

**ANÁLISIS MOLECULAR  
DE DOS GENES CANDIDATOS  
PARA LA RETINOSIS PIGMENTARIA  
AUTOSÓMICA RECESIVA**

**TESIS DOCTORAL**  
Diana Valverde Pérez



## UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA  
CELULAR E MOLECULAR

Campus da Zapateira, s/n  
15071 A Coruña España, Spain  
Teléfono 13 00 00  
Fax 13 56 41

**JOSEFINA MENDEZ FELPETO, CATEDRÁTICA DE GENÉTICA Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA**

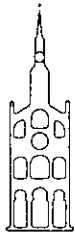
AUTORIZA la presentación a la Comisión de Doctorado de la Tesis Doctoral "Análisis de dos genes candidatos para la Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva" realizada en el Servicio de Genética Molecular del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, en Barcelona y en el laboratorio de Genética Molecular y Radiobiología del Centro Oncológico de Galicia en La Coruña por Dña. Diana Valverde Pérez y dirigida por la Dra. Monserrat Baiget i Bastús.

La Coruña, 13 de Enero de 1997



*Josefina Méndez*

Fdo. Josefina Méndez Felpeto  
Directora del Departamento



**SANT  
PAU**

**HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU  
UNITAT DE GENÈTICA MOLECULAR**

**Dña. MONTSERRAT BAIGET I BASTÚS, DOCTOR EN FARMACIA, JEFE DE LA  
UNIDAD DE GENÉTICA MOLECULAR DEL HOSPITAL DE LA SANTA CREU  
I S A N T P A U D E B A R C E L O N A**

**INFORMA:**

Que la presente Memoria titulada " ANÁLISIS DE DOS GENES  
CANDIDATOS PARA LA RETINOSIS PIGMENTARIA AUTOSÓMICA  
RECESIVA", que para optar al Grado de Doctor presenta Dña. Diana Valverde Pérez,  
ha sido realizada bajo mi dirección y, considerándola finalizada, autorizo su presentación  
al Tribunal Calificador.

Barcelona, a 5 de Diciembre de 1996

**Fdo. Dra. Dña. Montserrat Baiget i Bastús  
Director de la Tesis Doctoral**

Vº Bº

**Ana María Rodríguez Torres  
Tutora de la Tesis Doctoral**

Universidad de La Coruña

Facultad de Ciencias

"Análisis molecular de dos genes candidatos para la Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva"

**TESIS DOCTORAL**

Diana Valverde Pérez

Dirigida por:

**Dra. M.Baiget**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco, en primer lugar, a la Asociación de afectados de Retinosis Pigmentaria su colaboración desinteresada en este estudio.

A la Dra. Montserrat Baiget por haber aceptado la dirección de esta tesis y por muchas otras cosas más, entre ellas, haberme ofrecido la oportunidad de trabajar con toda esa buena gente que forma su laboratorio y que durante mi estancia en Barcelona soportaron con buen humor mi presencia y mis ánimos. (Pia, M<sup>a</sup>Jose, Mónica Ca., Mónica Co., Loreto, Pep, Ramón, Eli, Elena, Montse Do., Arnald, Eduardo, Ana y en especial a Adriana)

Al grupo de Retinosis Pigmentaria de la Fundación Jiménez Díaz (Dra. Ayuso y M<sup>a</sup>José), del Hospital San Joan de Déu en Barcelona (Dr Carballo y Carlos), del Hospital La Fe en Valencia (Dra Beneyto y Chema), del Hospital Virgen del Camino en Pamplona (Dra. Ramos), del Hospital de Basurto en Bilbao (Dra Tejada) y al grupo de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona (Imma, Mónica, Amalia, Daniel, Susana, Lluisa y Roser) por su colaboración en este trabajo.

A la Dra. Solans (jefe de la Sección de Retina del Hospital Sant Pau), a la Dra. Chivelet, y a Ana Oliva, la realización de la parte clínica de este trabajo.

Al Centro Oncológico de Galicia y, en especial, al laboratorio de Genética por soportar con paciencia el desarrollo de esta tesis (José Luis, Belén, Susana, Fernando, Alejandro, Lola, Che).

A la Dra. Ansedo y a todo su equipo por brindarme la oportunidad de iniciarme en el camino de la genética.

Al Dr. Goyanes, a la Dra. Pereira y a la Dra. Mendez-Felpeto por su atención y su ayuda de vuelta a Galicia, y a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido a que esta tesis sea presentada , a todos, de corazón, muchas gracias.

Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias  
(proyectos 91/ 10003054E y 95/1953) y por la Fundación ONCE.

A mi familia, sobre todo a mi madre .

## ***ÍNDICE***



## ÍNDICE GENERAL

I INTRODUCCIÓN	1
1.1 BREVE RESEÑA HISTÓRICA	2
1.2 DEFINICIÓN	3
1.3 ESTRUCTURA HISTOLÓGICA DE LA RETINA	4
1.4 MECANISMO DE VISIÓN	9
1.5 ASPECTOS CLÍNICOS Y ELECTROFISIOLÓGICOS	12
1.6 PATRONES DE HERENCIA EN LA RP	14
1.6.1 LIGADA AL CROMOSOMA X (XLRP)	15
1.6.2 AUTOSÓMICA DOMINANTE (ADRP)	16
1.6.3 AUTOSÓMICA RECESIVA (ARRP)	17
1.7 GENES CANDIDATOS IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE LA ARRP	21
1.7.1 SUBUNIDAD $\beta$ DE LA FOSFODIESTERASA (PDE $\beta$ )	21
1.7.2 PROTEÍNA DE UNIÓN AL RETINOIDE INTERSTICIAL (IRBP)	25
2 OBJETIVOS	28
3 MATERIAL Y MÉTODOS	30
3.1 FAMILIAS ARRP EN ESTUDIO	31

3.1.1 FAMILIAS CONSANGUÍNEAS	32
3.1.2 FAMILIAS NO CONSANGUÍNEAS	37
3.1.3 OTROS PACIENTES AFECTADOS DE <b>ARRP</b>	40
3.2 MÉTODOS CONVENCIONALES DE MANIPULACIÓN DEL ADN	41
3.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN	41
3.2.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA ( <b>PCR</b> ): FUNDAMENTOS	42
3.2.3 POLIMORFISMOS DE CONFORMACIÓN DE HEBRA SIMPLE ( <b>SSCP</b> ): FUNDAMENTOS	44
3.2.4 LA SECUENCIACIÓN DEL ADN: FUNDAMENTOS	46
3.3 ESTRATEGIAS DE ESTUDIO	48
3.3.1 MAPAS DE HOMOCIGOSIDAD	48
3.3.1.1 MARCADORES PARA MAPAS DE HOMOCIGOSIDAD	49
3.3.1.1.1 GEN <b>PDE<math>\beta</math></b>	49
3.3.1.1.2 GEN <b>IRBP</b>	51
3.3.2 LIGAMIENTO GENÉTICO	54
3.3.2.1 ANÁLISIS DE LIGAMIENTO PARA EL GEN <b>PDE<math>\beta</math></b>	56
3.3.2.2 ANÁLISIS DE LIGAMIENTO PARA EL GEN <b>IRBP</b>	57
3.4 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DEL ADN	58
3.4.1 <b>SSCP</b> DEL GEN <b>PDE<math>\beta</math></b>	58
3.4.2 <b>SSCP</b> DEL GEN <b>IRBP</b>	61
3.5 SECUENCIACIÓN	63

<b>4 RESULTADOS</b>	<b>65</b>
<b>4.1 ESTUDIO DEL GEN PDE<math>\beta</math></b>	<b>66</b>
4.1.1 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE MARCADORES EN EL GEN PDE $\beta$	66
4.1.2 RESULTADOS DEL ESTUDIO MEDIANTE SSCP EN EL GEN PDE $\beta$	69
4.1.3 CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES	70
4.1.3.1 FAMILIA B-4: DUPLICACIÓN EN TÁNDEM DE 71PB	70
4.1.3.2 FAMILIA B-27: LEU699ARG	73
4.1.3.3 FAMILIA M-9: ARG553GLU	76
4.1.4 CARACTERIZACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN PDE $\beta$	79
4.1.4.1 POLIMORFISMO INTRÓN 6	79
4.1.4.2 POLIMORFISMO EN EL EXTREMO 3' NO TRADUCIDO	82
4.1.5 RESULTADOS GLOBALES EN EL GEN PDE $\beta$	84
<b>4.2 ESTUDIO DEL GEN IRBP</b>	<b>85</b>
4.2.1 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE MARCADORES EN EL GEN IRBP	85
4.2.2 RESULTADOS DEL ESTUDIO MEDIANTE SSCP DE EL GEN IRBP	89
4.2.3 CARACTERIZACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN IRBP	89
<b>5 DISCUSIÓN</b>	<b>91</b>
5.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA RP EN ESPAÑA	92

