que el grupo de investigación que esté llevando a cabo la investigación se ponga en contacto con Usted, con el fin de recabar nuevos datos u obtener nuevas muestras.

DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Podrá revocar el consentimiento prestado en este documento, en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones, y sin que ello afecte a su atención sanitaria presente o futura.

En dicho caso, sus muestras serán destruidas/anonimizadas (elegir lo que proceda), si bien, tales efectos no se extenderán a los resultados de las investigaciones llevadas a cabo con anterioridad.

PROTECCIÓN DE DATOS Y CONFIDENCIALIDAD

Los datos personales recabados serán confidenciales y procesados de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y su normativa de desarrollo, la legislación sanitaria y la relativa a la investigación biomédica vigente, tratándose únicamente de acuerdo con los objetivos indicados en este documento, por lo que cualquier relación entre la muestra y su identidad personal tienen carácter estrictamente confidencial.

El excedente de la muestra será disociado, esto es, que dicho excedente no se encuentra asociado a una persona identificada o identificable, por haberse sustituido o desligado la información que identifica a la persona utilizando un código que permite la operación inversa. Por tanto, sólo será identificado por un número y/o código constando todos sus datos debidamente codificados.

Tendrán acceso a dichos datos el investigador principal y el equipo de investigación, las autoridades sanitarias, así como los Comités de Ética de la Investigación correspondientes, que deberán respetar la confidencialidad de acuerdo con la legislación vigente.

Asimismo, debe saber que los resultados obtenidos de las investigaciones llevadas a cabo con las muestras podrán ser publicados en revistas científicas, preservando su identidad, así como los datos que le identifiquen o puedan llegar a identificarle.

INFORMACIÓN OBTENIDA DEL ANÁLISIS DE LA MUESTRA Y SOBRE LOS RESULTADOS

Usted tiene derecho a ser informado de los datos genéticos obtenidos a partir de las muestras biológicas. Si no quiere ser informado de tales datos, incluidos los descubrimientos inesperados



que se pudieran producir, deberá hacerlo constar mediante el modelo establecido al efecto al final de este documento. No obstante, cuando dicha información, según criterio del médico responsable, sea necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar próximo o a un representante, previa consulta del comité asistencial si lo hubiera. En cualquier caso, la comunicación se limitará únicamente a los datos necesarios para las citadas finalidades.

Es posible que se obtenga información relativa a su salud a través de los análisis genéticos que se realicen sobre la muestra biológica. Usted puede decidir que no se le comunique dicha información, debiendo hacerlo constar mediante el modelo establecido al efecto. No obstante lo anterior, cuando dicha información, según criterio del médico responsable, sea necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se actuará de conformidad con lo señalado en el párrafo anterior.

Asimismo, debe saber que es posible que la información obtenida pueda afectar a sus familiares, siendo conveniente que les comunique dicha información.

Si lo desea, le serán comunicados los resultados de la investigación en la que se use su muestra. Para ello deberá indicarlo en el modelo recogido al final del presente documento.

CONSERVACIÓN Y DESTRUCCIÓN DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS

La muestra biológica formará parte de una colección de muestras hasta que sea utilizada en el proyecto de investigación correspondiente.

Dicha muestra será conservada en la Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

El objetivo de su conservación será poder emplearla en cualquier investigación biomédica relacionada o no con la enfermedad o proceso que padece, siempre que estén relacionadas con el ámbito de la genética, y cuenten con la debida aprobación.

Para retirar o solicitar la destrucción de las muestras deberá dirigirse a la Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

PREGUNTAS E INFORMACIÓN

Usted puede realizar cuantas preguntas considere oportunas antes de otorgar su consentimiento expreso y escrito.

Se le proporcionará cualquier información adicional relevante.

Podrá contactar con:

D: _____ Teléfono: _____

Usted tiene que decidir si desea o no donar el excedente de su muestra biológica para investigaciones biomédicas en el ámbito de la genética. Si decide donar dicha muestra se le proporcionará esta hoja de información, y deberá firmar el consentimiento informado para la donación. Una vez firmado este documento, si usted lo desea le será entregada una copia de la hoja de información, así como del consentimiento informado y el investigador que le ha propuesto la donación se quedará con el documento original.



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, D./D^a.,
con DNI....., como (marcar lo que proceda): SUJETO FUENTE/ REPRESENTANTE
LEGAL de

MANIFIESTO QUE

He leído la hoja de información que me ha sido entregada.

He recibido suficiente información sobre la donación de muestras biológicas.

He podido hacer preguntas sobre la información recibida.

He podido hablar con:
(nombre del investigador), quien me ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

Manifiesto mi voluntad de donar el sobrante de mi muestra biológica, obtenida en el curso del procedimiento diagnóstico, terapéutico o quirúrgico, la cual podrá utilizarse para investigaciones biomédicas relacionadas o no con la enfermedad o proceso que padezco/padece, siempre que estén relacionadas con el ámbito de la genética.

Presto libremente mi conformidad para donar el excedente de la muestra biológica,
OTORGANDO, POR TANTO, MI CONSENTIMIENTO.

Fecha.....

Firma del sujeto fuente o representante.....

Firma del investigador



REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, D./D^a.,
con DNI....., como (marcar lo que proceda): **SUJETO FUENTE/**
REPRESENTANTE LEGAL de,
revoco el consentimiento informado otorgado en el presente documento.

Fecha.....

Firma del sujeto fuente o representante.....

Firma del investigador



**NEGATIVA A LA DONACIÓN DEL EXCEDENTE DE LA MUESTRA BIOLÓGICA
RECABADA EN EL PROCEDIMIENTO**

Yo, D./D^a.,
con DNI....., como (marcar lo que proceda): **SUJETO FUENTE/
REPRESENTANTE LEGAL** de,
una vez he sido debidamente informado por el investigador de todos los aspectos mencionados en
el presente documento, expreso de forma libre, voluntaria y consciente, mi negativa a la donación
del excedente de la muestra biológica obtenida en el procedimiento, referida en el presente
documento.

Fecha.....

Firma del sujeto fuente o representante.....

Firma del investigador



SOLICITUD DE INFORMACIÓN

PARTICIPANTE: _____

Yo, D./D^a. _____,
con DNI....., como (marcar lo que proceda): PARTICIPANTE/
REPRESENTANTE LEGAL de _____,

DESEO:

1. Ser informado/a de los datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi/su salud o la de mis/sus familiares biológicos.

Marcar lo que proceda: SI/ NO

2. Ser informado/a de información relevante para el sujeto.

Marcar lo que proceda: SI/ NO

3. Ser informado/a de la información relativa a mi/su salud derivada de los análisis genéticos realizados sobre la muestra biológica obtenida.

Marcar lo que proceda: SI/ NO

4. Ser informado/a de los resultados de la investigación en la que se utilizará la muestra biológica, una vez que ésta concluya.

Marcar lo que proceda: SI/ NO

Ena.....de.....de 20.....

Fdo.:

Mutation Screening of Multiple Genes in Spanish Patients with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa by Targeted Resequencing

María González-del Pozo^{1,2}, Salud Borrego^{1,2}, Isabel Barragán^{1,2}, Juan I. Pieras^{1,2}, Javier Santoyo^{2,3,4}, Nerea Matamala^{1,3}, Belén Naranjo¹, Joaquín Dopazo^{2,3,4,5*}, Guillermo Antiñolo^{1,2,3*}

1 Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal, Instituto de Biomedicina de Sevilla, Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain, **2** Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Sevilla, Spain, **3** Medical Genome Project, Andalusian Center for Human Genomic Sequencing, Sevilla, Spain, **4** Departamento de Bioinformática y Genómica, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain, **5** Functional Genomics Node (INB), Valencia, Spain

Abstract

Retinitis Pigmentosa (RP) is a heterogeneous group of inherited retinal dystrophies characterised ultimately by the loss of photoreceptor cells. RP is the leading cause of visual loss in individuals younger than 60 years, with a prevalence of about 1 in 4000. The molecular genetic diagnosis of autosomal recessive RP (arRP) is challenging due to the large genetic and clinical heterogeneity. Traditional methods for sequencing arRP genes are often laborious and not easily available and a screening technique that enables the rapid detection of the genetic cause would be very helpful in the clinical practice. The goal of this study was to develop and apply microarray-based resequencing technology capable of detecting both known and novel mutations on a single high-throughput platform. Hence, the coding regions and exon/intron boundaries of 16 arRP genes were resequenced using microarrays in 102 Spanish patients with clinical diagnosis of arRP. All the detected variations were confirmed by direct sequencing and potential pathogenicity was assessed by functional predictions and frequency in controls. For validation purposes 4 positive controls for variants consisting of previously identified changes were hybridized on the array. As a result of the screening, we detected 44 variants, of which 15 are very likely pathogenic detected in 14 arRP families (14%). Finally, the design of this array can easily be transformed in an equivalent diagnostic system based on targeted enrichment followed by next generation sequencing.

Citation: González-del Pozo M, Borrego S, Barragán I, Pieras JI, Santoyo J, et al. (2011) Mutation Screening of Multiple Genes in Spanish Patients with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa by Targeted Resequencing. PLoS ONE 6(12): e27894. doi:10.1371/journal.pone.0027894

Editor: Jörg D. Hoheisel, Deutsches Krebsforschungszentrum, Germany

Received: July 20, 2011; **Accepted:** October 27, 2011; **Published:** December 2, 2011

Copyright: © 2011 González-Del Pozo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was funded by Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2008–2011 (PN de I+D+I 2008–2011), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) –Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación, Fondo de Investigación Sanitaria (PI081131), Spain; Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (PI08-CTS-03687), Junta de Andalucía, Spain; El Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII. This work is also partly supported by grants from projects BIO2008-04212 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, PROMETEO/2010/001 from Generalitat Valenciana-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (GVA-FEDER) and the Instituto Nacional de Bioinformática (INB), which is an initiative of the ISCIII. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jdopazo@cipf.es (JD); guillermo.antinolo.sspa@juntadeandalucia.es (GA)

Introduction

Retinitis pigmentosa (RP, OMIM 26800) is a heterogeneous group of inherited retinal dystrophies caused by the progressive loss of photoreceptors. Typically it presents with poor night vision in early or middle life, followed by the constriction of the visual field and progressive loss of visual acuity leading to complete blindness after several decades. On ophthalmic examination, RP manifests with retinal pigmentation, attenuated retinal blood vessels, and waxy optic disc pallor associated with a diminished or abolished electroretinogram. Prevalence of nonsyndromic RP is approximately 1 in 4000 [1]. The condition may segregate as an autosomal dominant RP (24%), autosomal recessive (41%), or an X-linked recessive trait (22%), and the remaining 12% of cases were presumed to result from non-genetic factors, non-Mendelian inheritance (for example mitochondrial or *de novo* mutations) or complex inheritance (digenic or polygenic inheritance) [2].

To date, 37 *loci* have been reported being responsible for autosomal recessive RP (arRP), of which 34 genes have been identified [3]. However, all together the reported *loci* are responsible for only ~35–45% of the recessive RP cases, none of them independently account for a substantial proportion of arRP cases [4]. Recently, we have identified a new gene as the most common single gene that causes arRP: *Eyes Shut Homologue* (*EYS*; 15.9% of cases) [5], almost all causal mutations associated with arRP are rare (minor allele frequency (MAF) <<0.01) and most of the associated genes have hundreds of disease alleles with potentially different pathogenic effects [2].

The identification of a causative mutation is important to ascertain the genetic basis of the disease, and thus paves the way for genetic counselling, family planning and future gene-targeted treatment. Nevertheless, further strategies such as establishing a classification of the mutations as loss- or gain-of-function and assessing the functionality of the mutant proteins, should be

undertaken to develop a treatment tailored to each of the different arRP genes.

Molecular diagnosis of arRP mutations is challenging because a large number of deleterious mutations can be found in each gene, and multiple genes can be mutated to give the same phenotype. Thus, the extensive genetic and allelic heterogeneity of retinal dystrophies makes mutation detection by current molecular techniques problematic. Pre-screening tools, such as single-strand chain polymorphism and denaturing high-pressure liquid chromatography are economic techniques capable of detecting known changes, but not to identify new ones. Similarly, there are commercial genotyping microarrays available, based on the arrayed primer extension (APEX) technology [6], which enable the simultaneous screening of multiple genes but they can only detect a fixed number of known mutations. However, the extensive genetic heterogeneity along with the still unknown repertoire of arRP mutations requires the use of a tool that can identify both, known and new mutations, in a large number of genes in a fast manner. Dideoxy sequencing method can identify mutations but its use for the screening of multiple genes is so time-consuming and expensive that is inapplicable in this scenario. Recently, emerging technologies for ultra high throughput sequencing have started to be applied to diagnostic in a prospective manner [7], [8]. However, the use of these technologies for screening a set of disease causing genes is still limited because of the perceived technical and data-handling challenges. Targeted resequencing offers a solution of compromise that can have a practical application in clinics. Nevertheless, the use of a capture system for the enrichment of the target sequences, followed by ultra-high throughput sequencing, is still a complex technology not available in many laboratories and with many problems of standardisation that needs still to be solved. There are, though, alternative approaches that can be used while the new sequencing technologies become applicable in this context. Thus, while the past decade has witnessed the development of sequencing by hybridization to oligonucleotides on an array [9], recently significant improvements have been made in this technology, and resequencing microarrays offer the potential of determining the sequence of a large number of genes with a reasonable amount of effort and cost [10]. Herein, we present the development and validation of a custom design resequencing microarray which allows a widespread screening of both, novel and known mutations, in 16 genes related to arRP. Although this technology has already been used as a diagnostic test to investigate arRP [10–

13], this is the first report of the application of these resequencing platforms which involves the study of the most prevalent gene, *EYS*. A cohort of 102 arRP patients from Spain was screened with the new RP genechip, demonstrating the potential clinical utility of this technology.

Methods

Ethics Statement

The study conformed to the tenets of the declaration of Helsinki (Edinburgh, 2000) and was approved by the Institutional Review Board of the Hospital Virgen del Rocío, Seville. An informed consent form was signed by all participants for clinical and molecular genetic studies.

Subjects and Clinical Data

The study cohort comprises 102 Spanish unrelated patients affected by arRP. A full ophthalmic examination was performed as described elsewhere [14]. RP was defined as bilateral visual loss, initial hemeralopy, restriction of visual field, gradual increased bone spicule pigmentation and decrease of visual acuity, attenuation of retinal vessels, reduced or undetectable electroretinogram (ERG) and waxy disc pallor. Globally, our cohort included 98 arRP patients with no known mutations and 4 arRP patients with 4 pathogenic variants included as positive controls of mutations, previously identified by dideoxy sequencing (Table 1). In addition, available samples of proband family members were tested for co-segregation studies. A group of 100 control individuals was also recruited which comprised unselected, unrelated race-, age-, and gender-matched individuals from Spain.

Custom Genome Resequencing Microarray Design

The sequences comprising all coding exons plus 15 bp of flanking intronic sequence from the arRP genes *CERKL*, *CNGA1*, *CRB1*, *EYS*, *IDH3B*, *LRAT*, *MERTK*, *NR2E3*, *PDE6B*, *PRCD*, *PROM1*, *RGR*, *RHO*, *RLBP1*, *RPE65* and *TULP1* were selected to tile on the resequencing microarray (Affymetrix, Santa Clara, CA). Repetitive elements and internal duplications that may lead to cross hybridization were identified by using Repeat Masker [15] and deleted. For each position of the interrogated sequence, eight 25-mer probes are represented on the array: four probes for each strand, each with a different nucleotide in the middle (A,G,C,T)—one perfect match for the reference sequence and three mismatches—allowing the detection of all possible nucleotide

Table 1. Known Sequence Changes Tested in the Validation and Reproducibility assay.

Family ID	Gene	Nucleotide change Protein change Genotype	Mutation Type	Calls of the arrays using the IUPAC Base Code*	Reference
RP 21	<i>TULP1</i>	c.823-4A>G Heterozygous	Splice site mutation	Detected as R	[37]
RP 242	<i>TULP1</i>	c.430A>G p.K96E Heterozygous	Missense	Detected as R	Unpublished
RP 57	<i>TULP1</i>	c.1255C>G p.R419G Heterozygous	Missense	Detected as S	Unpublished
RP 60	<i>EYS</i>	c.78-79insGC p.Q27RfsX16 Heterozygous	Insertion frameshift	Not Detected	[5]

*IUPAC Base Codes: The symbol R to designate PuRine (A or G); S to designate Strong interaction (C or G).

doi:10.1371/journal.pone.0027894.t001

substitutions of both strands. In total, 45,096 bp features are tiled on the array and 44,282 bp of double-stranded gene sequences are analyzed. The remaining oligonucleotides represent control DNA (Affymetrix control reference sequence; AFFX-TagIQ-EX). Our custom designed arRP chips were fabricated by Affymetrix using standard photolithography and solid-phase DNA synthesis [9], [16], [17].

Experimental Procedure and Data Analyses

A total of 93 polymerase chain reaction (PCR) amplicons (ranging from 300 bp to 7.5 Kbp) were designed and optimized to amplify under a common set of Short-Range and Long-Range PCR conditions. Primer sequences and PCR conditions employed are available upon request. DNA concentration of each amplicon was measured using a picogreen assay and PCR products were pooled and purified of residual primers and nucleotides using Clontech purification plates (Clontech, Mountain View, CA). The DNA was then fragmented, labeled with biotin, and hybridized to the chip for 16 hours at 49°C rotating at 60 rpm according to manufacturer’s protocols (GeneChip CustomSeq Resequencing Array Protocol, Vers.2; Affymetrix, Santa Clara, CA). The arrays were subsequently washed and stained on a fluidics station followed by the scanning on a GeneChip 3000 Scanner (Affymetrix, Santa Clara, CA), and the raw data were analyzed using Affymetrix GeneChip Resequencing Analysis Software (GSEQ® v4.0) which enabled alignment of patients sequences

against a reference sequence. All array data is MIAME compliant, and the raw data has been deposited in EBI Array Express database, a MIAME compliant database as detailed on the MGED Society website [18] under accession number E-MTAB-786.