5.2 ESTRATEGIAS POSIBLES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA GÉNESIS DE LA RETINOSIS PIGMENTARIA AUTOSÓMICA RECESIVA	94
5.3 ESTUDIO DEL GEN $PDE\beta$	96
5.4 ESTUDIO DEL GEN <b>IRBP</b>	105
5.5. NUEVAS PRESPECTIVAS	107
6 CONCLUSIONES	109
7 BIBLIOGRAFÍA	112
<b>ANEXO: TRABAJOS ORIGINALES PUBLICADOS</b>	127

## ***INTRODUCCIÓN***

## **1.1 BREVE RESEÑA HISTÓRICA**

Los primeros casos de Retinosis Pigmentaria (RP), fueron descritos a finales del siglo XIX (Donders y cols. 1857), aunque ya habían sido descritos casos de ceguera nocturna familiar en 1744 por Ovelgun y también existían descripciones de visión pobre y lesiones pigmentadas en la retina descritas por Schon en 1828 y Von Ammon en 1838. Desde entonces varios autores intentaron sugerir, sin éxito, otros nombres para la enfermedad (degeneración pigmentaria primaria, distrofia retinal pigmentosa, abiotrofia retinal pigmentosa y retinitis hemeralópica) dado que el término de retinitis no parecía adecuado, al no existir evidencia de una inflamación en la retina.

En 1858, von Graefe demostró la naturaleza hereditaria de la enfermedad a la que le dió el nombre de degeneración pigmentaria. Liebreich, en 1861, enfatizó la importancia de la consanguinidad asociada a la retinopatía pigmentaria. La naturaleza hereditaria de la Retinosis Pigmentaria fué documentada por Nettleship en 1908 cuando publicó los resultados de estudios familiares de RP basados en el estudio de 976 familias. También Usher, en 1914, publica 40 árboles genealógicos detallados, confirmando la naturaleza hereditaria de estas enfermedades.

En 1945, Karpe demostró que en estos pacientes los registros del electroretinograma (ERG) eran anormales o no detectables y estas respuestas electrofisiológicas ocurrían en algunos pacientes antes de que apareciesen los síntomas clínicos. Con el desarrollo posterior del electroretinograma, Gouras y Carr demostraron que en casos de RP dominante precoz, los pacientes tenían un electroretinograma reducido en condiciones escotópicas, mientras que el ERG fotópico era prácticamente normal.

Gracias a las investigaciones de Carr, Gouras, Berson y Krill (Gouras y cols. 1964), que demostraron la afectación precoz de los bastones, el término de distrofia de bastones y conos se utilizó como sinónimo de Retinosis Pigmentaria.

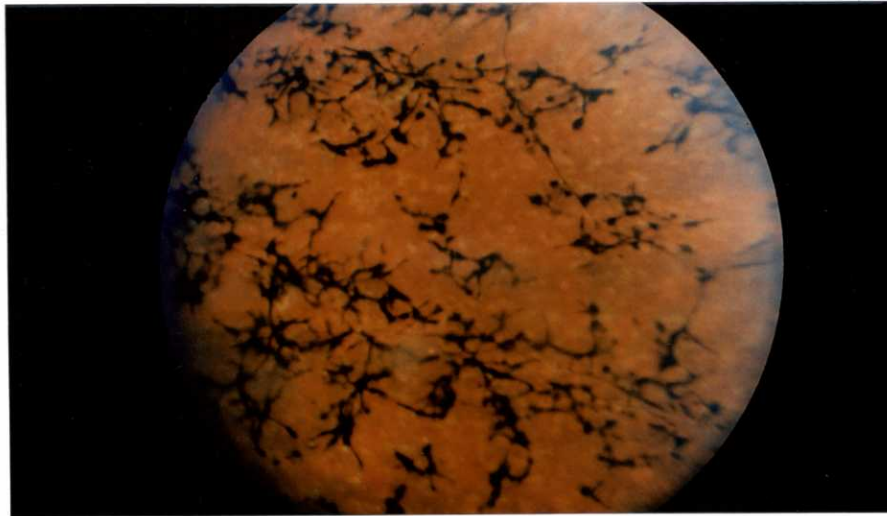
## **1.2 DEFINICIÓN**

El término Retinosis Pigmentaria (RP) engloba a un grupo de enfermedades hereditarias que se caracterizan por:

- Una pérdida progresiva de la función de los fotorreceptores (conos y bastones) que da lugar a una ceguera nocturna o hemeralopía, una pérdida de campo visual periférico que aboca irreversiblemente a una ceguera y una disminución progresiva de agudeza visual.

- La presencia de manchas ó espículas en la retina, debidas al depósito de pigmentos procedentes de la degradación de fotorreceptores afuncionales (Figura 1). Esta deposición de pigmentos da nombre a la enfermedad.

La RP se caracteriza, además, por una afectación frecuentemente bilateral, de las células fotorreceptoras de la retina, comenzando por una pérdida de la función de los bastones que se extiende progresivamente a los conos y, posteriormente, a las células del epitelio pigmentario.



**Figura 1:** Fondo de ojo de un paciente afectado de RP. Se observan las espículas de pigmento depositadas en la retina.

### 1.3 ESTRUCTURA HISTOLÓGICA DE LA RETINA

La retina humana es una capa de tejido neuronal transparente que está formada por tres tipos de neuronas altamente especializadas: fotorreceptores, células bipolares y células ganglionares formando varias capas claramente diferenciables en un corte transversal (Figura 2). Los fotorreceptores (conos y bastones) se localizan cerca de la cara externa de la retina, de tal modo que la luz debe atravesar la cavidad vítrea y la capa interna de la retina para alcanzarlos. La región periférica de la retina contiene mayoritariamente bastones y el área central o mácula, localizada en el polo posterior del ojo, está constituida principalmente por los conos.

Estos fotorreceptores son de dos tipos:

- Los conos son los responsables de la visión en condiciones de alta sensibilidad lumínica, de la discriminación espacial fina y de la discriminación cromática.



- Los bastones, responsables de la visión en condiciones escotópicas, debido a que son muy sensibles a la luz, son los responsables del campo visual. No son capaces de discriminar la luz que absorben, es decir, la estimulación con luz de distinta longitud de onda no da lugar a la percepción del color, solamente da lugar a la percepción de luz.

Estructuralmente, tanto los conos como los bastones presentan unas características similares:

Un **segmento interno**, formado por el cuerpo celular que contiene el núcleo, abundante aparato de Golgi, retículo endoplásmico difuso y rico en glucógeno y microtúbulos. En la parte externa de este segmento interno aparecen abundantes mitocondrias. El segmento interno está conectado, mediante una conexión ciliar, formada por nueve pares de microtúbulos, al **segmento externo** que tiene forma de dedo de guante dentro del cual aparecen una serie de discos de un diámetro aproximado de 1µm. Cada disco está formado por dos membranas superpuestas de 50/60 Å de grosor, que se ensanchan en los márgenes. Estas membranas no están conectadas con la membrana plasmática externa en los bastones pero sí lo están a menudo en los conos. Los discos se forman en la zona de conexión ciliar y avanzan hacia el extremo apical del segmento externo hasta que, al cabo de unos días, se desprenden y son fagocitados por las células del epitelio pigmentario. Las membranas de los discos de los bastones están formadas en un 90% por rodopsina y, en los conos por sus opsinas específicas en esa misma proporción (Figura 3).

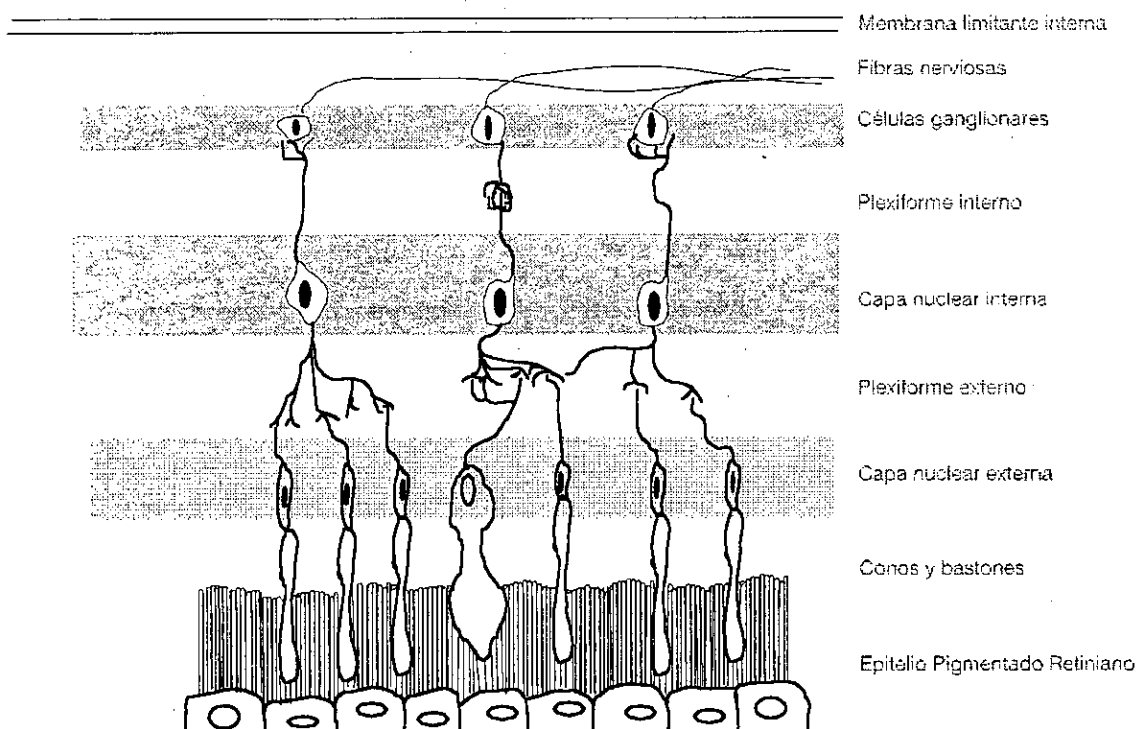
En estos discos se producirá el proceso de transducción, es decir, la conversión de los fotones de luz en impulso nervioso que viaja a través del nervio óptico al cerebro.

Los fotorreceptores se encajan, sin que exista un sistema de unión intercelular, entre las microvellosidades del epitelio pigmentario retiniano (EPR), que es la capa más externa de la retina, formado por una monocapa de células que están unidas entre sí, y

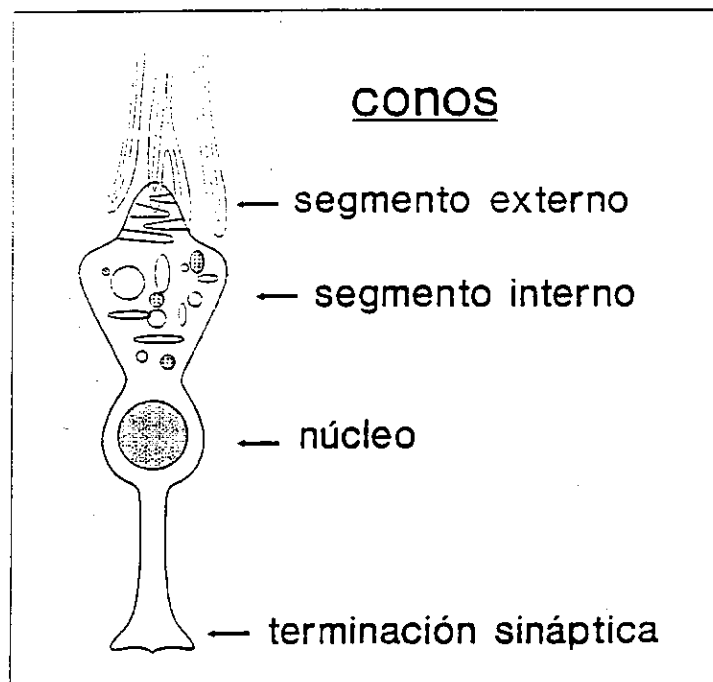
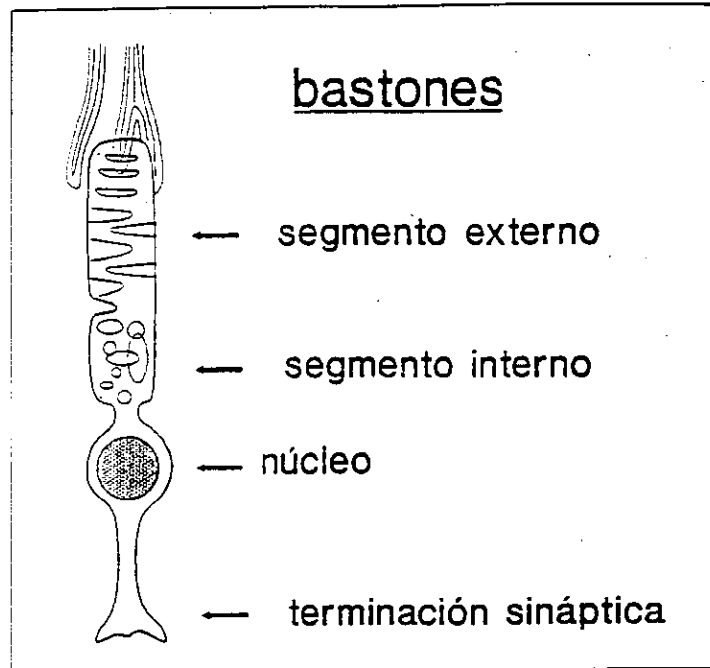
a la membrana de Bruch por su porción externa o basal mediante uniones intercelulares de distintos tipos.

El epitelio pigmentario retiniano fagocita los discos de la membrana a medida que van llegando al extremo del segmento externo. Se calcula que se renueva el 10% de la membrana del segmento externo del bastón diariamente. A nivel de los conos el EPR realiza el intercambio molecular de las proteínas de la membrana. Además, el EPR almacena vitamina A para la síntesis de la rodopsina y otros pigmentos por parte de los fotorreceptores y posee enzimas necesarios para el metabolismo de estos pigmentos.

En el proceso de la fotorrecepción, la energía lumínica es absorbida por pigmentos especializados que se encuentran en los segmentos externos de los fotorreceptores, dando lugar a la hiperpolarización y la generación de una señal eléctrica. Después de la fotorrecepción, la señal es conducida a las células bipolares en la capa nuclear interna, que a su vez transmiten sus señales a las células ganglionares. Los axones de las células ganglionares se unen en la cara interna de la retina y forman el nervio óptico.



**Figura 2:** Corte transversal esquemático de la retina.



**Figura 3:** Esquema de la estructura de los fotorreceptores.

#### **1.4 MECANISMO DE VISION**

El pigmento fotorreactivo que contienen los discos de los bastones, es la rodopsina, que está compuesta por una molécula de opsina (proteína) unida a un cromóforo 11-cis retinal. La rodopsina es un componente transmembránico de los discos: el extremo aminoterminal de la proteína está en el interior del disco y el extremo carboxiterminal está en el citoplasma.

La absorción de un fotón de luz da lugar a la activación de esta molécula por isomerización del 11-cis retinal a la forma all-trans (ó todo trans). La rodopsina activada es capaz de interactuar con otra proteína denominada Transducina G que cataliza el cambio de GDP a GTP. La transducina G es una proteína compuesta por tres subunidades ( $\alpha, \beta, \gamma$ ). En el paso de GDP a GTP, la subunidad  $\alpha$  cargada con GTP se disocia de las otras dos subunidades ( $\beta$  y  $\gamma$ ). En este paso la señal visual se amplifica considerablemente debido a que una sola molécula de rodopsina es capaz de activar unas 500 moléculas de transducina G. La subunidad  $\alpha$  de la transducina G activa, a su vez, a la enzima Fosfodiesterasa GMP cíclica (PDE). Esta enzima está formada por cuatro subunidades, una subunidad  $\alpha$ , una subunidad  $\beta$ , y dos subunidades, con caracter inhibitorio,  $\gamma$ . La activación de esta proteína es el resultado de la separación de las dos subunidades  $\gamma$  del resto del complejo proteico. La fosfodiesterasa activa hidroliza el GMPcíclico (cGMP), que está unido a otra proteína denominada proteína del canal dependiente de GMP cíclico, una proteína transmembránica que permite a los cationes monovalentes y bivalentes pasar a través de la membrana de fotorreceptor. Al menos tres moléculas de cGMP están unidas a cada proteína de canal. La hidrólisis del cGMP da como resultado el cierre de los canales iónicos dando lugar a la hiperpolarización de la membrana del bastón. Este hecho produce el inicio de la transducción visual. Los iones de calcio continúan saliendo de la célula a través de una glicoproteína de intercambio