The novel identified variants were subsequently verified and screened in healthy controls by dideoxy sequencing and if additional family members were available, segregation of the variant with the disease was assessed (Figure 1).

In order to evaluate the pathogenicity of the novel variants, we analysed the potential impact of a given variant on the function or structure of the encoded protein based on conservation, physical properties of the amino acids, or in its possible occurrence in regulatory or splicing motifs using the software PupaSuite [19], [20]. To study the *EYS* variants, the domain architecture prediction and the alignment of the different orthologs were performed using bl2seq (NCBI) and EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms: Needle and Water (EBI) alignments. The fully characterised SPAM proteins were aligned using MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) program at EBI (For more details on the *EYS* bioinformatic characterization see [5]).

MLPA Analysis of the *EYS* Gene

To clarify the molecular genetic cause in those families with just a single heterozygotic detected change in *EYS*, MLPA (Multiplex

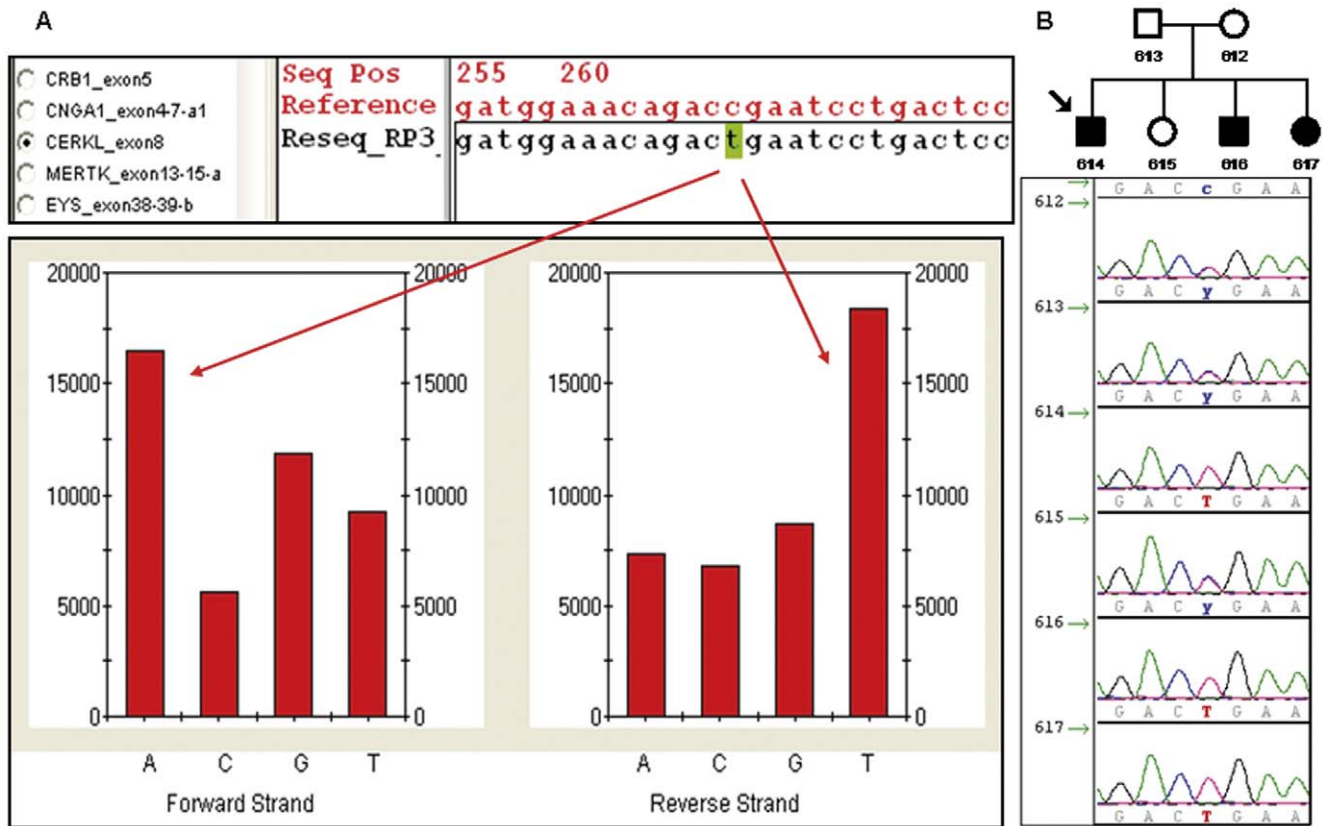


Figure 1. Analytic workflow. **A.** Genechip resequencing analysis software output for of the exon 8 of *CERKL* for 1 sample (index patient of the Family RP76) compared to reference sequence using GSEQ. The chip data reveals a nonsense mutation in *CERKL* (c.769C>T; p.R257X) at position 268 in the tiled sequence. The reference sequence carries a homozygous C in that position. The intensity histogram below shows how the mutant sample with a homozygous T binds most strongly to the probe with A on the forward strand and T on the reverse one. **B.** Electropherogram depiction of the members of the family RP76 confirming the co-segregation of the variant with the disease. doi:10.1371/journal.pone.0027894.g001

Ligation Probe Amplification) was performed to identify the second variant as an alternative approach to screen for copy number variations (CNVs), given that these type of mutations are particularly frequent in this gene [14]. Thus, 4 of the arRP patients were analysed by MLPA and gene dosage variations on *EYS* were evaluated as described elsewhere [14].

Results

Validation of the Array: Assessment of Positive Controls

The PCR of 3 out of the 93 amplicons (3.2%) could not be optimized; therefore, hybridization failed and these exons were excluded from further analysis. The average call rates for successfully hybridized amplicons were of 92% for the 102 arrays. Several algorithm parameters regarding this base calling can be altered, affecting the call rate and accuracy of the base calls [16]. The highest call rate was obtained using a Quality Score Threshold (QST) of 2 and without Base Reliability Threshold (BRT) [21]. Therefore, these settings were used for the call rate assessment. In addition, we observed a call rate constant improvement as the number of experiments increased. GSEQ contains a learning algorithm derived from ABACUS, an adaptative background genotype calling scheme to optimize data from multiple arrays analyzed together; larger batch sizes in an analysis are thus expected to have greater accuracy [22], [23]. The no-calls regions are mainly observed in G-C rich areas and repetitive elements unsuitable for analysis (ie, SINE, LINE, ALU, etc). *PDE6B* and *CERKL* were particularly rich in such unread nucleotides. So far, no arRP mutations have been reported in such regions [24].

To determine the ability of our chip to detect different types of mutations, we processed the DNA of 4 arRP patients carrying known mutations in 2 of the genes tiled onto the array (Table 1). The arrays used in this study were not designed to specifically

identify deletions or insertions and, as expected, the insertion that was in a heterozygous state could not be detected by the GSEQ software. However, the substitution variants were detected.

Variants Identified by the arRP Array

A total of 42 sequence changes were identified by the arRP arrays, of which 13 were potentially pathogenic variants affecting 14 out of the 98 patients (14%) (Table 2). Briefly, 5 of the 13 changes detected were known mutations comprising 1 nonsense substitution: p.R257X in *CERKL* (Figure 1) present in two unrelated families, 3 missense mutations: p.C948Y in *CRB1*, p.S297R and p.T342M in *RHO* and 1 acceptor site mutations: c.1297-2A>G in *MERTK*, whereas the other 8 potentially pathogenic variants were novel sequence changes: 6 missense and 2 splice site variants, all of them absent in control population. The potentially pathogenic variants were detected in 10 of the 16 retinal disease genes tiled on the array.

Regarding the missense novel mutations, comparison between the orthologs from different species revealed a high level of conservation in 5 out of the 6 substituted residues: Ile384 in *CNGA1*, Ile1232 and Cys2668 in *EYS*, Thr292 in *RLBP1* and Arg180 in *TULP1* (Figure 3). In addition, bioinformatic tools employed to evaluate both the impact of the novel sequence changes on the transcription or translation mechanisms predicted that 2 of the missense variants were possibly damaging (p.I384T in *CNGA1* and p.R180H in *TULP1*), 2 of them were shown to abolish the splicing acceptor site (c.5928-2A>G in *EYS* and c.726-3C>A in *RPE65*), and 1 disulfide bond of the *EYS*/SPAM structure seemed to be compromised by the amino acidic substitution of a Cysteine to a Phenylalanine in the position 2668.

The 13 identified potentially pathogenic sequence changes were present in 14 out of the 98 patients included in this study. Of them, 5 patients were homozygous for the mutation and the 9 remainder

Table 2. Potentially pathogenic variants detected by the arRP Array and the MLPA.

Family ID	Gene	Nucleotide change	Amino acid change	Novel/Reference	Control population studies (mutant/normal alleles)	Genotype
RP 76	<i>CERKL</i>	c.769C>T	p.R257X	[34]	-	Homozygous
RP 206	<i>CERKL</i>	c.769C>T	p.R257X	[34]	-	Homozygous
RP 95	<i>CNGA1</i>	c.1151T>C	p.I384T	Novel [†]	0/200	Heterozygous
RP 29	<i>CRB1</i>	c.2843G>A	p.C948Y	[38]	-	Homozygous
RP 234	<i>EYS</i>	c.3695T>C	p.I1232T	Novel	0/200	Heterozygous
RP 234	<i>EYS</i>	c.1767-?_2023+?del	p.C590YfsX4	[26]	-	Heterozygous
RP 234	<i>EYS</i>	c.1971delT	p.S658VfsX4	[26]	-	Heterozygous
RP 109	<i>EYS</i>	c.5928-2A>G	-	Novel [◇]	0/200	Heterozygous
RP 202	<i>EYS</i>	c.8003G>T	p.C2668F	Novel*	0/200	Heterozygous
RP 96	<i>MERTK</i>	c.1297-2A>G	-	[39]	-	Homozygous
RP 353	<i>PROM1</i>	c.1532C>A	p.T520K	Novel	0/200	Heterozygous
RP 242	<i>RHO</i>	c.891C>T	p.S297R	[40]	-	Heterozygous
RP 322	<i>RHO</i>	c.1025C>T	p.T342M	[41]	-	Homozygous
RP 108	<i>RLBP1</i>	c.875A>T	p.T292M	Novel	0/200	Heterozygous
RP 193	<i>RPE65</i>	c.726-3C>A	-	Novel [◇]	0/200	Heterozygous
RP 333	<i>TULP1</i>	c.539G>A	p.R180H	Novel [†]	0/200	Heterozygous

*Disulfide Bond Alteration predicted by Dianna 1.1.

[†]Predicted as possibly damaging by Polyphen (V1).

[◇]Splicing site Mutation by Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) website [42], [43].

doi:10.1371/journal.pone.0027894.t002

were heterozygous. For patients with a single heterozygotic potentially pathogenic variant, further analyses of genetic variants not detectable by our customized resequencing chip would be valuable for the detection of the second mutation in arRP genes.

The remaining 29 detected sequence changes comprised 9 amino acid substitutions, 1 5'UTR variant, 6 synonymous changes, and 13 intronic variants that do not have any predicted deleterious effect on splicing, can be considered as unreported SNPs (Table S1). Among the novel nonsynonymous changes, p.G618S in *EYS* was initially reported as disease-causing variant [25], but the segregation studies results in the Spanish family discarded their pathogenic role. The detection of these SNPs is a good validation test for the array as it illustrates the ability of the chip to detect single base pair substitutions

MLPA Analysis of the *EYS* Gene

The present study led to the identification of one intragenic *EYS* rearrangement in the family RP 234 that carries a novel very likely

pathogenic change (p.I1232T, absent in controls). MLPA analysis revealed 0% dosage in exon 12 of *EYS* whereas 50% dosage was shown in the adjacent intron 12. The resequencing data of that exon showed an apparently normal readout suggesting that at least one allele is present. This situation could be explained by the co-existence of two independent pathogenic events occurring in different alleles. One of them is the heterozygous deletion of the exon12-intron12, and the other one would be an underlying defect on the DNA sequence where the MLPA probe should hybridize. As we expected, further dideoxy sequencing showed a homozygous deletion of 1 bp disabling the correct hybridization of the MLPA probe (Figure 2). It is noteworthy that both the large deletion (c.1767-?_2023+?del; p.C590YfsX4) and the 1 bp deletion (c.1971delT; p.S658VfsX4) are known mutations previously described by our group in other unrelated RP families [14], [26] (Table 2).

In an attempt to define a characteristic profile that may detect these heterozygous mutations by our resequencing approach, the

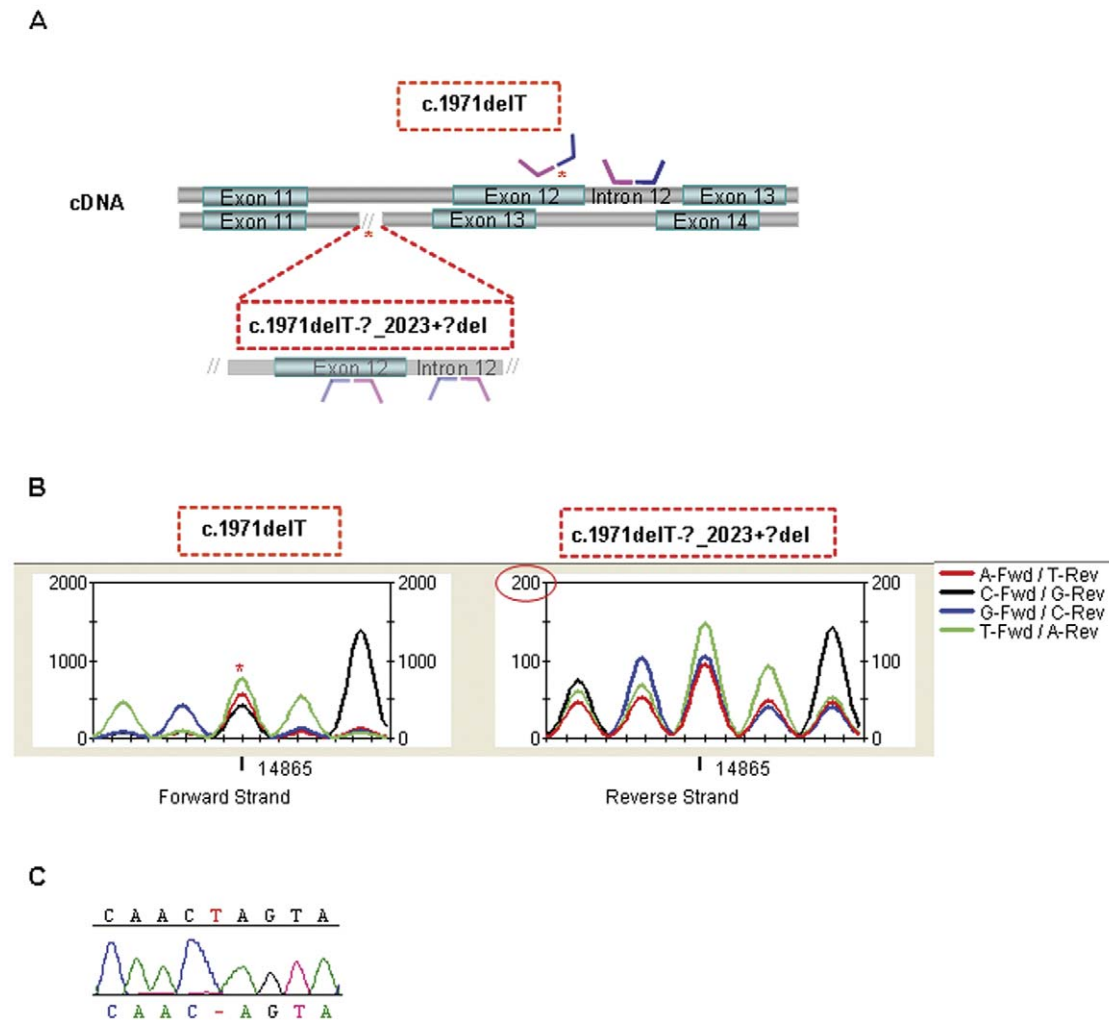
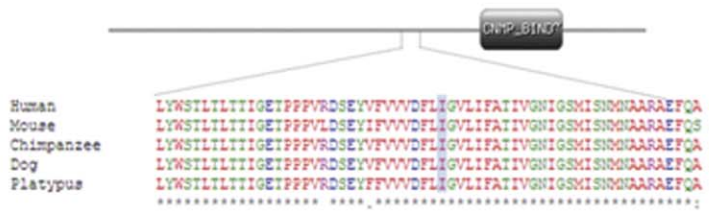
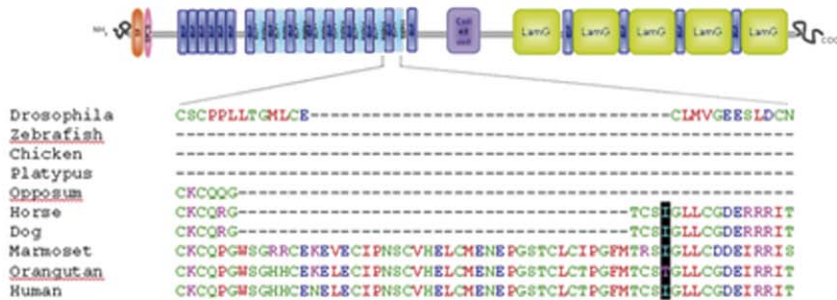


Figure 2. Mutations identified in the RP 234 family using several detection approaches. **A.** Schematic representation of the MLPA hybridization probe regions of *EYS* exons 11–14. The asterisks show the location of the mutations and how they affect the hybridization process. The MLPA dosage readouts and the fragment sizes for the exon-intron 12 are also represented in a box. **B.** Resequencing trace graph of the five bases interval including the mutated single nucleotide (c.1971delT). Forward and reverse strands correspond to each of the patient alleles. Manual examination of signal intensity data (Y axis) is coherent with the two mutations. The asterisk points the deleted base in the forward allele. The intensity in reverse strand is 10-fold lower than forward (circle in red) suggesting that this allele is deleted (c.1767-?_2023+?del). **C.** Dideoxy sequencing electropherogram of exon 12 of the index patient confirming the deletion of a T (c.1971delT). doi:10.1371/journal.pone.0027894.g002

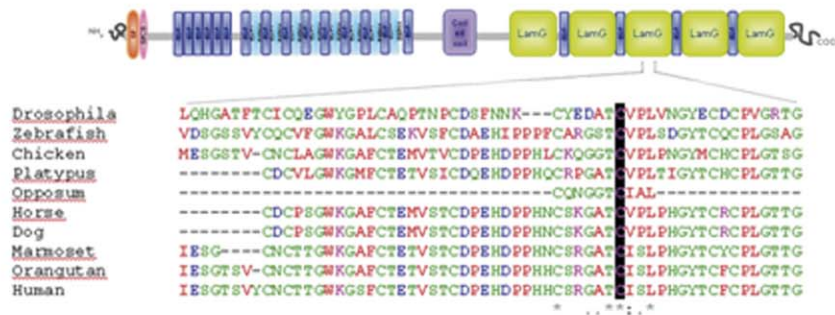
A *CNGA1* (MIM: 123825) p.I384T



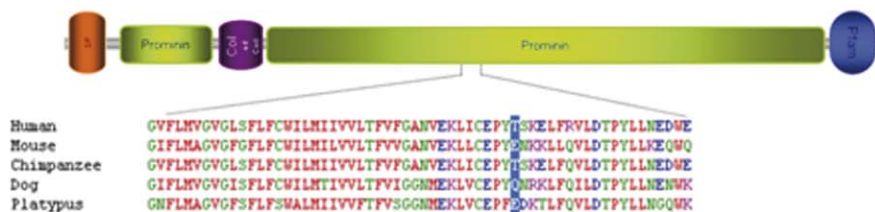
B *EYS* (MIM: 612424) p.I1232T



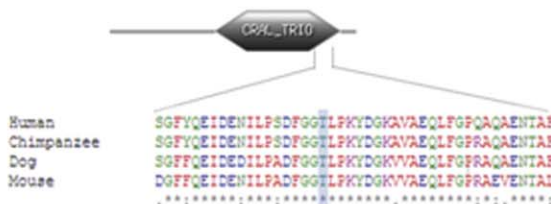
C *EYS* (MIM: 612424) p.C2668F



D *PROM1* (MIM: 604365) p.T520K



E *RLBP1* (MIM: 180090) p.T292M



F *TULP1* (MIM: 602280) p.R180H

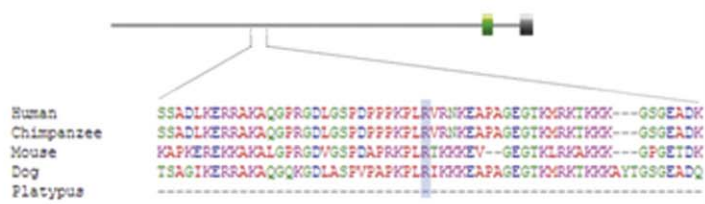


Figure 3. ScanProsite predicted domains of the proteins and ClustalW alignment of the orthologs from different species. A. *CNGA1* (p.I384T). B. *EYS* (p.I1232T). C. *EYS* (p.C2668F). D. *PROM1* (p.T520K). E. *RLBP1* (p.T292M). F. *TULP1* (p.R180H). To study the *EYS* variants, we have used the orthologs alignment performed in Barragan *et al.* [5]. The residue highlighted is mutated. doi:10.1371/journal.pone.0027894.g003

intensity signal of each strand was evaluated. Forward and reverse strands correspond to each of the patient alleles. The results of the manual interrogation were coherent with the two mutated alleles. The deleted T appeared as an unclear nucleotide in the forward strand whereas the deletion of the whole allele manifested as a drop in the intensity signal in the reverse strand (Figure 2).

Discussion

Molecular diagnosis of RP is a challenging task given the huge genetic heterogeneity of this disease. The large number of deleterious mutations that can be found in each gene, and the multiple genes that can be mutated to give the same phenotype, make the detection of mutations by traditional screening methods costly and time consuming. Thus, there is an urgent need for a validated screening method that allows the detection of mutations simultaneously in several genes in a single high-throughput platform. Microarray sequencing technology offers a rapid method for detecting mutations in patients with genetically heterogeneous diseases such as arRP. Using the resequencing technology to read comprehensive nucleotide sequence of a number of genes presents some advantages in comparison with other available techniques. The resequencing chip is 5 to 10 times less expensive than conventional sequencing [12] and although the APEX array is cheaper, the resequencing chip provides the significant benefit of detecting novel variants.

The detection of known and novel mutations in this study establishes array-based resequencing as an effective tool with potential to improve diagnosis, which hopefully may help to provide genetic counselling and give a more reliable prognosis in patients and their families.

Mutational screening of arRP patients using resequencing array-based technology has been previously reported [11–13], but our arRP sequencing array offers for the first time an opportunity to screen for sequence alterations in the *EYS* gene. The high number of *EYS* mutations detected by PCR based direct dideoxy genomic sequencing published in different arRP patients and the diverse ethnic origins of these families [5], [25–30] set this gene as the most prevalent one in arRP (15.9% in Spanish families) [5]. The combination of the large size of this gene and the lack of hot spots of disease-causing mutations make the screening of this gene using traditional methods slow and expensive, but these disadvantages can now be overcome by the implementation of the array-based resequencing technology.

The call rates for the arrays in this study (92%) are within the range of previous studies (90–99%). Considering that this study utilised higher numbers of arrays than previous studies, we would have expected the call rates to be higher but the main problem here was due to hybridization failures resulting in no-called regions. Certain probes as those with higher than average GC content or those containing repeat regions can be problematic for resequencing arrays and are more likely to be no-called. Analysis of the sequence on RepeatMasker revealed that some regions of the genes *CNGA1*, *TULP1* and *PDE6B* are particularly rich in repeat sequences resulting in decreased signal and increased chance of being no-called. Extreme caution must be exerted in designing the probes content of the chip in order to avoid a call rate decrease.

The arRP chip reported herein can screen for most known disease causing mutations due to single nucleotide changes but as expected, heterozygous deletions, insertions and CNVs have been

the main problem for the array. In part, some of these limitations can be overcome with improvements in the chip design like including specific probes for known insertions and deletions [21], [31], [32] but they only allow the detection of known changes and it would be convenient to periodically update the resequencing design with newer insertions and deletions. For that reason and for the high prevalence of CNVs recently reported in the *EYS* gene in Spanish families [14], we decided to use the MLPA technology in those families where only one pathogenic change had been identified by the resequencing approach in that gene. Despite the reduced number of families included on the MLPA study, the results obtained were very interesting and allowed the identification of two independent pathogenic events in one patient (Family RP 234) affecting two different alleles. These results evidenced that the MLPA technique is able to detect not only CNVs but also short deletions of 1 bp if they are located within the hybridization region of the probe. In our opinion, the combination of the two screening strategies is currently the most rapid and efficient method for mutation screening of arRP in clinical practice. Regarding the family RP 234, a third heterozygous variant was detected in the *EYS* gene (c.3695T>C; p.I1232T) absent in controls and evolutionarily conserved. Possibly, this variation could represent a rare SNP but also a mutation that may modify the phenotype. Such mechanisms involving the presence of modifier alleles have been suggested to explain variability in disease phenotype among affected family members with retinal dystrophies [33]. Great caution must be exerted when interpreting the functional effect of such novel variants and a more comprehensive study in additional members of the family would reveal them to be disease causing, modifier or polymorphic variants.

In addition to mutations detected in the genes routinely tested for arRP, we identified two mutations (p.T342M and p.S297R) typically associated with autosomal dominant cases of RP (adRP) in the rhodopsin gene, *Rho*. This evidenced that *Rho* not only plays an important role in the pathogenesis of adRP, but it is also involved in a number of arRP cases and its routine analysis in those families should be considered.

Most of the RP associated genes have hundreds of disease alleles but sometimes one predominates. A few examples are the deleterious c.769C>T allele of *CERKL* that causes a substantial proportion of sporadic and arRP Spanish cases [34], [35], and the c.2688T>A allele of *CRB1* described as a frequent mutation by Vallespin *et al.* [36]. The *EYS* variants c.1971delT and c.1767-?_2023+?del have also been detected in unrelated Spanish and French families [14], [26]. Yet haplotype analyses would be valuable to determine the origin of these mutations, identifying recurrent mutations in Caucasian and especially specific populations such as the Spanish one provides an essential source for the molecular and clinical diagnosis of such a heterogeneous disease.

Although further refinements in array design, analysis algorithms or both would need to be performed to improve this tool and optimise research translation into the clinical setting, this work shows that resequencing array-based technology can be used as a rapid screening tool. The large amount of data generated by this high-throughput methodology is an estimable resource not only for the establishment of genotype-phenotype correlations, but also for the identification of modifier alleles that could be responsible of the significant phenotypic variability of RP. Furthermore, this technology has provided new information and enhances our

understanding of the aetiology and pathogenesis of such a genetically heterogeneous disease, and ultimately may lead to better clinical management of patients and their families.

Finally, the design of this array can easily be transformed in an equivalent diagnostic system based on targeted enrichment followed by next generation sequencing.

Supporting Information

Table S1 Unlikely but unknown pathogenic coding variants detected by the arrp array. (DOC)

References

- Hamel C (2006) Retinitis Pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis* 1: 40.
- Wright AF, Chakarova CF, Abd El-Aziz MM, Bhattacharya SS (2010) Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat Rev Genet* 11: 273–284.
- Retinal Information Network website. Available: <http://www.sph.uth.tmc.edu/retnet/>. Accessed 2011 Jun 1.
- Hartong DT, Berson EL, Dryja TP (2006) Retinitis Pigmentosa. *Lancet* 368: 1795–1809.
- Barragan I, Borrego S, Pieras JI, Gonzalez-del Pozo M, Santoyo J, et al. (2010) Mutation spectrum of EYS in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* 31: E1772–800.
- Asper website. Available: <http://www.asperbio.com/>. Accessed 2011 Jun 1.
- Ashley EA, Butte AJ, Wheeler MT, Chen R, Klein TE, et al. (2010) Clinical assessment incorporating a personal genome. *Lancet* 375: 1525–1535.
- Ormond KE, Wheeler MT, Hudgins L, Klein TE, Butte AJ, et al. (2010) Challenges in the clinical application of whole-genome sequencing. *Lancet* 375: 1749–1751.
- Hacia JG (1999) Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nat Genet* 21: 42–47.
- Clark GR, Crowe P, Muszynska D, O'Prey D, O'Neill J, et al. (2010) Development of a Diagnostic Genetic Test for Simplex and Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa. *Ophthalmology* 117: 2169–2177.
- Mandal MN, Heckenlively JR, Burch T, Chen L, Vasireddy V, et al. (2005) Sequencing arrays for screening multiple genes associated with early-onset human retinal degenerations on a high-throughput platform. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 3355–3362.
- Booi JC, Bakker A, Kulumbetova J, Moutaoukil Y, Smeets B, et al. (2011) Simultaneous Mutation Detection in 90 Retinal Disease Genes in Multiple Patients Using a Custom-designed 300-kb Retinal Resequencing Chip. *Ophthalmology* 118: 160–167.
- Simpson DA, Clark GR, Alexander S, Silvestri G, Willoughby CE (2011) Molecular diagnosis for heterogeneous genetic diseases with targeted high-throughput DNA sequencing applied to retinitis pigmentosa. *J Med Genet* 48: 145–151.
- Pieras JI, Barragan I, Borrego S, Audo I, González-Del Pozo M, et al. (2011) Copy-Number Variations in EYS: A significant event in the appearance of arRP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 5625–5631.
- Repeat masker website provided in the public domain by the University of Washington Genome Center, Seattle, WA. Available: <http://www.repeatmasker.org/>. Accessed 2011 Jun 1.
- Cutler DJ, Zwick ME, Carrasquillo MM, Yohn CT, Tobin KP, et al. (2001) High-throughput variation detection and genotyping using microarrays. *Genome Res* 11: 1913–1925.
- Warrington JA, Shah NA, Chen X, Janis M, Liu C, et al. (2002) New developments in high-throughput resequencing and variation detection using high density microarrays. *Hum Mutat* 19: 402–409.
- MGED Society website. Available: <http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html>. Accessed 2011 Sep 1.
- Conde L, Vaquerizas JM, Dopazo H, Arbiza L, Reumers J, et al. (2006) PupaSuite: finding functional single nucleotide polymorphisms for large-scale genotyping purposes. *Nucleic Acids Res* 34: W621–625.
- Reumers J, Conde L, Medina I, Maurer-Stroh S, Van Durme J, et al. (2008) Joint annotation of coding and non-coding single nucleotide polymorphisms and mutations in the SNPeff and PupaSuite databases. *Nucleic Acids Res* 36: D825–829.
- Bruce CK, Smith M, Rahman F, Liu ZF, McMullan DJ, et al. (2010) Design and validation of a metabolic disorder resequencing microarray (BRUM1). *Hum Mutat* 31: 858–865.
- Lebet T, Chiles R, Hsu AP, Mansfield ES, Warrington JA, et al. (2008) Mutations causing severe combined immunodeficiency: detection with a custom resequencing microarray. *Genet Med* 10: 575–585.
- Liu C, Aronow BJ, Jegga AG, Wang N, Miethke A, et al. (2007) Novel resequencing chip customized to diagnose mutations in patients with inherited syndromes of intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 132: 119–126.
- HGMD website. Available: <http://www.hgmd.org>. Accessed 2011 Sep 1.
- Audo I, Sahel JA, Mohand-Said S, Lancelot ME, Antonio A, et al. (2010) EYS is a major gene for rod-cone dystrophies in France. *Hum Mutat* 31: E1406–1435.
- Abd El-Aziz MM, Barragan I, O'Driscoll CA, Goodstadt L, Prigmore E, et al. (2008) EYS, encoding an ortholog of *Drosophila* spacemaker, is mutated in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 40: 1285–1287.
- Collin RW, Littink KW, Klevering BJ, van den Born LI, Koenekoop RK, 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.
- Abd El-Aziz MM, O'Driscoll CA, Kaye RS, Barragan I, El-Ashry MF, et al. (2010) Identification of Novel Mutations in the ortholog of *Drosophila* eyes shut Gene (*EYS*) Causing Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 4266–4272.
- Bandah-Rozenfeld D, Littink KW, Ben-Yosef T, Strom TM, Chowers I, et al. (2010) Novel null mutations in the *EYS* gene are a frequent cause of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Israeli population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 4387–4394.
- Littink KW, van den Born LI, Koenekoop RK, Collin RW, Zonneveld MN, et al. (2010) Mutations in the *EYS* Gene Account for Approximately 5% of Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa and Cause a Fairly Homogeneous Phenotype. *Ophthalmology* 117: 2026–2033.
- Karaman MW, Groshen S, Lee CC, Pike BL, Hacia JG (2005) Comparisons of substitution, insertion and deletion probes for resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res* 33: e33.
- Kothiyal P, Cox S, Ebert J, Husami A, Kenna MA, et al. (2010) High-throughput detection of mutations responsible for childhood hearing loss using resequencing microarrays. *BMC Biotechnol* 10: 10.
- Walia S, Fishman GA, Swaroop A, Branham KE, Lindeman M, et al. (2008) Discordant phenotypes in fraternal twins having an identical mutation in exon ORF15 of the RPGR gene. *Arch Ophthalmol* 126: 379–384.
- Avila-Fernandez A, Riveiro-Alvarez R, Vallespin E, Wilke R, Tapias I, et al. (2008) CERKL mutations and associated phenotypes in seven Spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 2709–2713.
- Avila-Fernandez A, Cantalapiedra D, Aller E, Vallespin E, Aguirre-Lamban J, et al. (2010) Mutation analysis of 272 Spanish families affected by autosomal recessive retinitis pigmentosa using a genotyping microarray. *Mol Vis* 16: 2550–2558.
- Vallespin E, Cantalapiedra D, Riveiro-Alvarez R, Wilke R, Aguirre-Lamban J, et al. (2007) Mutation Screening of 299 Spanish Families with Retinal Dystrophies by Leber Congenital Amaurosis Genotyping Microarray. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 5653–5661.
- Hagstrom SA, North MA, Nishina PL, Berson EL, Dryja TP (1998) Recessive mutations in the gene encoding the tubby-like protein TULP1 in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 18: 174–6.
- Lotery AJ, Malik A, Shami SA, Sindhi M, Chohan B, et al. (2001) CRB1 mutations may result in retinitis pigmentosa without para-arteriolar RPE preservation. *Ophthalmic Genet* 22: 163–169.
- Gal A, Li Y, Thompson DA, Weir J, Orth U, et al. (2000) Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 26: 270–271.
- Souied E, Gerber S, Rozet JM, Bonneau D, Dufier JL, et al. (1994) Five novel missense mutations of the rhodopsin gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 3: 1433–1434.
- Stone EM, Vandenberg K, Kimura AE, Lam BL, Fishman GA, et al. (1993) Novel mutations in the peripherin (RDS) and rhodopsin genes associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 1149–1149.
- Splicing site Mutation by Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP) website. Available: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html. Accessed 2011 Sep 1.
- Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D (1997) Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* 4: 311–323.

Acknowledgments

We would like to thank the patients and families that participated in this study.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GA SB IB. Performed the experiments: MGP IB JP NM BN. Analyzed the data: MGP IB JP NM BN JS JD. Wrote the paper: MGP GA JD JS. Selection and evaluation of the patients: SB.