sodio-calcio. La disminución de los niveles de calcio intracelular produce la activación de la proteína Recoverina que, a su vez, activa a la proteína Guanilato ciclasa que repone los niveles de cGMP en el interior de la célula y permite la reapertura de los canales. Al mismo tiempo, una fracción de rodopsina es desactivada mediante fosforilación en la región carboxiterminal gracias a la actuación de la rodopsina cinasa, mientras que el resto de rodopsina se inactiva mediante su unión a una proteína de 48 kilodaltons denominada arrestina o S-antígeno. La rodopsina fosforilada se repone través de una serie de reacciones que generan pirofosfato, opsina y all-trans-retinal (todo trans retinal), que mediante el paso de NADPH a NADP, se transforma en all-trans-retinol (todo trans retinol) que es transportado fuera del fotorreceptor a través del espacio interfotorreceptor por la proteína IRBP (intersticial retinal binding protein, proteína de unión al retinoide intersticial) hasta el epitelio pigmentado retiniano. Una vez aquí el all trans-retinol pasará a all- trans- retinyl esters (todo trans retinyl), y éste pasará a 11 cis-retinol, catalizado por el enzima CRBP (transportador celular del retinol). Mediante la hidrólisis del NAD a NADH y la actuación del CRALBP (transportador celular del retinaldehido) llegará a 11-cis retinal. El 11 cis retinal es transportado hacia el interior del disco del fotorreceptor a través de la misma proteína que lo había llevado al epitelio, el IRBP. Este 11 cis-retinal ya se puede unir a la molécula de opsina para formar de nuevo la rodopsina (Figura 4).

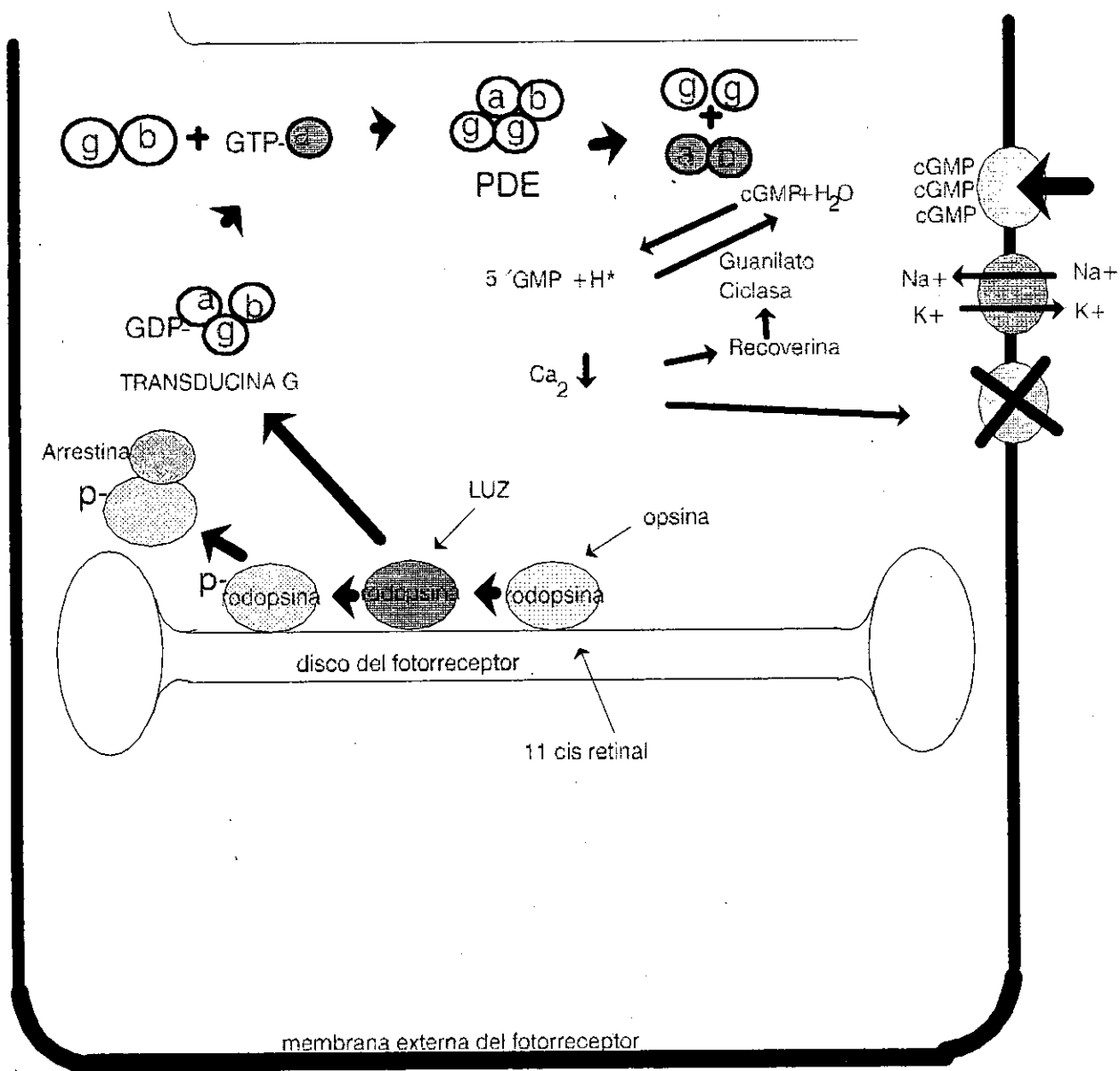


Figura 4: Esquema de la transducción visual.

## **1.5 ASPECTOS CLÍNICOS Y ELECTROFISIOLÓGICOS**

El signo más frecuente de la RP es la hemeralopía o dificultad de visión nocturna debido a la función anómala de los bastones.

En cuanto a la restricción del campo visual periférico, las alteraciones campimétricas se inician en la zona de mayor concentración de bastones, es decir entre los 30° y 50°, pero posteriormente avanzan también hacia la periferia y hacia el centro, dejando la visión central correspondiente a la mácula conservada (campo visual en cañón de escópeto) (Figura 5).

Otro signo clínico, es el acúmulo de pigmento con morfología variable (habitualmente de tipo espicular) cuya distribución en la retina se correlaciona bastante bien con las lesiones campimétricas y respeta el área macular. Estos depósitos se deben a la migración y proliferación de pigmento del epitelio pigmentario retiniano lesionado hacia las capas internas de la retina.

Las alteraciones en la visión cromática aparecen de forma más o menos tardía, probablemente a causa de la lesión de los conos. En general se afecta primero el eje azul-amarillo y más tarde el eje rojo-verde.

Antes de que los síntomas de la RP se hagan evidentes es posible observar cambios electrofisiológicos detectados por el electroretinograma (ERG), que mide la actividad eléctrica generada por la retina en respuesta a flashes de luz. Mediante esta técnica se puede estudiar la respuesta de los conos y bastones por separado. Se utiliza en primer lugar la luz azul, que estudia los bastones y es la primera onda que se altera en el ERG, indicando la capacidad de adaptación a la oscuridad. Con la luz roja se estudia la respuesta de los conos. Cuando se realiza con luz blanca, fotoescotópico, se estudian a la vez los conos y los bastones y se realiza adaptado a la luz o no, según el resultado de los dos anteriores.



Se observa que las respuestas en bastones están afectadas tanto en amplitud como en tiempo. En estadios más avanzados las respuestas de los conos también están afectadas y en estadios terminales ambas respuestas son nulas.

La medida de los potenciales evocados visuales es otro de los parámetros utilizados en el estudio de la RP.