Whole-exome sequencing identifies novel compound heterozygous mutations in *USH2A* in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa

Cristina Méndez-Vidal,^{1,2} María González-del Pozo,^{1,2} Alicia Vela-Boza,³ Javier Santoyo-López,³ Francisco J. López-Domingo,³ Carmen Vázquez-Marouschek,⁴ Joaquin Dopazo,^{3,5,6} Salud Borrego,^{1,2} Guillermo Antiñolo^{1,2,3}

¹Department of Genetics, Reproduction and Fetal Medicine, Institute of Biomedicine of Seville, University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Seville, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Seville, Spain; ³Medical Genome Project, Genomics and Bioinformatics Platform of Andalusia (GBPA), Seville, Spain; ⁴Department of Ophthalmology, University Hospital Virgen del Rocío, Seville, Spain; ⁵Department of Bioinformatics, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain; ⁶Functional Genomics Node (INB), Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain

Purpose: Retinitis pigmentosa (RP) is an inherited retinal dystrophy characterized by extreme genetic and clinical heterogeneity. Thus, the diagnosis is not always easily performed due to phenotypic and genetic overlap. Current clinical practices have focused on the systematic evaluation of a set of known genes for each phenotype, but this approach may fail in patients with inaccurate diagnosis or infrequent genetic cause. In the present study, we investigated the genetic cause of autosomal recessive RP (arRP) in a Spanish family in which the causal mutation has not yet been identified with primer extension technology and resequencing.

Methods: We designed a whole-exome sequencing (WES)-based approach using NimbleGen SeqCap EZ Exome V3 sample preparation kit and the SOLiD 5500×1 next-generation sequencing platform. We sequenced the exomes of both unaffected parents and two affected siblings. Exome analysis resulted in the identification of 43,204 variants in the index patient. All variants passing filter criteria were validated with Sanger sequencing to confirm familial segregation and absence in the control population. In silico prediction tools were used to determine mutational impact on protein function and the structure of the identified variants.

Results: Novel Usher syndrome type 2A (*USH2A*) compound heterozygous mutations, c.4325T>C (p.F1442S) and c.15188T>G (p.L5063R), located in exons 20 and 70, respectively, were identified as probable causative mutations for RP in this family. Family segregation of the variants showed the presence of both mutations in all affected members and in two siblings who were apparently asymptomatic at the time of family ascertainment. Clinical reassessment confirmed the diagnosis of RP in these patients.

Conclusions: Using WES, we identified two heterozygous novel mutations in *USH2A* as the most likely disease-causing variants in a Spanish family diagnosed with arRP in which the cause of the disease had not yet been identified with commonly used techniques. Our data reinforce the clinical role of WES in the molecular diagnosis of highly heterogeneous genetic diseases where conventional genetic approaches have previously failed in achieving a proper diagnosis.

Inherited retinal dystrophies (IRDs) are a group of disorders characterized by progressive dysfunction and death of retinal photoreceptors. Retinitis pigmentosa (RP, MIM# 26800) is the most common form of retinal dystrophy and is characterized by significant clinical and genetic heterogeneity (reviewed in [1]). Patients with RP initially display night blindness followed by tunnel vision due to rod defects, which often progresses to complete blindness when the cones are also affected [2]. Most patients with RP have no associated systemic disease and are considered to have non-syndromic

RP. Prevalence of non-syndromic RP is approximately 1 in 4,000 [3]. The condition may segregate as an autosomal dominant RP (24%), autosomal recessive (41%), or X-linked recessive trait (22%). The remaining 12% of cases are presumed to result from non-genetic factors, non-Mendelian inheritance (for example, mitochondrial or de novo mutations) or complex inheritance (digenic or polygenic inheritance) [4]. A few cases, however, have associated non-ocular symptoms and are classified as syndromic RP. The most frequent forms of syndromic RP are Usher and Bardet-Biedl syndromes. Usher syndrome can be divided into type 1 (2% to 6% of RP cases), which has profound congenital deafness and vestibular ataxia, and type 2 (15% of all cases of RP), which has an associated moderate non-progressive hearing loss [5].

Correspondence to: Guillermo Antiñolo, Department of Genetics, Reproduction and Fetal Medicine, University Hospital Virgen del Rocío Avenida Manuel Siurot s/n 41013, Seville, Spain; Phone: +34 955 012 772; FAX: +34 955 013 473; email: guillermo.antinolo.sspa@juntadeandalucia.es

To date, 36 genes have been implicated in non-syndromic arRP and three additional loci have been mapped (*RetNet*). In spite of the intense mapping efforts over the past two decades, mutations detectable in known RP genes have been able to explain only a relatively small percentage of cases. The two most prevalent genes known to cause arRP are eyes shut homolog (*EYS*; MIM# 602772) [6], which has been reported to account in different population-based studies for up to 18% of arRP [7], and Usher syndrome type 2A (*USH2A*) (MIM# 608400), found in around 5% of arRP cases [8]. Therefore, many genes have yet to be identified, as well as mutations in regions of known RP genes not routinely analyzed.

USH2A, located on chromosome 1q41, is the most commonly mutated gene in Usher syndrome type 2 (USH2) [9]. Genetic overlap between arRP and Usher syndrome exists as mutations in the *USH2A* and clarin 1 (*CLRN1*) genes are found in both disorders [10,11]. *USH2A* presents two alternatively spliced isoforms: a short isoform named “a,” consisting of 21 exons, and a long isoform named “b,” consisting of 51 additional exons at the 3' end of the short isoform [12-14]. The isoform a is predicted to be secreted to the extracellular matrix, whereas the isoform b is anchored on the cell membrane. The long variant is the predominant form in the retina [15]. The proteins encoded, also known as usherins, are multidomain proteins. The isoform b is composed of three regions: a large extracellular region consisting of an N-terminal signal peptide, laminin G-like domain (LamGL), laminin domain N-terminal (LamNT), laminin-type EGF-like modules (EGF-Lam), fibronectin type III (FN3) repeats, and laminin G domains (LamG), a transmembrane region (TM), and a cytoplasmic C-terminal domain containing a PDZ-binding motif. In mammalian photoreceptors, usherin is localized to the connecting cilia [16,17], where it is likely to be involved in cargo delivery from the inner segment to the outer segment of the photoreceptor cell [14-16,18]. Together, these data suggest that usherin is crucial for the long-term maintenance of photoreceptors. Mutations in *USH2A* are spread throughout the 72 exons and their flanking intronic regions, and consist of nonsense and missense mutations, deletions, duplications, large rearrangements, and splicing variants (*UMDUSHbases*) [19,20]. In spite of the significant number of publications pointing to *USH2A* as one of the most common mutated genes in arRP, phenotype-genotype correlations have not yet been established.

Current diagnostic strategies for RP include the use of diverse techniques. Commercially available genotyping microarrays are based on arrayed primer extension technology (APEX, Asper Ophthalmics, Tartu, Estonia), which enable the simultaneous screening of multiple genes, but

they can detect only a fixed number of known mutations [21]. Custom-designed resequencing microarrays are a valuable alternative that allow the detection of novel mutations but are limited to a known set of genes [22]. Moreover, since these technologies have been designed specifically to approach a particular inheritance pattern, achieving a molecular diagnosis in simplex cases and/or overlapping phenotypes may be hampered. Sanger sequencing of known genes is still the most reliable method in determining the genetic cause, but this approach is not affordable due to the large genetic heterogeneity of RP. Most of these limitations can now be overcome with the implementation of massive sequencing technologies that have facilitated the discovery of many causative genes and gene variants of complex traits.

Here, we have conducted whole-exome sequencing to identify the disease-causing gene in a Spanish family diagnosed with arRP in which the cause of the disease had not yet been identified with primer extension technology and resequencing. We have found two novel *USH2A* compound heterozygous mutations consistent with being the cause of disease in this family. These mutations expand the mutant spectrum of *USH2A* in patients with arRP and further support the use of exome sequencing in the genetic diagnosis of genomic disorders with extreme phenotypic and genetic overlap.

METHODS

Subjects and clinical assessment: This study involved nine individuals, five males and four females, aged 41 to 59, from a Spanish family with an inheritance pattern and phenotypic features consistent with arRP derived from the Department of Ophthalmology at our hospital. The study was performed in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki [23] and the ethical guidelines of our institution. A group of 200 matching control individuals was also recruited. Written informed consent was obtained from all participants. Clinical diagnosis of retinitis pigmentosa was based on visual acuity, fundus photography, and computerized testing of central and peripheral visual fields. Typical initial symptoms include night blindness, restriction of visual field, bone spicule-like pigmentation, attenuation of retinal vessels, and waxy disc pallor. Balance and hearing examinations were normal.

DNA extraction: All subjects underwent peripheral blood extraction for genomic DNA isolation from leukocytes using the MagNA Pure LC system (Roche, Indianapolis, IN) according to the manufacturer's instructions. DNA samples were stored at -80 °C until used. DNA integrity was evaluated with 1% agarose gel electrophoresis.

Previous molecular genetic analysis: The DNA sample from the index patient was first analyzed and excluded for known mutations by applying commercially available microarray analysis (Asper Biotech, Tartu, Estonia). In addition, pathogenic variants in ceramide kinase-like protein (*CERKL*), cyclic nucleotide gated channel alpha 1 (*CNGA1*), crumbs homolog 1 (Drosophila) (*CRBI*), eyes shut homolog (Drosophila) (*EYS*), isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta (*IDH3B*), lecithin retinol acyltransferase (phosphatidylcholine--retinol O-acyltransferase) (*LRAT*), c-mer proto-oncogene tyrosine kinase (*MERTK*), nuclear receptor subfamily 2, group E, member 3 (*NR2E3*), phosphodiesterase 6B, cGMP-specific, rod, beta (*PDE6B*), progressive rod-cone degeneration (*PRCD*), prominin 1 (*PROM1*), retinal G protein coupled receptor (*RGR*), rhodopsin (*RHO*), retinaldehyde binding protein 1 (*RLBPI*), retinal pigment epithelium-specific protein 65 kDa (*RPE65*), and tubby like protein 1 (*TULPI*) were excluded with a custom genome resequencing microarray experiment [22].

Whole-exome sequencing: Library preparation and exome capture were performed according to a protocol based on the Baylor College of Medicine protocol version 2.1 with several modifications. Briefly, 5 µg of input genomic DNA was sheared, end-repaired, and ligated with specific adaptors. A fragment size distribution ranging from 160 bp to 180 bp after shearing and 200 bp to 250 bp after adaptor ligation was verified with Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The library was amplified by precapture linker-mediated PCR (LM-PCR) using FastStart High Fidelity PCR System (Roche). After purification, 2 µg LM-PCR product were hybridized to SeqCap EZ Exome libraries V3 (Roche Nimblegen, Madison, WI). After washing, amplification was performed with post-capture LM-PCR using FastStart High Fidelity PCR System (Roche). Capture enrichment was measured with qPCR according to the NimbleGen protocol. The successfully captured DNA was measured with Quant-iT PicoGreen dsDNA reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and subjected to standard sample preparation procedures for sequencing with the SOLiD 5500×1 platform as recommended by the manufacturer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Shortly, emulsion PCR was performed on E80 scale (about 1 billion template beads) using a concentration of 0.616 pM of enriched captured DNA. After breaking and enrichment, about 276 million enriched template beads were sequenced per lane on a six-lane SOLiD 5500×1 slide.

Variant analysis: SOLiD 5500×1 reads were aligned against the human genome reference (hg19) using the program Blat-like Fast Accurate Search Tool (**BFAST**). Properly mapped reads were filtered with the **SAMtools package**, which was

also used to sort and index SAM files. For prediction of variants (variant calling), only reads mapping to a unique position in the reference genome were used. Variants were identified with the Genome Analysis Toolkit (**GATK**) software taking into account the single nucleotide polymorphisms obtained from the Single Nucleotide Polymorphism Database (**dbSNP**, National Center for Biotechnology Information), and **1,000 Genomes project**. Secondary analysis was performed with a custom script that uses **ANNOVAR** [24], **SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant)**, and **PolyPhen-2** (Polymorphism Phenotyping v2) for annotating the variants. Annotated, non-synonymous variants found in affected individuals were compared to variants present in the non-affected relatives. Finally, the remaining variants were compared with variants obtained from a group of healthy controls from the same local population as the family under study. Variants present in affected individuals but not in healthy individuals of the family or in the control local population were ranked based on the analysis of the interactome to generate a list of candidate genes. The nomenclature for the variations observed at DNA (cfs) level followed the recommendations of the **Human Genome Variation Society** [25], where nucleotide +1 is the A of the ATG translation initiation codon in the *USH2A* reference sequence **NM_206933.2**.

Verification and assessment of the pathogenicity of variants: The novel identified variants were subsequently verified and screened in 200 healthy matched control subjects with Sanger sequencing. Cosegregation analysis was performed in available family members DNA samples. Specific primers encompassing *USH2A* exons 20 and 70 were designed (Table 1) using the Primer3 software [26]. To evaluate the pathogenicity of the novel variants, we analyzed the potential impact of a given variant on the function or structure of the encoded protein based on conservation, physical properties of the amino acids, or possible occurrence in regulatory or splicing motifs using bioinformatic tools PolyPhen-2, SIFT, and Splicing site Mutation by Berkeley Drosophila Genome Project (**BDGP**) website [27]. Evolutionary conservation across species was assessed through the alignment of orthologous *USH2A* protein sequences (chimpanzee, dog, bovine, mouse, rat, chicken, and zebrafish) with the human *USH2A* protein sequence, using **HomoloGene** and **Clustal Omega (ClustalO)** Tool. The **HOPE** server was used to analyze and predict the structural variations in mutant *USH2A* [28].

RESULTS

Clinical findings in affected siblings: The age of the patients ranged from 41 to 59 years at the time of diagnosis, indicating late onset RP. Affected members of the family II:1,

TABLE 1. PRIMER SEQUENCES USED TO AMPLIFY USH2A EXONS 20 AND 70 FROM GDNA SAMPLES.

Primer Name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Direction	Amplicon Length (bp)
USH2A Ex20-F	TCCTAATGGTGGTTGGCAAT	60	Sense	382
USH2A Ex20-R	AGTGAGGGAGGAGAAGACAAA	58	Antisense	382
USH2A Ex70-F	CTACAGCGAGCTGTGGTTCA	60	Sense	362
USH2A Ex70-R	GCAGCCAAAGTTGAGAAAGC	60	Antisense	362

II:3, and II:5 (Figure 1) exhibited typical clinical features of RP, including bilateral visual loss, initial hemeralopia, and restriction of visual field leaving only the central 10° functional. Fundus examination of patient II:5 showed typical signs of RP with intraretinal bone spicule-like pigment formation and preserved posterior pole. Individuals II:2 and II:7 were clinically reevaluated upon identification of potentially causative genetic variants. On examination, both patients showed initial RP symptoms, including attenuated retinal vessels, waxy pallor of the optic discs, and bone spicule-like pigment around the midperiphery.

Identification of two novel mutations in USH2A by whole-exome sequencing: We performed whole-exome sequencing of four members of the family (individuals I:1, I:2, II:1, and II:3) using Roche NimbleGen SeqCap EZ Exome V3 sample preparation kit and SOLiD 5500x1. After duplicated reads were removed, sequences were aligned to the human genome reference sequence (build hg19) using BFAST [29] (0.7.0a,"-a 2" mode) and a maximum of two mismatches allowed. Variants were called and annotated using the GATK [30] (release 1.4, Best Practices V3 filters and "DP<6") and ANNOVAR

[24] (release 2012 March 08) software packages. A mean of 43,463 SNVs per sample were identified (Table 2). Inspection of candidate variants resulted in the identification of two novel compound heterozygous mutations in the coding region (exons 20 and 70) of the long isoform of the *USH2A* gene at genomic positions 1:216363636 (c.4325T>C) and 1:215807910 (c.15188T>G). No other pathogenic mutations were found.

Variants validation: Primers that specifically amplify exons 20 and 70 were used for amplification and sequencing of *USH2A* variants. All available members of the pedigree and 200 matched control individuals were screened for the *USH2A* c.4325T>C and c.15188T>G mutations. Sanger sequencing confirmed cosegregation of both mutations with RP in this pedigree (Figure 2). In addition, two siblings not clinically diagnosed with RP at the time of enrollment (II:2 and II:7) harbored the same combination of *USH2A* mutations. Both siblings underwent clinical reevaluation revealing symptoms and signs of RP, such as bone spicule-like pigmentation in the midperiphery of both eyes, attenuation of the retinal vessels and pale waxy discs. Clinically unaffected family members had only one of the two heterozygous mutations, consistent

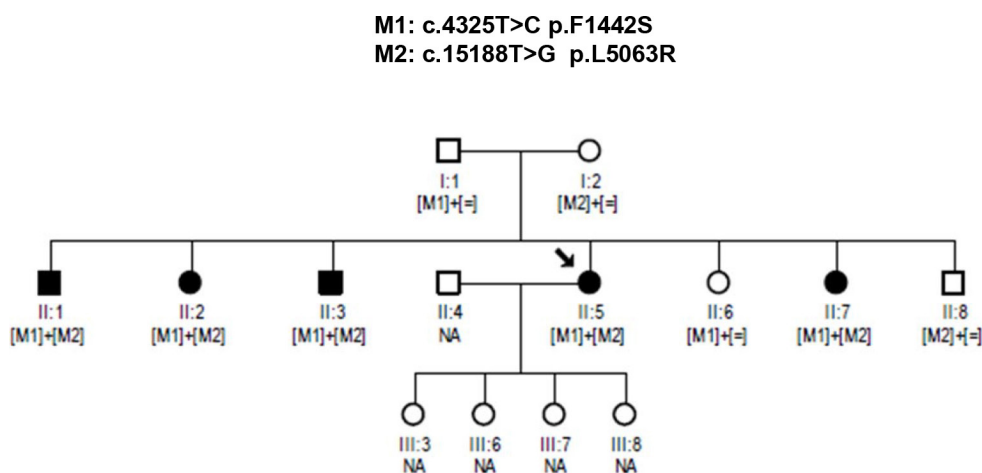


Figure 1. Pedigree with autosomal recessive retinitis pigmentosa showing cosegregation of the compound heterozygous changes, c.4325 T>C and c.15188 T>G within the *USH2A* gene in all affected members. Black symbols represent clinically affected subjects. Open symbols represent unaffected subjects. Patient II:5 (proband) is indicated with a black arrow. NA, not available.

TABLE 2. NUMBER OF CANDIDATE VARIANTS FILTERED AGAINST dbSNP AND 1000 GENOMES PUBLIC VARIATION DATABASES.

Single nucleotide variants (SNVs)	Individuals			
	II:3	II:1	I:1	I:2
Total SNVs	43,204	43,201	43,476	43,974
Non-synonymous SNVs	5850	5833	5888	5883
Filtered dbSNP	5752	5716	5781	5769
Filtered dbSNP and 1000 g	5697	5662	5735	5712
Filtered dbSNP and 1000 g and predicted deleterious	356	346	350	361

with the expected genotype–phenotype correlation. The variants were not reported in the [1,000 Genomes database](#) or in any other single nucleotide polymorphism database. We also did not find these changes in 200 control individuals.

Assessment of the pathogenicity of variants: The novel mutations resulted in a substitution of a phenylalanine for a serine at protein position 1442 (p.F1442S) and a leucine for an arginine at protein position 5063 (p.L5063R). The comparative amino acid sequence analysis in HomoloGene and ClustalO showed complete conservation at both positions (Figure 3). To predict whether a novel missense variant was deleterious, we used the combined results of two different computer algorithms: SIFT and PolyPhen. Both changes were predicted to be pathogenic (SIFT score=0.01, PolyPhen score=0.9). Together, these observations support that these changes are pathogenic variants.

Structural analysis of USH2A mutations: Structural analysis of *USH2A* performed with the HOPE server [28] suggests that the original wild-type residues and the newly introduced mutant residues differ in size, charge, and hydrophobicity values. No solved three-dimensional structure or modeling template was found for these mutations. The missense mutant p.F1442S residue, buried in a fibronectin type III domain (Figure 3), is predicted to disturb the core structure of this domain and thus affect its binding properties. Similarly, HOPE predictions showed that the mutant p.L5063R residue, located in a region annotated as a transmembrane domain, is smaller than the wild-type residue and causes the replacement of a neutral residue for a positively charged residue. These differences in charge and size are predicted to affect the hydrophobic interactions with the membrane lipids.

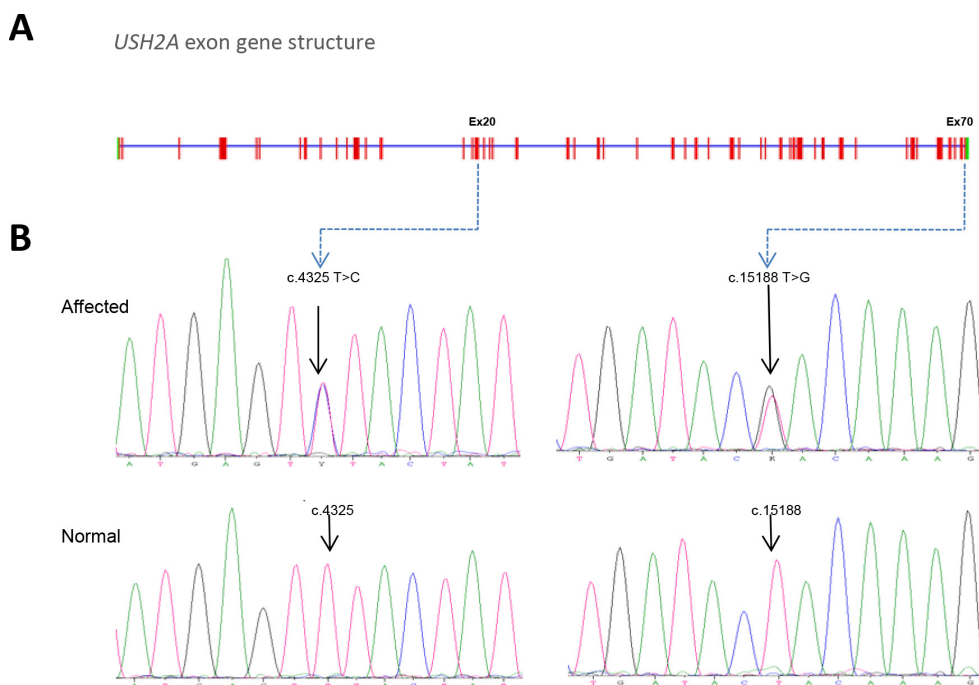


Figure 2. The *USH2A* gene harbors mutations in exons 20 and 70 of subjects with autosomal recessive retinitis pigmentosa. **A:** The *USH2A* gene structure is composed of 72 exons. **B:** Chromatograms of normal *USH2A* DNA sequence and subjects with autosomal recessive retinitis pigmentosa (arRP) show mutations at the c.4325 and c.15188 nucleotide positions in *USH2A* exons 20 and 70, respectively.

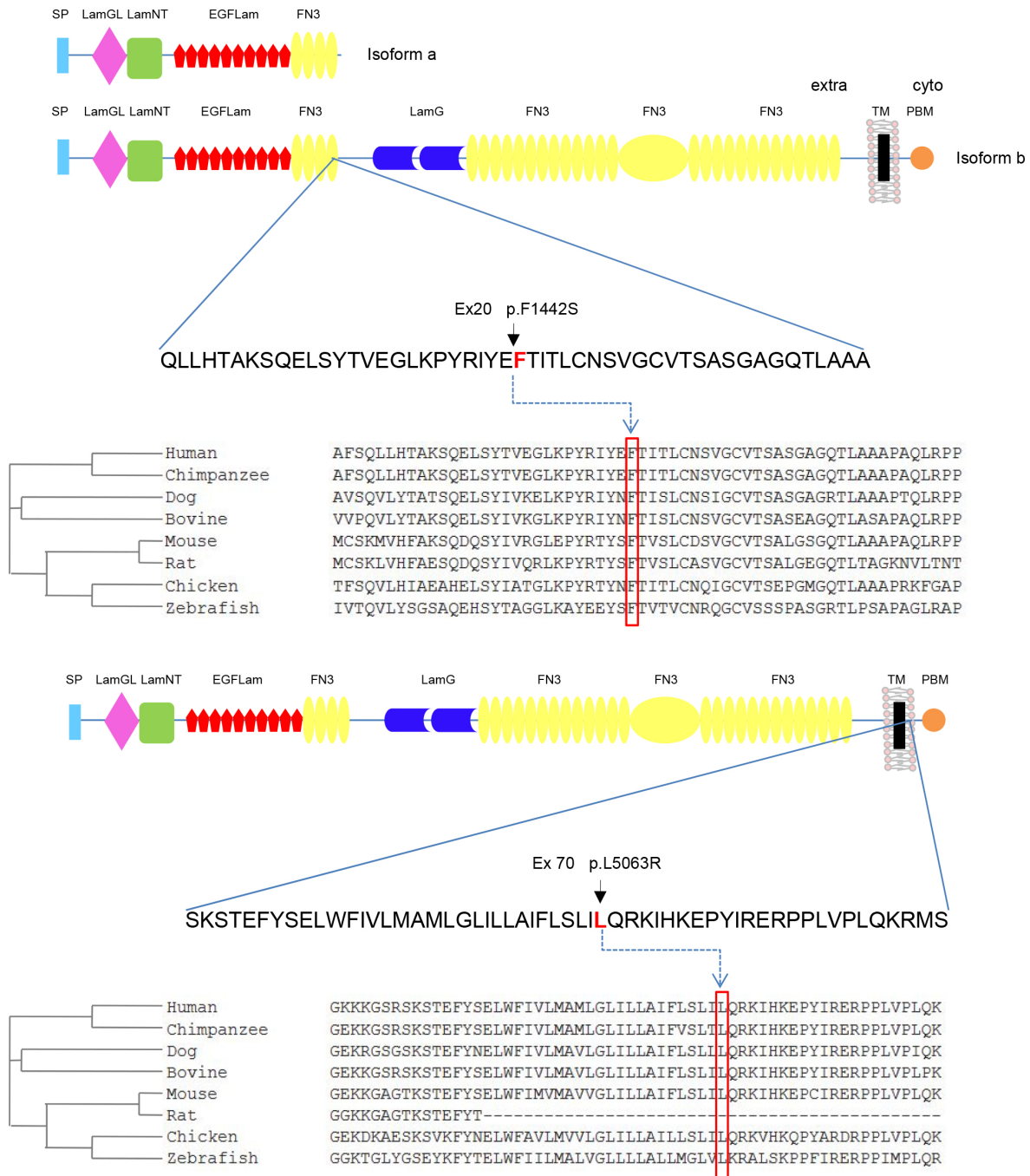


Figure 3. Schematic representation of USH2A protein structure encompassing the interspecies conservation of mutated residues. Isoform a is an N-terminal fragment of isoform b. NCBI HomoloGene-generated amino acid sequences were aligned using Clustal Omega software. The predicted orthologs show the conservation of the F1442 and L5063 residues. The F1442S mutation is located within the fourth fibronectin domain type III common for both isoforms, while the L5063R variant locates in the C-terminal transmembrane domain exclusive of isoform b. SP, signal peptide; LamGL, LamG-like jellyroll fold; Lam NT, laminin N-terminal; EGFLam, laminin-type EGF-like (LE); FN3, fibronectin type-III; LamG, laminin G; TM, transmembrane; PDB, PDZ-binding domain.

DISCUSSION

In this report, a Spanish family with five affected siblings is described. The mode of inheritance and the main clinical

features correspond to late onset autosomal recessive RP. Exome analysis of two affected siblings and healthy parents led to the identification of two novel compound heterozygous

mutations in *USH2A* segregating with the disease. Consistent with the phenotype of patients with *USH2A* mutations, the affected members of the pedigree developed retinal degeneration. Depending on the mutation, Usher genes can cause RP without hearing loss or profound deafness without RP. Hearing tests were normal. Mutations in *USH2A* are responsible for a wide spectrum of phenotypes, ranging from non-syndromic RP to full-blown USH2 [31,32]. Our result is consistent with previous findings indicating that mutations in *USH2A* may cause retinitis pigmentosa without hearing loss [8]. Although many studies have dissected *USH2A* functional properties [33-36], genotype–phenotype correlations are still not well understood. It has been hypothesized that mutations identified in patients with USH2 result in complete inactivation of the corresponding mutant protein whereas patients with non-syndromic RP can also carry severe mutations, but never in both alleles [37].

Among the variants identified in this pedigree, the *USH2A* p.F1442S mutation is located in the extracellular region within the fourth fibronectin domain type III. The *USH2A* large extracellular domain is projected into the periciliary matrix and may interact with the connecting cilium to fulfil important structural or signaling roles [15]. We propose that this mutation might affect specific connections between *USH2A* and its network of interacting protein(s). The second identified mutation, p.L5063R, represents the most downstream pathogenic mutation described to date (HGMD) and the first located in the transmembrane domain of *USH2A*. Since a change in the polarity (non-polar to polar) may affect insertion of the protein into the membrane, we speculated with the possibility that the replacement of a leucine (non-polar) to an arginine (polar, basic) may result in defective *USH2A* membrane anchorage. Furthermore, the p.F1442S change affects long and short isoforms while the p.L5063R variant affects only the long isoform of *USH2A*. Since the long variant is the predominant form in the retina [15] and both copies of the large protein are defective in affected individuals, we support the hypothesis that non-syndromic RP might be caused by two missense mutations in the long isoform. The residual function of usherin would be enough for proper functioning of the stereocilia of the inner ear but insufficient for photoreceptors' integrity maintenance. This is in agreement with the low transcript levels of the long isoform in the cochlea [14].

The index patient investigated here had previously undergone selected genotyping (APEX analysis, arRP panel) and custom resequencing microarray [22], but both mutational screening approaches failed to identify the underlying gene defect in this family. Genetic underlying defects may be

overlooked if the method used for the analysis is confined to the screening of a set of mutations in particular genes. The resequencing chip allows the identification of novel mutations, but regrettably, *USH2A* was not tiled onto our array. Since a significant number of mutations in the RP genes affect only a single family or a few, a reliable diagnostic system able to detect novel mutations, even in genes not previously associated with the phenotype, must be implemented. Exome sequencing has proven to be an important diagnostic tool for disorders that are characterized by significant genetic heterogeneity. In the case of RP, apart from the high number of mutations involved, different mutations in one gene can cause different phenotypes, and the same mutation can exhibit intrafamilial and interfamilial phenotypic variability. Thus, exome sequencing makes feasible investigating the role of second-site mutations that may be modulating the expression of the arRP phenotype.

In summary, two novel compound heterozygous mutations in *USH2A* have been identified with exome sequencing. These results highlight the clinical heterogeneity of RP and demonstrate that exome sequencing is a valuable tool for comprehensive genetic diagnosis particularly in patients in which conventional testing failed to detect mutations.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the patients that have participated in this study. The project was financially supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Spain (PI11-02923), Regional Ministry of Economy, Innovation, Science and Employment of the Autonomous Government of Andalusia (CTS-03687), Regional Ministry of Health of the Autonomous Government of Andalusia (PI10-0154), and to Fundación Ramón Areces (CIVP16A1856). The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII. The Medical Genome Project is an initiative of the Regional Ministry of Health of the Autonomous Government of Andalusia supported by the “Programa Nacional de Proyectos de investigación Aplicada,” I+D+i 2008, “Subprograma de actuaciones Científicas y Tecnológicas en Parques Científicos y Tecnológicos ACTE-PARQ (PCT-30000-2009-12), INNPLANTA (PCT-300000-2010-007) and FEDER.”

BIBLIOGRAPHY

1. Ferrari S, Di Iorio E, Barbaro V, Ponzin D, Sorrentino FS, Parmeggiani F. Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Curr Genomics* 2011; 12:238-49. [PMID: 22131869].

2. Neveling K, den Hollander AI, Cremers FP, Collin RW. Identification and analysis of inherited retinal disease genes. *Methods Mol Biol* 2013; 935:3-23. [PMID: 23150357].
3. Hamel C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1:40-[PMID: 17032466].
4. Wright AF, Chakarova CF, Abd El-Aziz MM, Bhattacharya SS. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat Rev Genet* 2010; 11:273-84. [PMID: 20212494].
5. Bonnet C, El-Amraoui A. Usher syndrome (sensorineural deafness and retinitis pigmentosa): pathogenesis, molecular diagnosis and therapeutic approaches. *Curr Opin Neurol* 2012; 25:42-9. [PMID: 22185901].
6. Abd El-Aziz MM, Barragan I, O'Driscoll CA, Goodstadt L, Prigmore E, Borrego S, Mena M, Pieras JI, El-Ashry MF, Safieh LA, Shah A, Cheetham ME, Carter NP, Chakarova C, Ponting CP, Bhattacharya SS, Antinolo G. EYS, encoding an ortholog of *Drosophila* spacemaker, is mutated in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 2008; 40:1285-7. [PMID: 18836446].
7. Barragán I, Borrego S, Pieras JI, Gonzalez-del Pozo M, Santoyo J, Ayuso C, Baiget M, Millan JM, Mena M, Abd El-Aziz MM, Audo I, Zeitz C, Littink KW, Dopazo J, Bhattacharya SS, Antinolo G. Mutation spectrum of EYS in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* 2010; 31:E1772-800. [PMID: 21069908].
8. Bernal S, Ayuso C, Antinolo G, Gimenez A, Borrego S, Trujillo MJ, Marcos I, Calaf M, Del Rio E, Baiget M. Mutations in USH2A in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa: high prevalence and phenotypic variation. *J Med Genet* 2003; 40:e8-[PMID: 12525556].
9. McGee TL, Seyedahmadi BJ, Sweeney MO, Dryja TP, Berson EL. 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* 2010; 47:499-506. [PMID: 20507924].
10. Rivolta C, Sweklo EA, Berson EL, Dryja TP. Missense mutation in the USH2A gene: association with recessive retinitis pigmentosa without hearing loss. *Am J Hum Genet* 2000; 66:1975-8. [PMID: 10775529].
11. Khan MI, Kersten FF, Azam M, Collin RW, Hussain A, Shah ST, Keunen JE, Kremer H, Cremers FP, Qamar R, den Hollander AI. CLRN1 mutations cause nonsyndromic retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 2011; 118:1444-8. [PMID: 21310491].
12. Eudy JD, Weston MD, Yao S, Hoover DM, Rehm HL, Ma-Edmonds M, Yan D, Ahmad I, Cheng JJ, Ayuso C, Cremers C, Davenport S, Moller C, Talmadge CB, Beisel KW, Tamayo M, Morton CC, Swaroop A, Kimberling WJ, Sumegi J. Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa. *Science* 1998; 280:1753-7. [PMID: 9624053].
13. Weston MD, Eudy JD, Fujita S, Yao S, Usami S, Cremers C, Greenberg J, Ramesar R, Martini A, Moller C, Smith RJ, Sumegi J, Kimberling WJ. Genomic structure and identification of novel mutations in usherin, the gene responsible for Usher syndrome type IIa. *Am J Hum Genet* 2000; 66:1199-210. [PMID: 10729113].
14. van Wijk E, Pennings RJ, te Brinke H, Claassen A, Yntema HG, Hoefsloot LH, Cremers FP, Cremers CW, Kremer H. 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* 2004; 74:738-44. [PMID: 15015129].
15. Liu X, Bulgakov OV, Darrow KN, Pawlyk B, Adamian M, Liberman MC, Li T. Usherin is required for maintenance of retinal photoreceptors and normal development of cochlear hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:4413-8. [PMID: 17360538].
16. Reiners J, Nagel-Wolfrum K, Jurgens K, Marker T, Wolfrum U. Molecular basis of human Usher syndrome: deciphering the meshes of the Usher protein network provides insights into the pathomechanisms of the Usher disease. *Exp Eye Res* 2006; 83:97-119. [PMID: 16545802].
17. Fliegau M, Benzing T, Omran H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:880-93. [PMID: 17955020].
18. Maerker T, van Wijk E, Overlack N, Kersten FF, McGee J, Goldmann T, Sehn E, Roepman R, Walsh EJ, Kremer H, Wolfrum U. A novel Usher protein network at the periciliary reloading point between molecular transport machineries in vertebrate photoreceptor cells. *Hum Mol Genet* 2008; 17:71-86. [PMID: 17906286].
19. Aller E, Jaijo T, Beneyto M, Najera C, Oltra S, Ayuso C, Baiget M, Carballo M, Antinolo G, Valverde D, Moreno F, Vilela C, Collado D, Perez-Garrigues H, Navea A, Millan JM. Identification of 14 novel mutations in the long isoform of USH2A in Spanish patients with Usher syndrome type II. *J Med Genet* 2006; 43:e55-[PMID: 17085681].
20. Baux D, Faugere V, Larrieu L, Le Guedard-Mereuze S, Hamroun D, Beroud C, Malcolm S, Claustres M, Roux AF. UMD-USHbases: a comprehensive set of databases to record and analyse pathogenic mutations and unclassified variants in seven Usher syndrome causing genes. *Hum Mutat* 2008; 29:E76-87. [PMID: 18484607].
21. Jaijo T, Aller E, Garcia-Garcia G, Aparisi MJ, Bernal S, Avila-Fernandez A, Barragan I, Baiget M, Ayuso C, Antinolo G, Diaz-Llopis M, Kulm M, Beneyto M, Najera C, Millan JM. Microarray-based mutation analysis of 183 Spanish families with Usher syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:1311-7. [PMID: 19683999].
22. González-del Pozo M, Borrego S, Barragan I, Pieras JI, Santoyo J, Matamala N, Naranjo B, Dopazo J, Antinolo G. Mutation screening of multiple genes in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa by targeted resequencing. *PLoS ONE* 2011; 6:e27894-[PMID: 22164218].
23. World Medical Association declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research