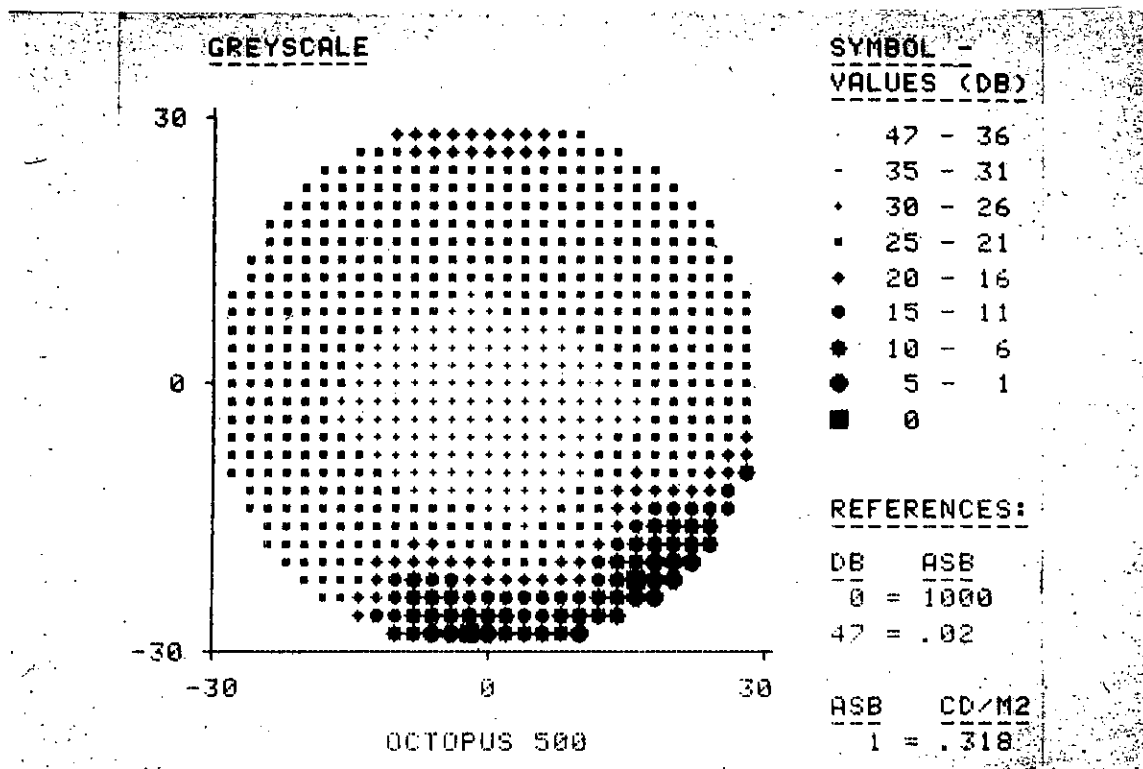


Figura 5: Campo visual de un afectado de RP.

## 1.6 PATRONES DE HERENCIA EN LA RP

La Retinosis Pigmentaria es genéticamente heterogénea dado que puede segregarse de forma autosómica dominante, autosómica recesiva, y también como ligada al sexo (Figura 6).

Las estimas exactas de las frecuencias de los distintos tipos de herencia son difíciles de determinar, debido a un elevado número de casos esporádicos (alrededor de un 50%). A esta dificultad cabe añadir la enorme variabilidad de las frecuencias que se describen en los distintos países (Tabla 1).

<b>País</b>	<b>Referencia</b>	<b>NºFam</b>	<b>AD</b>	<b>AR</b>	<b>XL</b>	<b>S</b>	<b>U</b>
China	Hu 1987	151	11	33	8	48	
Japón	Imaizumi 1971		2	40		43	15
EEUU	Bunker y cols 1989	85	43	20	8	29	
EEUU	Boughman y cols 1980	380	10	84	6		
EEUU	Boughman y cols 1983	300	22	17	9	52	
Francia	Kaplan y cols 1990	93	20	22	13	42	3
Inglaterra	Jay 1982	426	25	13	16	41	5
Dinamarca	Haim 1993	366	6	17	6	54	17
Noruega	Grondahl 1987	53	15	47	2	36	
Sudáfrica	Greenberg y cols 1993	125	23	27	3	40	7
España	Ayuso y cols 1995	503	12	39	4	41	4
Valencia	Millán 1995	136	15	31	3	48	2

**Tabla 1.** Frecuencias de RP en distintos países

AD: Autosómico dominante, AR: autosómico recesivo, XL: ligada al cromosoma X, S: casos simples ó esporádicos, U: No clasificados.

Estudios recientes demuestran que, en España, alrededor del 39% de los enfermos de RP corresponderían a la forma autosómica recesiva, un 12% a la forma autosómica dominante, un 4% a la forma ligada al sexo y un 41% corresponden a casos simples o esporádicos (Ayuso y cols. 1995).

Es muy probable, sin embargo, que la mayor parte de los denominados casos esporádicos, pudieran ser debidos a una herencia recesiva que hubiese pasado desapercibida en varias generaciones de una familia.

Al conjunto de los distintos tipos genéticos de la RP simple se agregan los tipos denominados sindrómicos, en los que la RP se hereda asociada a otros defectos. Entre ellos se cuentan, por ejemplo, los síndromes de Usher, de Bardet-Biedl, de Alström, de Refsum, de Cockayne, de Batten, etc.

A la heterogeneidad genética de la RP representada por estos distintos patrones de herencia, se añade el hecho de que distintos estudios indican que existe más de un locus para cada uno de los tipos de herencia mencionados.

### **1.6.1 RP LIGADA AL CROMOSOMA X**

En un primer estudio realizado por Battacharya y cols. (1984) se demostró la existencia de ligamiento genético en familias afectadas de RP ligada al cromosoma X (XLRP). Mediante el análisis de polimorfismos de restricción, se evidenció el ligamiento entre una sonda del cromosoma X, localizada en Xp11.3 (LI 28) y la enfermedad. Estudios posteriores llevados a cabo por Francke y cols. (1985), Friedrich y cols. (1985), y Kunkel y cols. (1985), permitieron llegar a la conclusión de que este locus, al que se denominó RP2, se encontraba en el brazo corto del cromosoma X, entre el centrómero y el marcador DXS7. Más tarde, Chen y cols. (1987) evidenciaron que, en otros casos, la enfermedad se heredaba ligada a otro marcador del cromosoma X (locus OTC,

ornitina transcarbamilasa) localizado a gran distancia de LI 28. Ello sugería la posibilidad de que existieran dos genes distintos (RP2, RP3), localizados ambos en el brazo corto del cromosoma X, responsables de esta forma RP. Cabe la posibilidad, apuntada por Ott y cols (1990) de la existencia de un tercer locus (RP4) localizado entre los marcadores DXS28 y DXS164 situadas entre Xp21.3-p21.2.

Kaplan y cols. (1990) han descrito que, en familias XLRP existen diferencias en la sintomatología de comienzo, en función del gen RP implicado. Mientras que, cuando el gen responsable de la patología es el RP2, la enfermedad comienza con una miopía precoz que aparece entre los 3 y 4 años y con una agudeza visual reducida los primeros años de vida, cuando el gen afectado es el RP3, la enfermedad comienza más tarde, entre los 6 y 14 años, con disminución de la visión nocturna y una agudeza visual conservada durante algunos años. Ambos tipos progresan de manera similar con las mismas manifestaciones tanto subjetivas como objetivas.

Al analizar los transcritos de la región RP3, Meindl y cols 1996 han caracterizado un gen denominado RPGR (Retinitis Pigmentosa GTPase regulator) en el que se han identificado siete mutaciones en varones afectados de retinosis pigmentaria ligada al sexo.

### **1.6.2 RP AUTOSÓMICA DOMINANTE**

Para la RP autosómica dominante (ADRP) se han descrito varios genes responsables. El primer gen fué localizado en 1989 por William y cols., en el brazo largo del cromosoma 3, en una región cercana al locus de la rodopsina. Un análisis de ligamiento demostró que no existía recombinación entre los marcadores para la rodopsina y la enfermedad. A partir de estos resultados se realizaron estudios en busca de mutaciones en el gen de la rodopsina en enfermos de ADRP. La primera mutación

descrita por Dryja y cols. (1990) era una substitución en el codón 23 de una prolina por una histidina (Pro-23-His). En la actualidad se conocen mas de 60 mutaciones para el gen de la rodopsina en familias ADRP, además de unas pequeñas deleciones y unas mutaciones de corrimiento de pauta de lectura que dan lugar a una alteración en el extremo carboxi terminal de la proteína. Después de varios estudios se observó que tan sólo un 25% de los casos presentaban mutaciones en este gen situado en 3q21-q24.

En 1991 Farrar y cols. hallaron ligamiento entre la enfermedad y el brazo corto del cromosoma 6, cerca del complejo mayor de histocompatibilidad, en 6p21.1-cen, donde se localizó el gen de la periferina, una proteína estructural de los bastones. Se sabía que un defecto en esta proteína daba lugar a una retinopatía en el ratón denominada *rds* (retinal degeneration slow). La periferina, como la rodopsina, es una proteína que se encuentra en las membranas de los discos del segmento externo de los bastones, pero la periferina no absorbe la luz, se cree que posee tan solo una función estructural. La primera mutación encontrada en este gen fué una deleción de un triplete que eliminaba una cisteína. Las mutaciones en el gen de la periferina son la causa de ADRP en, aproximadamente, 3-5% de familias afectadas (Rosenfeld 1994).

Los estudios de ligamiento efectuados en distintas familias afectadas de ADRP han permitido identificar siete loci adicionales, localizados en: 7p (Inglehearn y cols. 1993), 7q (Jordan y cols. 1993), 8 cen (Blanton y cols. 1991), 17p (Greenberg y cols. 1994), 17q (Bardien y cols. 1995) y 19q (Al-Maghteh y cols. 1994), 1p (Xu y cols. 1996).