- involving human subjects. *JAMA* 1997; 277:925-6. [PMID: 9062334].
24. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:e164-[PMID: 20601685].
 25. Horaitis O, Cotton RG. The challenge of documenting mutation across the genome: the human genome variation society approach. *Hum Mutat* 2004; 23:447-52. [PMID: 15108276].
 26. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000; 132:365-86. [PMID: 10547847].
 27. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* 1997; 4:311-23. [PMID: 9278062].
 28. Venselaar H, Te Beek TA, Kuipers RK, Hekkelman ML, Vriend G. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics* 2010; 11:548-[PMID: 21059217].
 29. Homer N, Merriman B, Nelson SF. BFAST: an alignment tool for large scale genome resequencing. *PLoS ONE* 2009; 4:e7767-[PMID: 19907642].
 30. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010; 20:1297-303. [PMID: 20644199].
 31. Liu XZ, Hope C, Liang CY, Zou JM, Xu LR, Cole T, Mueller RF, Bunday S, Nance W, Steel KP, Brown SD. A mutation (2314delG) in the Usher syndrome type IIA gene: high prevalence and phenotypic variation. *Am J Hum Genet* 1999; 64:1221-5. [PMID: 10090909].
 32. Bernal S, Meda C, Solans T, Ayuso C, Garcia-Sandoval B, Valverde D, Del Rio E, Baiget M. 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* 2005; 68:204-14. [PMID: 16098008].
 33. Adato A, Michel V, Kikkawa Y, Reiners J, Alagramam KN, Weil D, Yonekawa H, Wolfrum U, El-Amraoui A, Petit C. Interactions in the network of Usher syndrome type 1 proteins. *Hum Mol Genet* 2005; 14:347-56. [PMID: 15590703].
 34. Reiners J, van Wijk E, Marker T, Zimmermann U, Jurgens K, te Brinke H, Overlack N, Roepman R, Knipper M, Kremer H, Wolfrum U. Scaffold protein harmonin (USH1C) provides molecular links between Usher syndrome type 1 and type 2. *Hum Mol Genet* 2005; 14:3933-43. [PMID: 16301216].
 35. van Wijk E, Kersten FF, Kartono A, Mans DA, Brandwijk K, Letteboer SJ, Peters TA, Marker T, Yan X, Cremers CW, Cremers FP, Wolfrum U, Roepman R, and Kremer H. Usher syndrome and Leber congenital amaurosis are molecularly linked via a novel isoform of the centrosomal ninein-like protein. *Hum Mol Genet* 2009; 18:51-64. [PMID: 18826961].
 36. Ebermann I, Phillips JB, Liebau MC, Koenekoop RK, Schermer B, Lopez I, Schafer E, Roux AF, Dafinger C, Bernd A, Zrenner E, Claustres M, Blanco B, Nurnberg G, Nurnberg P, Ruland R, Westerfield M, Benzing T, Bolz HJ. PDZD7 is a modifier of retinal disease and a contributor to digenic Usher syndrome. *J Clin Invest* 2010; 120:1812-23. [PMID: 20440071].
 37. Kaiserman N, Obolensky A, Banin E, Sharon D. Novel USH2A mutations in Israeli patients with retinitis pigmentosa and Usher syndrome type 2. *Arch Ophthalmol* 2007; 125:219-24. [PMID: 17296898].

Articles are provided courtesy of Emory University and the Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, P.R. China. The print version of this article was created on 7 November 2013. This reflects all typographical corrections and errata to the article through that date. Details of any changes may be found in the online version of the article.

ORIGINAL ARTICLE

Deciphering intrafamilial phenotypic variability by exome sequencing in a Bardet–Biedl family

María González-del Pozo^{1,2}, Cristina Méndez-Vidal^{1,2}, Javier Santoyo-Lopez³, Alicia Vela-Boza³, Nereida Bravo-Gil¹, Antonio Rueda³, Luz García-Alonso⁴, Carmen Vázquez-Marouschek⁵, Joaquín Dopazo^{3,4,6}, Salud Borrego^{1,2} & Guillermo Antiñolo^{1,2,3}

¹Department of Genetics, Reproduction and Fetal Medicine, Institute of Biomedicine of Seville, University Hospital Virgen del Rocío/Consejo Superior de Investigaciones Científicas/University of Seville, Seville, Spain

²Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Seville, Spain

³Medical Genome Project, Genomics and Bioinformatics Platform of Andalusia (GBPA), Seville, Spain

⁴Department of Computational Genomics, Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia, Spain

⁵Department of Ophthalmology, University Hospital Virgen del Rocío, Seville, Spain

⁶Functional Genomics Node (INB), CIPF, Valencia, Spain

Keywords

Bardet–Biedl Syndrome, intrafamilial variability, *MKKS*, NGS, *NPHP4*.

Correspondence

Guillermo Antiñolo, Department of Genetics, Reproduction and Fetal Medicine, University Hospital Virgen del Rocío, Avenida Manuel Siurot s/n, 41013, Seville. Spain.
Tel: + 34-955-012-772; Fax: +34-955-013-473; E-mail: guillermo.antinolo.sspa@juntadeandalucia.es

Funding Information

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Spain (PI1102923), Regional Ministry of Economy, Innovation, Science and Employment of the Autonomous Government of Andalusia (CTS-03687), Regional Ministry of Health of the Autonomous Government of Andalusia (PI100154), (PCT-30000-2009-12), INNPLANTA (PCT-300000-2010-007), Ciber de Enfermedades raras (CIBERER), the Foundation Ramon Areces (CIVP16A1856), the Spanish Ministry of Science and Innovation (BIO2011-27069), the Conselleria de Educació of the Valencia Community (PROMETEO/2010/001), and F. Hoffman-LaRoche.

Received: 10 September 2013; Revised: 9 October 2013; Accepted: 16 October 2013

doi: 10.1002/mgg3.50

Abstract

Bardet–Biedl syndrome (BBS) is a model ciliopathy characterized by a wide range of clinical variability. The heterogeneity of this condition is reflected in the number of underlying gene defects and the epistatic interactions between the proteins encoded. BBS is generally inherited in an autosomal recessive trait. However, in some families, mutations across different loci interact to modulate the expressivity of the phenotype. In order to investigate the magnitude of epistasis in one BBS family with remarkable intrafamilial phenotypic variability, we designed an exome sequencing–based approach using SOLID 5500xl platform. This strategy allowed the reliable detection of the primary causal mutations in our family consisting of two novel compound heterozygous mutations in McKusick–Kaufman syndrome (*MKKS*) gene (p.D90G and p.V396F). Additionally, exome sequencing enabled the detection of one novel heterozygous *NPHP4* variant which is predicted to activate a cryptic acceptor splice site and is only present in the most severely affected patient. Here, we provide an exome sequencing analysis of a BBS family and show the potential utility of this tool, in combination with network analysis, to detect disease-causing mutations and second-site modifiers. Our data demonstrate how next-generation sequencing (NGS) can facilitate the dissection of epistatic phenomena, and shed light on the genetic basis of phenotypic variability.

Introduction

Ciliopathies are an emerging group of clinical disorders characterized by large genetic heterogeneity and clinical overlap. Due to the ubiquitous nature of the primary cilium, ciliopathies can affect many organ systems (Fliegauf *et al.* 2007). Bardet–Biedl syndrome (BBS; MIM 209900) is considered a model of ciliopathy (Badano *et al.* 2006a), and its prevalence varies from 1:160,000 in Europe (Klein and Ammann 1969; Beales *et al.* 1997) to 1:13,500 and 1:17,500 in Kuwait and Newfoundland, respectively (Farag and Teebi 1989; Green *et al.* 1989). BBS is a pleiotropic disorder that has variable expressivity and a wide range of clinical variability observed both within and between families (Beales *et al.* 1999). Primary features include retinitis pigmentosa (RP), polydactyly, obesity, genital defects, renal anomalies, and learning disabilities. Secondary features include speech delay, developmental delay, diabetes mellitus, dental anomalies, congenital heart disease, brachydactyly/syndactyly, ataxia/poor coordination, and anosmia/hiposmia (Forsythe and Beales 2013).

The clinical diagnosis of BBS requires the presence of at least four primary or three primary and two secondary features (Beales *et al.* 1999; Rooryck and Lacombe 2008; Putoux *et al.* 2012). The spectrum of clinical features of BBS shares common characteristics with other ciliopathies such as Joubert syndrome (JBTS; MIM 213300), Leber congenital amaurosis (LCA; MIM 204000), McKusick–Kaufman syndrome (MKKS; MIM 236700), Meckel–Gruber syndrome (MKS; MIM 249000), nephronophthisis (NPH; MIM 256100), orofacioidigital syndrome type 1 (OFD1; MIM 311200), and Senior–Løken syndrome (SLS; MIM 266900). Although these are considered as distinct clinical entities, in many cases it is very difficult to assign a specific clinical diagnosis due to phenotypic overlap. Accordingly, to the phenotypic overlap, genetic overlap also exists. Thus, mutations in *MKKS* (MIM 604896) also cause MKKS – characterized by genitourinary malformations (hydrometrocolpos), polydactyly, and more rarely gastrointestinal abnormalities (McKusick *et al.* 1964; Stone *et al.* 2000).

To date, mutations in 18 genes have been associated with BBS (Retinal Information Network website. Available: <https://sph.uth.edu/retnet/>) accounting for ~70% of affected individuals (Muller *et al.* 2010). BBS is typically inherited in an autosomal recessive manner. However, the involvement of mutations in more than one locus has been substantially growing. Digenic triallelic inheritance has been reported in some patients with three mutations across two BBS loci that interact to cause disease (Katsanis *et al.* 2001; Badano *et al.* 2003; Beales *et al.* 2003). In addition, the presence of second-site modifiers that may modulate the expression of the clinical phenotype has

been proposed to explain, in part, the significant inter- and intrafamilial clinical variability in BBS (Katsanis 2004; Badano *et al.* 2006b; Khanna *et al.* 2009).

In the last few years, the introduction of the next-generation sequencing (NGS) has revolutionized clinical genetics, making whole-exome sequencing (WES) a rapid way to elucidate the genetic basis of clinically and genetically heterogeneous Mendelian disorders (Bamshad *et al.* 2011; Ionita-Laza *et al.* 2011; Rabbani *et al.* 2012). At present, it is expected that NGS, in combination with network analysis (Minguez *et al.* 2009) and other advanced bioinformatics tools that allows prioritizing candidate genes because of their functional relationships (Ideker and Sharan 2008), will play an increasingly important role in the diagnosis of complex and oligogenic disorders. Moreover, WES provides a unique possibility for investigating the presence of additional mutations that may modify the expressivity of BBS phenotype. Other authors have been interested in determining the contribution of epistasis in BBS (Katsanis *et al.* 2002; Hichri *et al.* 2005; Smaoui *et al.* 2006; Abu-Safieh *et al.* 2012), but their approaches have been based on Sanger sequencing of known BBS loci (Katsanis *et al.* 2002; Hichri *et al.* 2005; Smaoui *et al.* 2006; Abu-Safieh *et al.* 2012) or on targeted exon capture sequencing of a number of genes (Redin *et al.* 2012).

In this study, we conducted a WES approach in a Spanish family with significant intrafamilial variability in the BBS phenotype, from full blown to relatively mild forms of BBS. Using this technology, compound heterozygous mutations have been found in *MKKS* and the contribution of additional changes has been dissected.

Material and Methods

Subjects and clinical assessment

Our study involved one Spanish family (RP42) comprising three affected and four unaffected individuals (Fig. 1), all derived from the Ophthalmology Department to our Genetic Department. The study was carried out in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki and the ethical guidelines of our institutions. A group of 200 matching control individuals was also recruited. Written informed consent was obtained from all participants.

Clinical diagnosis of retinal degeneration was based on visual acuity, fundus photography, computerized testing of central and peripheral visual fields, and electroretinography (ERG) findings. Typical ocular features include initial night blindness, restriction of visual field, bone spicule pigmentation, attenuation of retinal vessels, waxy disk pallor, and abnormal ERG findings in a rod-cone pattern when recordable.

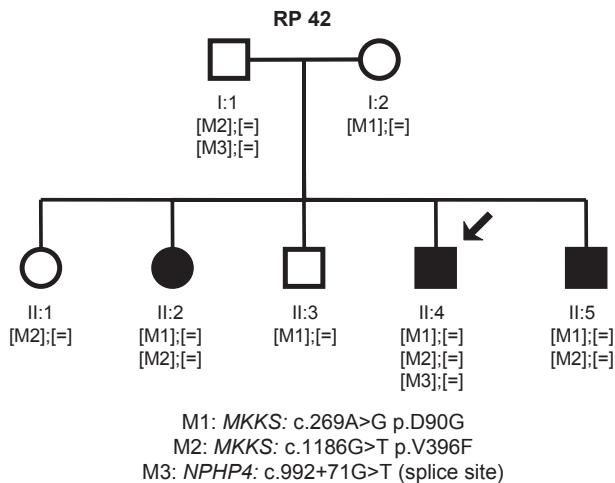


Figure 1. Family cosegregation analysis. RP42 family tree showing the segregation of the sequence variants identified during the molecular analysis of *MKKS* and *NPHP4*. [M];[M]: homozygous; [M]; [=]: heterozygous.

All subjects underwent a peripheral blood extraction for genomic DNA isolation from leukocytes using standard protocols. DNA samples from individuals I:1, I:2, II:3, and II:4 were processed for NGS.

After the identification of the *MKKS* gene defects, affected individuals underwent clinical reevaluation focused on the identification of extraocular features associated with BBS.

Description of DNA library preparation and sequencing

Library preparation and exome capture were performed according to a protocol based on the Baylor College of Medicine protocol version 2.1 with several modifications. Briefly, 5 μ g of input genomic DNA was sheared, end repaired, and ligated with specific adaptors. A fragment size distribution ranging from 160 bp to 180 bp after shearing and 200–250 bp after adaptor ligation was verified by Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The library was amplified by precapture linker-mediated polymerase chain reaction (LM-PCR) using FastStart High Fidelity PCR System (Roche, Indianapolis, IN). After purification, 2 μ g of LM-PCR product was hybridized to NimbleGen SeqCap EZ Exome libraries V3. After washing, amplification was performed by postcapture LM-PCR using FastStart High Fidelity PCR System (Roche). Capture enrichment was measured by qPCR according to NimbleGen protocol. The successfully captured DNA was measured by Quant-iTTM PicoGreen[®] dsDNA reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and subjected to standard sample preparation procedures for sequencing with SOLiD 5500xl platform as recommended by the

manufacturer. Shortly, emulsion PCR was performed on E80 scale (about 1 billion template beads) using a concentration of 0.616 μ M of enriched captured DNA. After breaking and enrichment, about 276 million enriched template beads were sequenced per lane on a six-lane SOLiD 5500xl slide.

Analysis of data from deep sequencing

SOLiD 5500xl reads were aligned against the human genome reference (hg19) using the program BFAST (Blat-like Fast Accurate Search Tool) allowing reads to map only to a unique position in the reference genome. Improperly mapped reads were filtered out with the SAMtools package, which was also used to sort SAM files and to generate and index BAM files. Variant calling was performed with the software GATK (Genome Analysis Toolkit) taking into account variants from NCBI database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP) for recalibration and realignment. Secondary analysis was performed by a custom shell script that queries VARIANT database (Medina *et al.* 2012), which includes SIFT (Kumar *et al.* 2009) and Polyphen-2 (Adzhubei *et al.* 2010) scores, to annotate all single-nucleotide variations (SNVs) and small insertions and deletions (INDELS). Variants with an allele frequency higher than 5% in the 1000 Genomes Project database were discarded. Only, exonic variants which produce a synonymous change in the open reading frame were discarded, whereas other type of variants in the exomes and variants in splice sites were kept for further analysis. Then, variants found in affected individuals were compared with variants present in not affected relatives. A last step was performed to compare the remaining variants with variants obtained from a group of healthy controls from the same local population as the family in study obtained from The Medical Genome Project (www.medicalgenomeproject.com). Finally, genes with variants in both alleles present in affected but not in healthy individuals of the family nor in the control local population and with a variant only in one allele in the carrier were ranked based on the analysis of the interactome, using NetworkMiner (Garcia-Alonso *et al.* 2012), to generate a list of candidate genes.

Verification and assessment of the pathogenicity of variants

Each predicted disease-causing variant was confirmed by Sanger sequencing, and cosegregation analysis was performed in the rest of the family members DNA samples.

As mentioned above, we used Polyphen-2 and SIFT scores to evaluate the potential impact of novel missense substitutions on the function of the encoded protein. Evolutionary conservation across species was assessed

through the alignment of orthologous *MKKS* protein sequences (*Pan troglodytes*, *Mus musculus*, *Canis lupus familiaris*, *Gallus gallus*, *Xenopus tropicalis*, and *Danio rerio*) with the human *MKKS* protein sequence, using Clustal Omega Tool (Sievers *et al.* 2011). Furthermore, splice site tool Prediction by Neural Network (Reese 1997; Reese *et al.* 1997), exonic splicing enhancer prediction programs ESE Finder (Cartegni *et al.* 2003; Smith *et al.* 2006), and NetGene2 server (Hebsgaard *et al.* 1996) were applied to estimate the pathogenic nature of intronic sequence variants that could affect the splicing process. The correct nomenclature for mutation was checked applying Muta-lyzer (Wildeman *et al.* 2008) using the corresponding Genbank reference sequences (*MKKS*; NG_009109.1 and *NPHP4*; NG_011724.2). Novel variants included in this article were submitted to the respective Locus Specific Database (LSDB) (http://grenada.lumc.nl/LOVD2/eye/home.php?select_db=MKKS).

Network analysis

Network enrichment analysis has been performed using the program SNOW (Minguez *et al.* 2009) included in the Babelomics (Medina *et al.* 2010) package (<http://www.babelomics.org>). Genes are mapped onto the interactome (obtained from the STRING [Franceschini *et al.* 2013] database), and the subnetwork connecting them is obtained. Several relevant parameters are calculated for this subnetwork, such as the connectivity or the number of components. An empirical distribution of the random expectation of these parameters is obtained by repeatedly sampling random sets of the same number of genes from the complete genome and calculating the average connectivity of their corresponding subnetworks. Thus, real values of the parameters obtained for the genes analyzed can be contrasted with respect to their random expectations (Minguez *et al.* 2009; Minguez and Dopazo 2010).

Results

Clinical assessment

The clinical findings of the affected individuals (II:2, II:4, and II:5) are reported in Table 1. Ocular manifestations of the disease in the three siblings were fairly typical of an early onset and severe form of RP. Night blindness was reported from the first decade. Thereafter, the disease rapidly progressed, and by the age of 20, II:2, II:4, and II:5 were severely visually disabled. The fundus examination showed the typical signs of RP, including pale waxy disks, attenuation of the retinal vessels, and bone spicule pigmentation in the midperiphery. Photopic and scotopic ERGs were extinguished (II:2) or diminished (II:4) on

Table 1. Summary of phenotype features documented in the affected members of the family RP 42.

Feature	II:2	II:4	II:5
First symptom	Night blindness	Night blindness	Night blindness
Onset age	3	10	8
Primary features			
Retinitis pigmentosa	+	+	+
Postaxial polydactyly	Both feet	Both feet	One foot
Weight gain anomaly	Normal weight	Obese	Overweight
Genital defects, hydrometrocolpos	–	–	–
Learning disabilities	+	+	+
Renal anomalies			
Kidney cysts	–	+	–
Kidney transplant	–	+	–
Secondary features			
Poor coordination	–	+	–
Developmental delay	–	–	–
Speech delay	–	–	–
Brachydactyly/Syndactyly	–	–	–
Dental anomalies			
Teeth crowding	–	–	–
Congenital heart disease	–	–	–

examination at ages 21 and 16, respectively. Patient II:4 showed extraocular features commonly associated with BBS such as postaxial polydactyly, overweight, polycystic kidney, learning disabilities, and mild psychomotor delay. Patients II:2 and II:5 exhibited a less severe phenotype consisting of RP, postaxial polydactyly, and mild learning disabilities. Subject II:4 underwent renal transplantation due to polycystic kidney disease, whereas the other two did not manifest any renal abnormalities. Therefore, patient II:4 fulfilled the criteria for the diagnosis of classic BBS, whereas II:2 and II:5 were diagnosed of mild BBS.

Identification of causal mutations

Upon exome sequencing, 43,570 sequence variants were identified in patient II:4 (Table 2). The two most probably pathogenic mutations located on exons 3 and 5 of

Table 2. Variants identified by exome sequencing in the RP 42 family.

	I:1	I:2	II:3	II:4
Total SNVs	45,068	42,243	43,269	43,570
Nonsynonymous SNVs	6114	5855	5892	5942
Filtered dbSNP	5979	5735	5756	5821
Filtered dbSNP and 1000 g	5913	5692	5710	5760
Filtered dbSNP and 1000 g and predicted deleterious	357	373	355	367

SNVs, single-nucleotide variations.

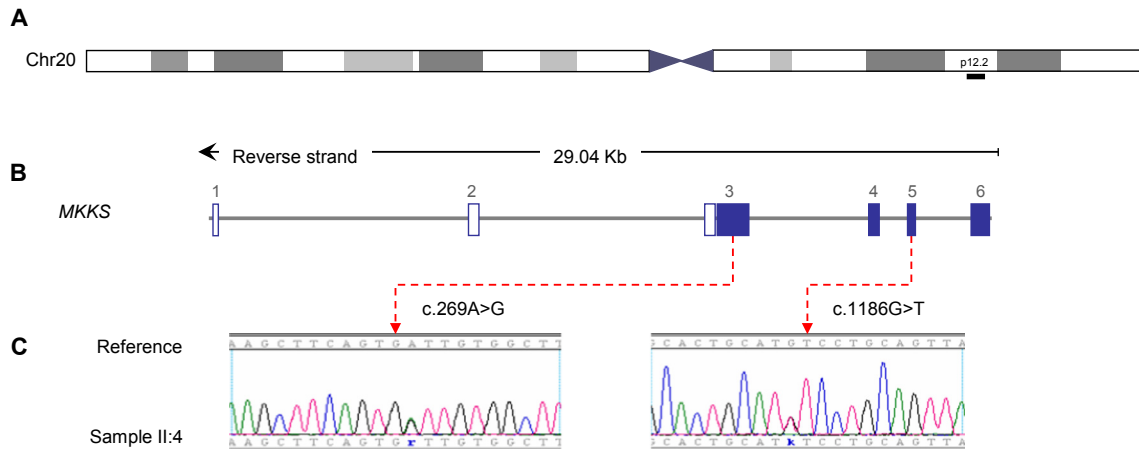


Figure 2. Detection of novel mutations in the *MKKS* gene. (A) Chromosome overview of the chromosome 20, *MKKS* is mapped on region 20p12.2 (black bar). (B) *MKKS* spans approximately 29 Kb and is composed of six exons. Filled boxes reflect coding exons (3–6) and unfilled boxes reflect UTR. (C) Electropherogram depiction of the index patient (II:4) confirming the heterozygous mutations in exons 3 and 5 of *MKKS* gene. IUPAC SNP codes used to designate heterozygous substitutions (“k” from Keto for G/T and “r” from puRine for A/G). *MKKS* Genbank accession number: NG_009109.1.

MKKS gene (Fig. 2) have never been reported in public variant databases such as dbSNP, Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), or 1000 genomes (<http://www.1000genomes.org/>). Sanger sequencing of these exons confirmed the novel missense variants (c.269A>G; p.D90G and c.1186G>T; p.V396F) in a com-

pound heterozygous state in the affected siblings. The variants cosegregated with the disease in the entire family (Fig. 1) and were absent in 400 control chromosomes. Mutation D90G lay within the predicted equatorial domain and mutation V396F lay within the predicted intermediate domain which connects the equatorial and

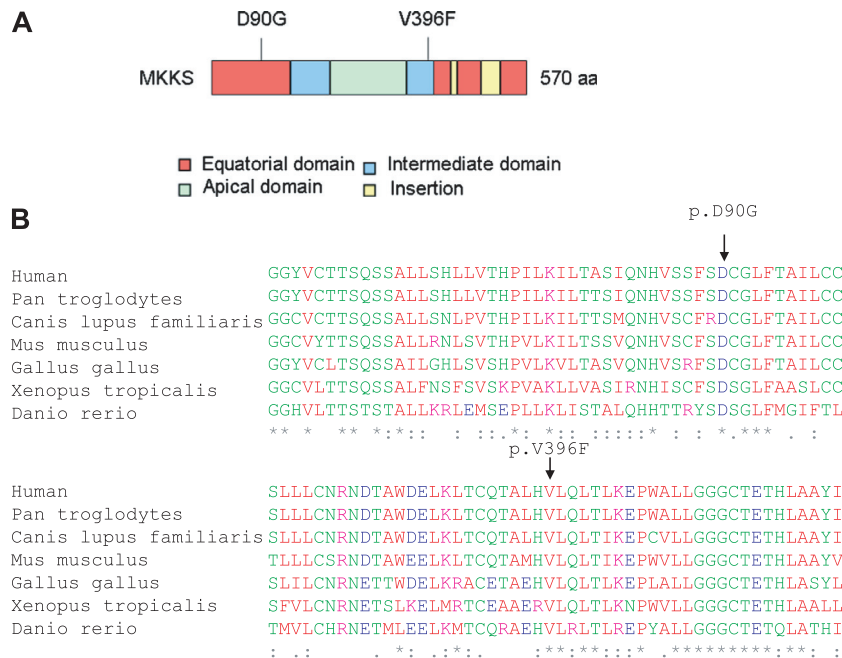


Figure 3. *MKKS* protein depiction. (A) Schematic representation of the identified variants within the *MKKS* domains, including the typical chaperonin group II domains (equatorial, intermediate, and apical). The domain organization was modified from (Stoetzel et al. 2007). (B) Alignment of the orthologs from different species showing conservation of the mutated residues. An * (asterisk) indicates positions which have a single, fully conserved residue. A: (colon) indicates conservation between groups of strongly similar properties. A. (period) indicates conservation between groups of weakly similar properties.

the apical domains via flexible hinges (Stone *et al.* 2000) (Fig. 3A). Alignment of *MKKS* amino acid sequence of various orthologs showed that the substituted residues (aspartic acid at position 90 and valine at position 396) are highly conserved across species from different evolutionary branches (Fig. 3B). *In silico* tools predicted that both p.D90G and p.V396F are probably damaging by Polyphen-2 (score = 1 for p.D90G and score = 0.987 for p.V396F) and SIFT (score = 0.01 for p.D90G and score = 0 for p.V396F).

Epistasis evaluation

Whole-exome data were subjected to exhaustive evaluation paying special attention in the identification of additional variants that may be acting as second-site modifiers making patient's II:4 BBS phenotype more severe. Although several SNPs were identified in the remaining 16 known BBS genes: *BBS1* (MIM 209901), *BBS2* (MIM 606151), *ARL6* (*BBS3*; MIM 608845), *BBS4* (MIM 600374), *BBS5* (MIM 603650), *MKKS* (*BBS6*), *BBS7* (MIM 607590), *TTC8* (*BBS8*; MIM 608132), *BBS9* (MIM 607968), *BBS10* (MIM 610148), *TRIM32* (*BBS11*; MIM 602290), *BBS12* (MIM 610683), *MKS1* (*BBS13*; MIM 609883), *CEP290* (*BBS14*; MIM 610142), *SDCCAG8* (*BBS16*; MIM 613524), *LZTFL1* (*BBS17*; MIM 606568), and *INPP5E* (MIM 613037) (Table S1); none of them was predicted to be pathogenic.

To explore the possibility that the polycystic kidney disease (PKD), affecting only patient II:4, may be caused by mutations in other loci such as PKD genes: *PKD1* (MIM 601313), *PKD2* (MIM 173910), and *PKHD1* (MIM 606702); or nephronophthisis genes: *NPHP1* (MIM 607100), *INVS* (*NPHP2*; MIM 243305), *NPHP3* (MIM 608002), *NPHP4* (MIM 607215), *IQCB1* (*NPHP5*; MIM 609237), *GLIS2* (*NPHP7*; MIM 608539), *RPGRIP1L* (*NPHP8*; MIM 610937), *NEK8* (*NPHP9*; MIM 609799), *NEK1* (MIM 604588), *MKS1* (MIM 609883), and *TMEM67* (*NPHP11*; MIM 609884) (Table S1), we evaluated the exome data and found one novel variant in intron 8-9 of the *NPHP4* gene (c.992 + 71G>T). This variant has never been reported in databases such as dbSNP and EVS. As coverage information for this position was not clear in the EVS data set, we checked the absence of c.992 + 71G>T in additional genomic databases which also include intronic variants (1000 genomes and 5000 genomes). Family segregation showed the presence of the heterozygous *NPHP4* variant only in patient II:4 and in his unaffected parent (I:1) (Fig. 1). *In silico* tools predicted that the substitution of a G > T in this position activates a cryptic splice acceptor site in the intron 8-9 of *NPHP4* (Table 3). The complete coding sequence was scanned

Table 3. Splice acceptor site prediction scores for *NPHP4* c.992 + 71G>T mutation versus wild type.

Allele	Wild type aggtcattt gtg catgtc <u>agg</u> gtg	c.992 + 71G>T intronEXON aggtcattt gtt catgtc <u>ag</u> GTGT
NNSPLICE	0	0.71
ESEfinder		
3SS_U2_human (threshold: 6.632)	0	7.735500
3SS_U2_mouse (threshold: 6.724)	0	7.26420
BranchSite (threshold: 0)	0	2.07090 (tgttcat)
NetGene2	0	0.28

Sequence variants are highlighted in bold; potential splice acceptor site are underlined; predicted exonic sequence is in capital letters. 3SS_U2_Human: 3's splice sites (acceptor) of human (U2 type). 3SS_U2_mouse: 3's splice sites (acceptor) of mouse (U2 type). Branch site: mammalian branch site (U2 type). *NPHP4* Genbank accession number: NG_011724.2.

to eliminate the possibility of the presence of other mutation in *NPHP4*. The absence in 400 control chromosomes and the results of the *in silico* prediction supported the pathogenic role of the *NPHP4* c.992 + 71G>T variant.

Network analysis

In order to explore the possible physical interactions among the BBS proteins and *NPHP4*, network enrichment analysis, using the program SNOW (Minguez *et al.* 2009), has been performed. Figure 4 shows the proteins significantly connected (significantly smallest number of components, *P*-value = 0.01) allowing the introduction of one extra connecting node among the proteins studied.

The network documents the dense network of physical protein–protein interactions that connect BBS proteins and also documents how *NPHP4* connects to several BBS proteins through different intermediates. Of special interest is *RPGR*, which connects *NPHP4* to *CEP290*. *RPGR*, the RP GTPase regulator, is also involved in RP X-Linked, cone-rod dystrophy X-linked, and macular dystrophy X-linked. Another interesting gene is *INVS*, Inversin, which encodes a protein that protein may function in renal tubular development and function. Such connections reinforce the possible role of *NPHP4* as modulator of the penetrance of the disease.

Discussion

In this report, a Spanish BBS family with three affected siblings is described. The mode of inheritance and the main clinical features correspond to autosomal recessive BBS.

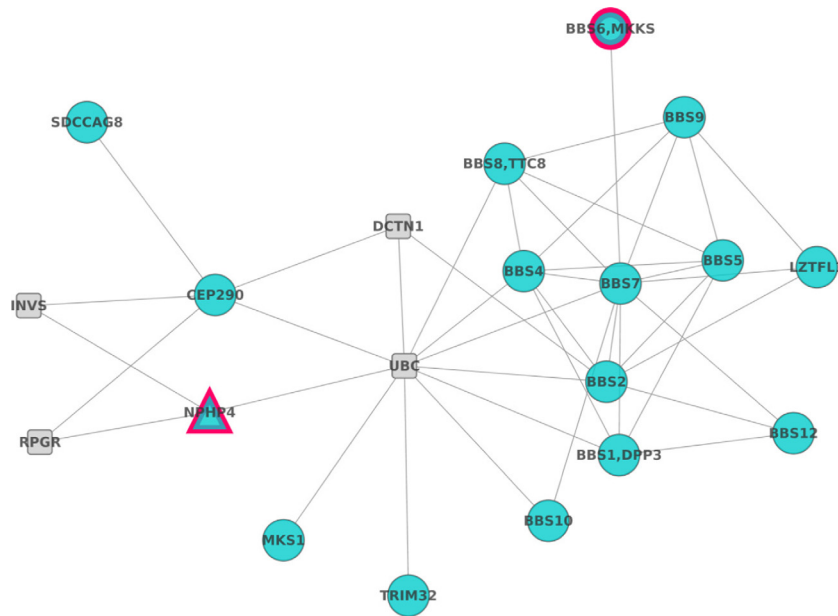


Figure 4. Significant protein–protein interaction network: Network analysis allows relating *NPHP4* to BBS proteins, supporting in this way its' possible role as modifier gene.