### **1.6.3 RP AUTOSÓMICA RECESIVA**

Para la RP autosómica recesiva (ARRP) se han propuesto múltiples genes como candidatos responsables de la misma pero hasta ahora tan sólo se han encontrado

mutaciones en cuatro de ellos: en el gen de la rodopsina, situado en 3q21-q24 (Rosenfeld y cols. 1992), en el gen de la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa, situado en 4p16.3 (McLaughlin y cols. 1993) (McLaughlin y cols. 1995) (Dancinger y cols. 1995), en el gen del canal de sodio cGMP dependiente, en 4p14-q13 (Dryja y cols. 1995), y una mutación en la subunidad  $\alpha$  de la fosfodiesterasa, en 5q31.2-q34 (Huang y cols. 1995).

Mediante estudios de ligamiento se han identificado dos loci implicados en la Retinosis Pigmentaria, uno en 6p, localizado a 20cM del gen de la periferina hacia el telómero en una familia dominicana (Shugart y cols. 1995), y otro en 1q31-q32.1 en una familia de los Países Bajos en donde se observó heterogeneidad clínica sin que fuese posible excluir que esta expresión fuese debido al defecto de un sólo gen (Van Oest y cols 1994).

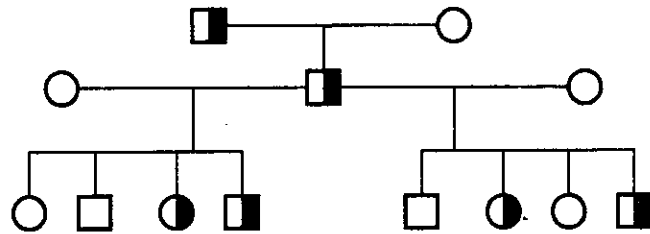
Los estudios efectuados ponen de manifiesto la gran heterogeneidad genética de la RP, ya que mutaciones en un mismo gen resultan responsables de dos patrones de herencia, como es el caso de la rodopsina, y la relación fenotipo-genotipo es frecuentemente difícil de establecer. Este hecho podría interpretarse asumiendo que la retina tiene un repertorio limitado de respuestas para hacer frente a una gran variedad de lesiones genéticas distintas.

Recientemente se han descrito tres familias diferentes con individuos afectados de RP que eran heterocigotos para dos genes distintos no ligados, ROM1 y Periferina (Kajiwara y cols. 1994). A este tipo de herencia se le denominó digénica. Dado que Periferina y ROM1 se unen en los discos de los bastones formando una estructura heterodimérica, la producción de dos proteínas mutantes alteraría la estructura. Como consecuencia, no sería posible la disposición correcta de los discos del segmento externo del bastón dando lugar a una alteración de la secuencia de reacciones que producen la visión.

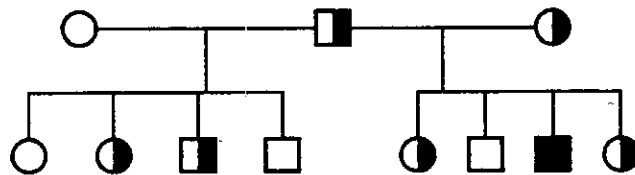
LOCUS	HERENCIA	LOCALIZACIÓN	GEN/PROTEÍNA
RP-1	AD	8p11-q21	
RP-2	XL	Xp11.23	
RP-3	XL	Xp21.1	RPGR
RP-4	AD/AR	3q22.1-q24	Rodopsina
RP-5			
RP-6	XL	Xp21.3-p21.2	
RP-7	AD	6p21.1-cen	Periferina/RDS
RP-8	AD		
RP-9	AD	7p15.1-p13	
RP-10	AD	7q	
RP-11	AD	19q13	
RP-12	AR	1q31-q32.1	
RP-13	AD	17p13	
RP-14	AR	6p21	
RP-15	XL	Xp22.13-p22.11	
RP-16			
RP-17	AD	17q22-24	
RP-18	AD	1p13-q23	
RP homólogo de rd	AR	4p16.3	PDE $\beta$
RP canal catiónico	AR	4p14-q13	Canal catiónico
RP	AR	5q31.7-q34	PDE $\alpha$
RP digénica	AR	6p21.1-cen/ 11q13	Periferina/ROM1

Tabla 2: Resumen de los genes y loci implicados en la RP.

A HERENCIA AUTOSOMICA DOMINANTE



B HERENCIA AUTOSOMICA RECESIVA



C HERENCIA LIGADA AL CROMOSOMA X

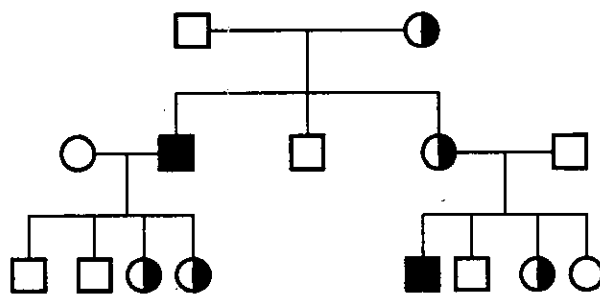


Figura 6: Patrones de herencia de la RP.



## 1.7 GENES CANDIDATOS IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE LA ARRP

En el estudio de la patología molecular de la RP, se consideran genes candidatos aquellos cuyos productos intervienen en el proceso de la transducción de la señal luminosa (Figura 4).

En este estudio se plantea el análisis del gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa (PDE $\beta$ ) y del que codifica para la proteína de unión al retinoide intersticial (IRBP).

### 1.7.1 SUBUNIDAD $\beta$ DE LA FOSFODIESTERASA

La Fosfodiesterasa (PDE) es una proteína involucrada en el proceso de la transducción visual: la fotoactivación de la rodopsina da lugar a la activación de la Transducina G que a su vez se une a la PDE activandola. La activación de la PDE resulta en la hidrólisis de cGMP, disminuyendo su concentración intracelular dando lugar al cierre de los canales plasmáticos de cationes y a la hiperpolarización de la membrana (Figura 4).

Esta proteína consta de cuatro subunidades, dos subunidades catalíticas,  $\alpha$  y  $\beta$  y dos subunidades inhibitorias. Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  contienen un sitio catalítico para el cGMP y uno o probablemente dos lugares no catalíticos de unión al cGMP. Las dos subunidades inhibitorias  $\gamma$ , se separan de las subunidades catalíticas de la proteína cuando la PDE es activada a través de la unión de la subunidad  $\alpha$  de la Transducina G. La inactivación y reasociación de la holoenzima ( $\alpha\beta\gamma_2$ ) se produce cuando la Transducina se inactiva a través de la hidrólisis de cGMP (Figura 4). La PDE y más concretamente su subunidad  $\gamma$  es capaz de actuar como una GTPasa y acelerar la hidrólisis del GTP que está unido a la Transducina, de modo que la PDE parece capaz

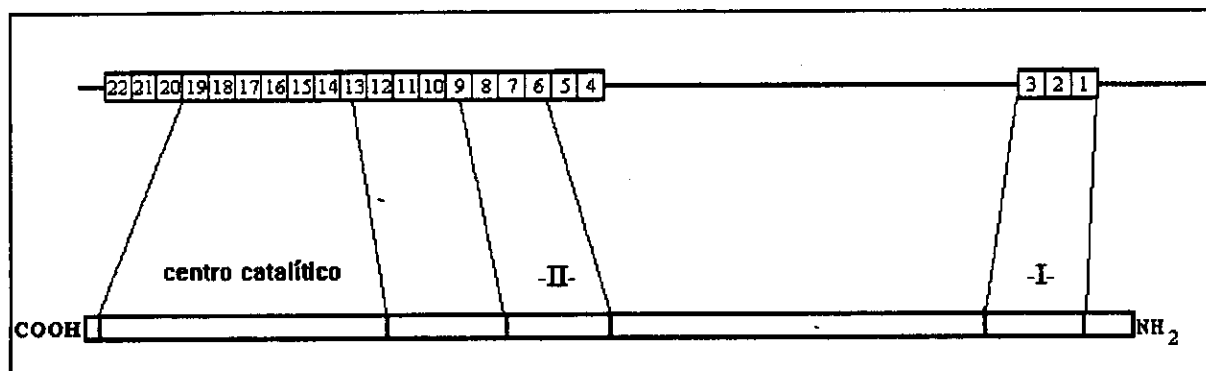
de regular su propia activación.

El mecanismo de intervención de esta proteína en la transducción visual está bien establecido por lo que se consideró como gen candidato en el estudio de la RP.