Exome analysis of four individuals (I:1, I:2, II:3, and II:4) led to the identification of two novel compound heterozygous mutations in the *MKKS* gene (c.269A>G; p.D90G and c.1186G>T; p.V396F) of affected individuals. These variants were absent in 200 control individuals and showed segregation with disease in the entire family. Mutation D90G lay within the predicted equatorial domain, the most conserved region among group I and II chaperonins. In the group II chaperonin family, this domain is responsible for ATP hydrolysis and the substitution might alter its structure. Mutation V396F lay within the predicted intermediate domain which connects the equatorial and the apical domains via flexible hinges (Stone *et al.* 2000). Bioinformatic analysis predicted pathogenic consequences for both missense mutations.

The molecular diagnosis is generally helpful to confirm a clinical diagnosis. Although many studies have dissected the clinical overlaps due to *MKKS* mutations, genotype–phenotype correlations are still not well understood. The clinical evaluation of the affected members of the family did not reveal hydrometrocolpos, suggesting that these two missense mutations in the *MKKS* gene did not cause genital malformations typical of *MKKS* phenotype. In this family, mutations in *MKKS* resulted in a spectrum of BBS phenotypes, ranging from BBS with severe renal involvement in patient II:4 to milder forms of BBS (patients II:2 and II:5). The expression of the phenotype and the disease progression can vary greatly from patient to patient, even among members of the same family. Whereas retinal dystrophy, digit anomaly, and learning disabilities were

highly penetrant traits for all patients, kidney abnormalities and obesity showed incomplete penetrance in our family.

The index patient investigated here had previously undergone selected genotyping (APEX analysis, Asper <http://www.asperbio.com/asper-ophthalmics>), but this mutational screening approach failed to identify the underlying gene defect in this family. The implementation of a reliable diagnostic system able to detect novel disease-causing mutations, even in genes not previously associated with an assumed clinical diagnosis, is necessary. Exome sequencing has proven to be an important diagnostic tool for disorders that are characterized by significant genetic heterogeneity. In the case of BBS, besides the high number of genes involved, oligogenic inheritance is also well documented (Katsanis 2004) adding a layer of complexity to the genetic characterization of such patients.

One advantage of analyzing the whole exome simultaneously is the unique possibility to investigate the involvement of second-site mutations which may be modulating the expression of the BBS phenotype (Katsanis *et al.* 2001; Badano *et al.* 2003; Beales *et al.* 2003; Katsanis 2004; Hjortshoj *et al.* 2010). However, the use of unbiased methodologies often produces many candidates that must be filtered out with *in silico* prioritization techniques. Thus, network analysis captures the relationships of mutated genes with already known disease genes allowing a rational prioritization of candidate genes. The combination of NGS with network analysis approach

conducted here allowed us to identify a novel variant – located on intron 8–9 of *NPHP4* – which was predicted to enhance the use of a cryptic splice acceptor site. This would probably cause the introduction of a premature termination codon and the reduction in *NPHP4* mRNA levels. Only the most severely affected patient (II:4) carries the variant (c.992 + 71G>T) in heterozygous state. In addition, the absence of the variant in control individuals seems to indicate that it is a pathogenic allele.

NPHP4 is a ciliary protein that is known to belong to a multifunctional complex and colocalizes with *RPGRIP1*, *RPGR*, and the serologically defined colon cancer antigen-8 (*SDCCAG8*), a protein thought to partake in the *RPGRIP1* interactome and implicated also in retinal–renal ciliopathies (Roepman *et al.* 2005; Schaefer *et al.* 2011; Won *et al.* 2011; Patil *et al.* 2012). Mutations in *NPHP4* have been associated with related ciliopathies such as *NPH* (Mollet *et al.* 2002; Hoefele *et al.* 2004) and *SLS* (Otto *et al.* 2002; Schuermann *et al.* 2002).

Few splice site variants have been found to modulate the pathogenesis of BBS. One example is the allele C430T of *MGC1203* which enhances the use of a cryptic splice acceptor site, causing the introduction of a premature termination codon and the reduction in the steady-state *MGC1203* mRNA levels (Badano *et al.* 2006b). Although the *MGC1203* mutations are probably insufficient to cause BBS, this gene may be involved in the pathogenesis of BBS by contributing hypomorphic mutations to an already sensitized genetic background. The authors conclude that suppression of *MGC1203* exerts an epistatic effect on the developmental BBS phenotype. It is tempting to speculate that *NPHP4* allele reported herein may also show a similar effect. We hypothesize that the *NPHP4* variant may be acting as a second-site modifier affecting the likelihood of renal degeneration in the context of the other *MKKS* mutations. This hypothesis is also supported by the known physical relationships revealed by network analysis. The *MKKS* protein forms a significant cluster of proteins with several BBS proteins, as shown in Figure 4. The severe BBS phenotype observed in patient II:4 may be due to an epistatic effect of *MKKS* and *NPHP4* mutations. This would provide an explanation for one of the distinct clinical manifestations observed in this family. Moreover, it is possible that other intrafamilial phenotypic variations may be due to alterations in additional loci as well as nonstrictly genetic factors not evaluated in this study. Therefore, our findings warrant further studies to evaluate the role of putative disease-modifying variants.

Identifying the presence of epistatic variants can be challenging, given that a large number of common and rare alleles – located in known and in novel genes – has been shown to influence the expressivity of the BBS phenotype.

Our data demonstrate that NGS is a powerful approach to identify rare and high penetrant disease variants and to study the genetic contribution to phenotypic variability.

This genetic diagnostic tool can now be applied to large cohorts of Mendelian and oligogenic disorders and should rapidly provide the molecular diagnosis and the prevalence of associated genes.

In summary, we show how WES has clearly improved the molecular diagnosis of heterogeneous disorders such as BBS. In addition, our study highlights the usefulness of NGS approaches for the dissection of epistatic phenomena and provides promising findings to decipher the genetic basis of phenotypic variability.

Acknowledgments

The authors are grateful to the family described in this study. This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Spain (PI1102923), Regional Ministry of Economy, Innovation, Science and Employment of the Autonomous Government of Andalusia (CTS-03687), Regional Ministry of Health of the Autonomous Government of Andalusia (PI100154), the Foundation Ramon Areces (CIVP16A1856), the Spanish Ministry of Science and Innovation (BIO2011-27069), the Conselleria de Educació of the Valencia Community (PROMETEO/2010/001), and F. Hoffman-LaRoche. The CIBERER is an initiative of the ISCIII, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of Interest

None declared.

References

- Abu-Safieh, L., S. Al-Anazi, L. Al-Abdi, M. Hashem, H. Alkuraya, M. Alamr, *et al.* 2012. In search of triallelism in Bardet–Biedl syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 20:420–427.
- Adzhubei, I. A., S. Schmidt, L. Peshkin, V. E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, *et al.* 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods.* 7:248–249.
- Badano, J. L., J. C. Kim, B. E. Hoskins, R. A. Lewis, S. J. Ansley, D. J. Cutler, *et al.* 2003. Heterozygous mutations in *BBS1*, *BBS2* and *BBS6* have a potential epistatic effect on Bardet–Biedl patients with two mutations at a second BBS locus. *Hum. Mol. Genet.* 12:1651–1659.
- Badano, J. L., N. Mitsuma, P. L. Beales, and N. Katsanis. 2006a. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7:125–148.

- Badano, J. L., C. C. Leitch, S. J. Ansley, H. May-Simera, S. Lawson, R. A. Lewis, et al. 2006b. Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 439:326–330.
- Bamshad, M. J., S. B. Ng, A. W. Bigham, H. K. Tabor, M. J. Emond, D. A. Nickerson, et al. 2011. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat. Rev. Genet.* 12:745–755.
- Beales, P. L., A. M. Warner, G. A. Hitman, R. Thakker, and F. A. Flintner. 1997. Bardet-Biedl syndrome: a molecular and phenotypic study of 18 families. *J. Med. Genet.* 34:92–98.
- Beales, P. L., N. Elcioglu, A. S. Woolf, D. Parker, and F. A. Flintner. 1999. New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J. Med. Genet.* 36:437–446.
- Beales, P. L., J. L. Badano, A. J. Ross, S. J. Ansley, B. E. Hoskins, B. Kirsten, et al. 2003. Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 72:1187–1199.
- Cartegni, L., J. Wang, Z. Zhu, M. Q. Zhang, and A. R. Krainer. 2003. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* 31:3568–3571.
- Farag, T. I., and A. S. Teebi. 1989. High incidence of Bardet Biedl syndrome among the Bedouin. *Clin. Genet.* 36:463–464.
- Fliegau, M., T. Benzing, and H. Omran. 2007. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:880–893.
- Forsythe, E., and P. L. Beales. 2013. Bardet-Biedl syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 21:8–13.
- Franceschini, A., D. Szklarczyk, S. Frankild, M. Kuhn, M. Simonovic, A. Roth, et al. 2013. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue):D808–D815.
- García-Alonso, L., R. Alonso, E. Vidal, A. Amadoz, A. de Maria, P. Minguez, et al. 2012. Discovering the hidden sub-network component in a ranked list of genes or proteins derived from genomic experiments. *Nucleic Acids Res.* 40:e158.
- Green, J. S., P. S. Parfrey, J. D. Harnett, N. R. Farid, B. C. Cramer, G. Johnson, et al. 1989. The cardinal manifestations of Bardet-Biedl syndrome, a form of Laurence-Moon-Biedl syndrome. *N. Engl. J. Med.* 321:1002–1009.
- Hebsgaard, S. M., P. G. Korning, N. Tolstrup, J. Engelbrecht, P. Rouze, and S. Brunak. 1996. Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Res.* 24:3439–3452.
- Hichri, H., C. Stoetzel, V. Laurier, S. Caron, S. Sigaudy, P. Sarda, et al. 2005. Testing for triallelism: analysis of six BBS genes in a Bardet-Biedl syndrome family cohort. *Eur. J. Hum. Genet.* 13:607–616.
- Hjortshøj, T. D., K. Gronskov, A. R. Philp, D. Y. Nishimura, R. Riise, V. C. Sheffield, et al. 2010. Bardet-Biedl syndrome in Denmark—report of 13 novel sequence variations in six genes. *Hum. Mutat.* 31:429–436.
- Hoefele, J., E. Otto, H. Felten, K. Kuhn, T. A. Bley, I. Zauner, et al. 2004. Clinical and histological presentation of 3 siblings with mutations in the NPHP4 gene. *Am. J. Kidney Dis.* 43:358–364.
- Ideker, T., and R. Sharan. 2008. Protein networks in disease. *Genome Res.* 18:644–652.
- Ionita-Laza, I., V. Makarov, S. Yoon, B. Raby, J. Buxbaum, D. L. Nicolae, et al. 2011. Finding disease variants in Mendelian disorders by using sequence data: methods and applications. *Am. J. Hum. Genet.* 89:701–712.
- Katsanis, N. 2004. The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 13(Spec No 1):R65–R71.
- Katsanis, N., S. J. Ansley, J. L. Badano, E. R. Eichers, R. A. Lewis, B. E. Hoskins, et al. 2001. Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science* 293:2256–2259.
- Katsanis, N., E. R. Eichers, S. J. Ansley, R. A. Lewis, H. Kayserili, B. E. Hoskins, et al. 2002. BBS4 is a minor contributor to Bardet-Biedl syndrome and may also participate in triallelic inheritance. *Am. J. Hum. Genet.* 71:22–29.
- Khanna, H., E. E. Davis, C. A. Murga-Zamalloa, A. Estrada-Cuzcano, I. Lopez, A. I. den Hollander, et al. 2009. A common allele in RPGRIP1L is a modifier of retinal degeneration in ciliopathies. *Nat. Genet.* 41:739–745.
- Klein, D., and F. Ammann. 1969. The syndrome of Laurence-Moon-Bardet-Biedl and allied diseases in Switzerland. Clinical, genetic and epidemiological studies. *J. Neurol. Sci.* 9:479–513.
- Kumar, P., S. Henikoff, and P. C. Ng. 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* 4:1073–1081.
- McKusick, V. A., R. L. Bauer, C. E. Koop, and R. B. Scott. 1964. Hydrometrocolpos as a simply inherited malformation. *JAMA.* 189:813–816.
- Medina, I., J. Carbonell, L. Pulido, S. C. Madeira, S. Goetz, A. Conesa, et al. 2010. Babelomics: an integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling. *Nucleic Acids Res.* 38(Web Server issue):W210–W213.
- Medina, I., A. De Maria, M. Bleda, F. Salavert, R. Alonso, C. Y. Gonzalez, et al. 2012. VARIANT: Command Line, Web service and Web interface for fast and accurate functional characterization of variants found by Next-Generation Sequencing. *Nucleic Acids Res.* 40(Web Server issue):W54–W58.
- Minguez, P., and J. Dopazo. 2010. Functional genomics and networks: new approaches in the extraction of complex gene modules. *Expert Rev. Proteomics* 7:55–63.
- Minguez, P., S. Gotz, D. Montaner, F. Al-Shahrour, and J. Dopazo. 2009. SNOW, a web-based tool for the statistical

- analysis of protein–protein interaction networks. *Nucleic Acids Res.* 37(Web Server issue):W109–W114.
- Mollet, G., R. Salomon, O. Gribouval, F. Silbermann, D. Bacq, G. Landthaler, et al. 2002. The gene mutated in juvenile nephronophthisis type 4 encodes a novel protein that interacts with nephrocystin. *Nat. Genet.* 32:300–305.
- Muller, J., C. Stoetzel, M. C. Vincent, C. C. Leitch, V. Laurier, J. M. Danse, et al. 2010. Identification of 28 novel mutations in the Bardet–Biedl syndrome genes: the burden of private mutations in an extensively heterogeneous disease. *Hum. Genet.* 127:583–593.
- Otto, E., J. Hoefele, R. Ruf, A. M. Mueller, K. S. Hiller, M. T. Wolf, et al. 2002. A gene mutated in nephronophthisis and retinitis pigmentosa encodes a novel protein, nephroretinin, conserved in evolution. *Am. J. Hum. Genet.* 71:1161–1167.
- Patil, H., N. Tserentsoodol, A. Saha, Y. Hao, M. Webb, and P. A. Ferreira. 2012. Selective loss of RPGRIP1-dependent ciliary targeting of NPHP4, RPGR and SDCCAG8 underlies the degeneration of photoreceptor neurons. *Cell Death Dis.* 3:e355.
- Putoux, A., T. Attie–Bitach, J. Martinovic, and M. C. Gubler. 2012. Phenotypic variability of Bardet–Biedl syndrome: focusing on the kidney. *Pediatr. Nephrol.* 27:7–15.
- Rabbani, B., N. Mahdih, K. Hosomichi, H. Nakaoka, and I. Inoue. 2012. Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J. Hum. Genet.* 57:621–632.
- Redin, C., S. Le Gras, O. Mhamdi, V. Geoffroy, C. Stoetzel, M. C. Vincent, et al. 2012. Targeted high-throughput sequencing for diagnosis of genetically heterogeneous diseases: efficient mutation detection in Bardet–Biedl and Alstrom syndromes. *J. Med. Genet.* 49:502–512.
- Reese, M. G. 1997. Berkeley drosophila genome project. Splice site prediction by neural network. Available at http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html (accessed 08 November 2013).
- Reese, M. G., F. H. Eeckman, D. Kulp, and D. Haussler. 1997. Improved splice site detection in Genie. *J. Comput. Biol.* 4:311–323.
- Roepman, R., S. J. Letteboer, H. H. Arts, S. E. van Beersum, X. Lu, E. Krieger, et al. 2005. Interaction of nephrocystin-4 and RPGRIP1 is disrupted by nephronophthisis or Leber congenital amaurosis-associated mutations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102:18520–18525.
- Rooryck, C., and D. Lacombe. 2008. [Bardet–Biedl syndrome]. *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 69:463–471.
- Schaefer, E., A. Zaloszc, J. Lauer, M. Durand, F. Stutzmann, Y. Perdomo–Trujillo, et al. 2011. Mutations in SDCCAG8/NPHP10 Cause Bardet–Biedl Syndrome and Are Associated with Penetrant Renal Disease and Absent Polydactyly. *Mol. Syndromol.* 1:273–281.
- Schuermann, M. J., E. Otto, A. Becker, K. Saar, F. Ruschendorf, B. C. Polak, et al. 2002. Mapping of gene loci for nephronophthisis type 4 and Senior–Loken syndrome, to chromosome 1p36. *Am. J. Hum. Genet.* 70:1240–1246.
- Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, et al. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7:539.
- Smaoui, N., M. Chaabouni, Y. V. Sergeev, H. Kallel, S. Li, N. Mahfoudh, et al. 2006. Screening of the eight BBS genes in Tunisian families: no evidence of triallelism. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47:3487–3495.
- Smith, P. J., C. Zhang, J. Wang, S. L. Chew, M. Q. Zhang, and A. R. Krainer. 2006. An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum. Mol. Genet.* 15:2490–2508.
- Stoetzel, C., J. Muller, V. Laurier, E. E. Davis, N. A. Zaghoul, S. Vicaire, et al. 2007. Identification of a novel BBS gene (BBS12) highlights the major role of a vertebrate-specific branch of chaperonin-related proteins in Bardet–Biedl syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 80:1–11.
- Stone, D. L., A. Slavotinek, G. G. Bouffard, S. Banerjee–Basu, A. D. Baxevaris, M. Barr, et al. 2000. Mutation of a gene encoding a putative chaperonin causes McKusick–Kaufman syndrome. *Nat. Genet.* 25:79–82.
- Wildeman, M., E. van Ophuizen, J. T. den Dunnen, and P. E. Taschner. 2008. Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the Mutalyzer sequence variation nomenclature checker. *Hum. Mutat.* 29:6–13.
- Won, J., C. Marin de Evsikova, R. S. Smith, W. L. Hicks, M. M. Edwards, C. Longo–Guess, et al. 2011. NPHP4 is necessary for normal photoreceptor ribbon synapse maintenance and outer segment formation, and for sperm development. *Hum. Mol. Genet.* 20:482–496.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Variants identified in the index patient by exome sequencing in other related loci.