Bowes y cols. en 1990 demostraron que mutaciones en el gen homólogo en ratones eran responsables de una degeneración retinal autosómica recesiva semejante a la RP humana, dando lugar al fenotipo *rd* (retinal degeneration). Esta degeneración estaba precedida por unos niveles elevados de cGMP en la retina como resultado de una deficiencia en la actividad de la PDE cGMP dependiente. En 1993 Suber y cols. identifican una mutación sin sentido en el exón 21 de la subunidad  $\beta$  de la PDE en perros setter irlandeses afectados de una displasia de conos y bastones. Por lo tanto, existían modelos animales que evidenciaban que este gen podría jugar un papel importante en el desarrollo de la RP en el hombre.

El gen PDE $\beta$  ha sido localizado en el cromosoma 4, en 4p16.3, en humanos (Bateman y cols. 1992), y se han identificado 22 exones repartidos en un total de 43 Kb de ADN genómico. Este gen se expresa predominantemente en retina donde se ha identificado un transcrito de 3,5 Kb. También se ha detectado expresión del mismo en cerebro pero a muy bajos niveles y con un transcrito que presenta menor tamaño (Weber y cols. 1991)

Existe una correlación entre la organización genómica de los exones de este gen y los tres dominios postulados para la proteína (centro catalítico, dominio no catalítico I y dominio no catalítico II). El dominio I estaría codificado por los tres primeros exones situados en el extremo 5' y estaría separado físicamente de los 19 exones restantes por al menos 17Kb de secuencia intrónica. Los 19 exones codificarían para el centro catalítico y el dominio II de la proteína (Figura 7).



**Figura 7:** Organización genómica del gen PDE $\beta$  y su correlación con los dominios de la proteína.

Los tres exones situados en 5' que codificarían para el dominio I, no estarían incluidos en otros tejidos que no fuesen la retina, ya que utilizarían un promotor alternativo que posiblemente estaría representado cerca de una isla rica en CpG, situada en el intrón de 17 Kb y daría lugar a un transcrito al menos 700 pb más pequeño que su homólogo en la retina (Weber y cols. 1991).

En 1993 McLaughlin y cols. estudiando algunos exones de este gen (Exones 3,5,6,7,12,13,14) en 99 familias identifican cuatro mutaciones no encontradas en un grupo control de 100 individuos sanos: dos mutaciones sin sentido Gln298X y Arg531X, una delección de un par de bases Pro496(1bpdel) y una mutación de sentido erróneo His557Tyr. En 1995, el mismo grupo, identifican tres nuevas mutaciones en 92 pacientes afectados de RP (Lys706X, Leu527Pro, una mutación que da lugar a un sitio de corte alternativo en el extremo donante del intrón 18).

Danciger y cols. en 1995 encuentran las mutaciones Gly576Asp, una delección de un par de bases en His620, una transversión de una G a una T en el lugar aceptor del intrón 2 (lugar de splicing), y una mutación nula en Lys706X en dos de las 24 familias estudiadas. Estas mutaciones fueron encontradas en heterocigosis.

Se ha descrito también un caso en el que una mutación (His258Asn) en este gen era responsable de la forma autosómica dominante de la ceguera nocturna congénita estable en una familia (Gal y cols. 1994)

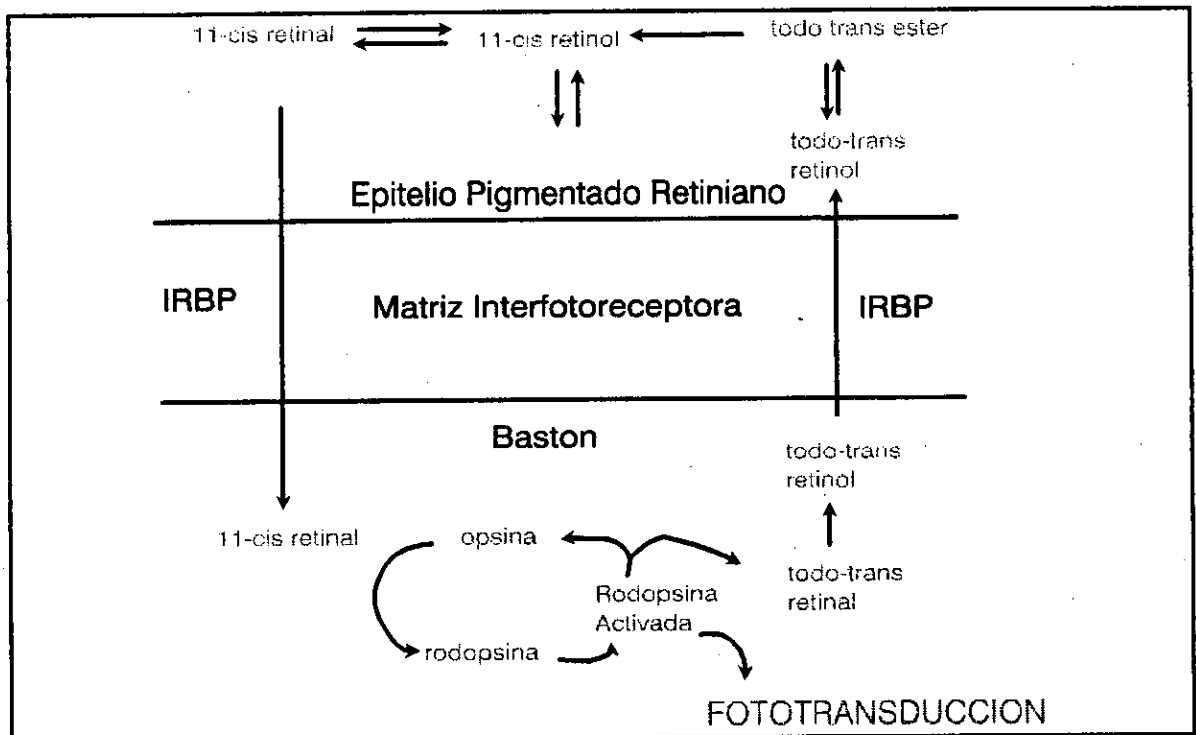
<b>MUTACIÓN</b>	<b>TIPO DE MUTACIÓN</b>	<b>REFERENCIA</b>
Gln298X	Puntual. Sin sentido	McLaughlin 1993
Arg531X	Puntual. Sin sentido	McLaughlin 1993
Pro496	Delección de 1pb.	McLaughlin 1993
His557Tyr	Puntual. Sentido erróneo	McLaughlin 1993
Lys706X	Puntual. Sin sentido	McLaughlin 1995
Leu527Pro	Puntual. Sentido erróneo	McLaughlin 1995
intrón 18	Puntual. Alteración de "splicing"	McLaughlin 1995
Gly576Asp	Puntual. Sentido erróneo	Dancinger 1995
His620	Delección de 1pb.	Dancinger 1995
intrón 2	Puntual. Alteración de "splicing"	Dancinger 1995

**Tabla 3.** Resumen de las mutaciones descritas en el gen PDE $\beta$ .

### 1.7.2 PROTEÍNA DE UNIÓN AL RETINOIDE INTERSTICIAL

La proteína de unión al retinoide intersticial (Interstitial Retinol Binding Protein, IRBP) es una glicoproteína localizada en la retina de todos los vertebrados, y en menos concentración, también hallada en la glándula pineal. Su tamaño medio es de 134.200 Daltons.

La proteína IRBP es el mayor constituyente proteico de la matriz interfotorreceptora, donde se cree que esta proteína juega un papel muy importante en la transferencia extracelular de retinoides, entre la retina y el epitelio pigmentario adyacente, durante la adaptación a la oscuridad. La regeneración cíclica de la rodopsina en los ojos de los vertebrados depende del movimiento de retinoides entre los bastones y el epitelio pigmentario. El todo-trans retinol, generado por los bastones debido a la descomposición de la rodopsina, es transferido desde los bastones al epitelio pigmentario pasando por la matriz interfotorreceptora, que es el compartimento acuoso que separa el epitelio pigmentario y la retina. En el epitelio, el retinol es enzimáticamente esterificado e isomerizado de todo-trans a configuración 11-cis. El 11-cis retinol formado en el epitelio va hacia los bastones, donde como 11-cis retinal, se une a la opsina. La formación resultante de rodopsina regula directamente la recuperación de la sensibilidad visual. El transporte de retinoides por parte del IRBP está modulado por la luz. La exposición a la luz brillante favorece la unión de todo-trans retinol a IRBP, y en el curso de la adaptación a la oscuridad el 11-cis retinal es el ligando principal. Se ha sugerido que además de su función de transporte, el IRBP actúa como tampón de la concentración extracelular de retinoides, impidiendo la degradación de los retinoides y su potencial efecto tóxico sobre las membranas celulares (Pepperberg y cols.1993) (Figura 8).



**Figura 8:** Esquema de la ruta metabólica de la proteína IRBP.

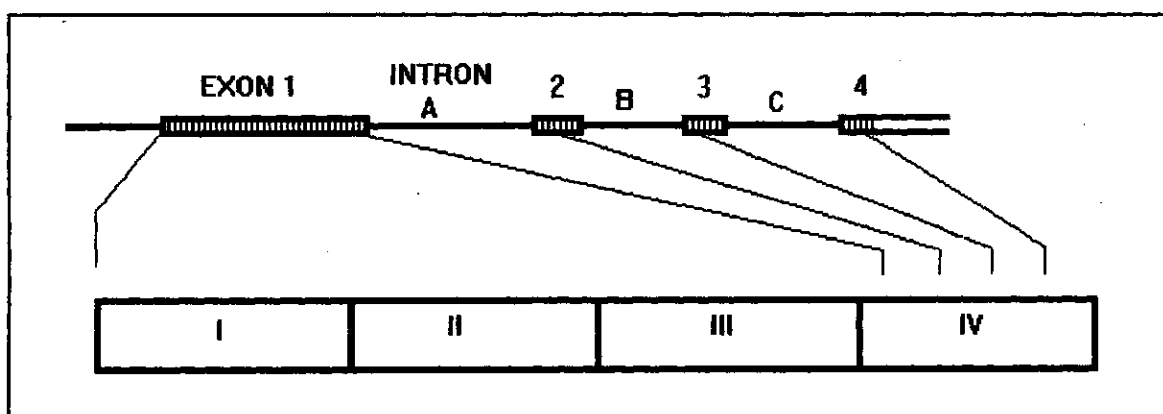
Un estudio sobre los niveles de esta proteína en la retina de gatos Abisinios homocigotos para una degeneración progresiva de bastones-conos, demostró que existe una reducción en la expresión de este gen antes de la aparición de la degeneración retiniana, indicando que alteraciones en este gen podrían ser responsables de la patología visual observada (Wiggert y cols. 1994).

El gen que codifica para esta proteína ha sido localizado en el cromosoma 10 (Liou y cols. 1987) en 10q21.1 (Nickerson y cols. 1991). Está constituido por 9711 pares de bases, consta de cuatro exones, el primero con 3180 pares de bases, un segundo exón con 191 pares de bases, un tercer exón con 143 pares de bases y un cuarto exón con 946 pares de bases (Fong y cols. 1990). Se ha demostrado que la proteína está compuesta de cuatro dominios contiguos. Los tres primeros dominios de esta proteína están codificados por el primer exón, el cuarto dominio está codificado por una parte del

primer exón y por los otros tres exones (Liou y cols. 1988) (Figura 9).

En 1992, McGee y cols. reportaron seis variaciones en la secuencia de este gen que no cambiaban los aminoácidos codificados. Además caracterizaron un cambio en el codon 282 en un paciente con ADRP sin que este cambio segregase con la enfermedad en la familia estudiada. Estos resultados, aparecidos unicamente en el resumen de una comunicación a un congreso, no detallan las características de las variaciones reportadas.

En la actualidad no existen mutaciones descritas en este gen.



**Figura 9 :** Estructura del gen IRBP y su correspondencia con los dominios proteicos.

## ***OBJETIVOS***



## **2 OBJETIVOS**

Los objetivos de este trabajo han sido:

1.- Establecer la frecuencia de los distintos tipos genéticos de Retinosis Pigmentaria (autosómica recesiva, autosómica dominante, ligada al cromosoma X o esporádicos) en España.

2.- Seleccionar las familias afectadas de Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva (ARRP) en base al análisis del árbol familiar y a los estudios clínicos realizados.

3.- Determinar el compromiso de dos genes candidatos en el desarrollo de la enfermedad en dichas familias. Los genes motivo de estudio han sido el gen de la proteína de unión al retinoide intersticial (IRBP) y el gen de la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa (PDE $\beta$ ).

4.- Analizar la segregación de estos genes candidatos en las familias con ARRP mediante estudios de ligamiento y de homocigosidad.

5.- Caracterizar, en las familias con estudios de ligamiento y/o de homocigosidad positivos, las mutaciones, los polimorfismos y las variaciones poco frecuentes en la secuencia de los genes PDE $\beta$  y IRBP.

## ***MATERIAL Y MÉTODOS***

### **3.1 FAMILIAS ARRP EN ESTUDIO**

La mayoría de las familias fueron examinadas por oftalmólogos del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (aquellas cuya denominación comienza por B-) o de la Fundación Jimenez Díaz en Madrid (familias M-), también hemos incluido familias procedentes de hospitales de diferentes puntos de la geografía española como: Hospital La Fe en Valencia (familias V-), Hospital Virgen del Camino en Pamplona (familias P-), Hospital de Basurto en Bilbao (familias E-).

A todos los pacientes se les realizó una exploración completa, comprobando la agudeza visual, la visión cromática, el campo visual, la tensión ocular, biomicroscopía del cristalino y vítreo, exploración del fondo de ojo, se les realizó un electroretinograma con luz azul y roja en condiciones escotópicas y con luz blanca (Fotoescotópico).

Para la selección de las familias incluidas en este estudio hemos seguido los criterios de clasificación de Haim (1993). De acuerdo a los cuales se han incluido:

- familias en las que los afectados eran hijos de padres consanguíneos.
- familias con mas de un afectado en la misma fratria.

En estas familias se documentó la ausencia de anomalías en el examen de fondo de ojo en las madres, hermanas e hijas de los afectados.

En base a la historia familiar y antecedentes oftalmológicos las 45 familias incluidas en el estudio (252 individuos) con patrón de herencia autosómica recesiva se clasificaron en dos apartados, familias consanguíneas (29 familias) y familias no consanguíneas (16 familias) con más de un afectado en la misma fratria. Además, se incluyeron en el estudio del gen de la subunidad  $\beta$  de la Fosfodiesterasa, 12 individuos afectos pertenecientes a familias recesivas de RP, de los que sólo disponíamos del ADN de los probandos.

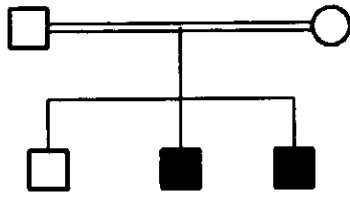
### **3.1.1 FAMILIAS CONSANGUÍNEAS**

En este apartado presentamos 29 familias consanguíneas, con lazos familiares conocidos, son las siguientes:

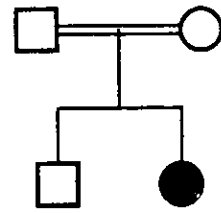
B-2, B-3, B-4, B-5, B-14, B-15, B-22, B-27, B-31, E-1, E-2, E-3, M-9, M-33, M-42, M-43, M-52, M-161, M-180, I-1, P-1, V-1, V-2, V-5, M-24, M-35, M-201, V-7, B-48.

Los árboles genealógicos se muestran a continuación, siguiendo la nomenclatura y el orden establecido anteriormente.

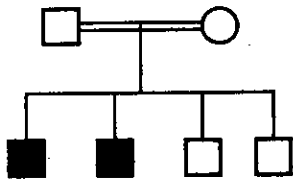
B-2



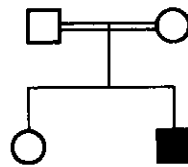
B-3



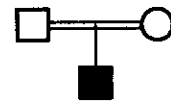
B-4



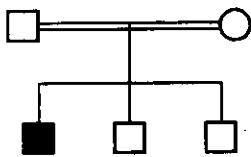
B-5



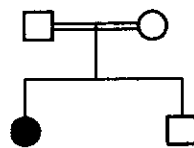
B-14



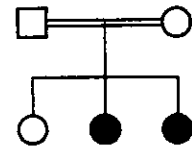
B-15



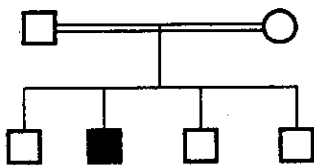
B-22



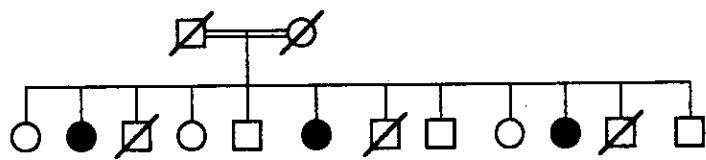
B-27



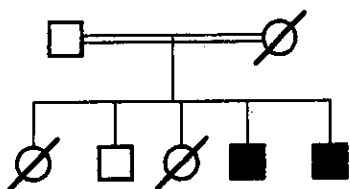
B-31



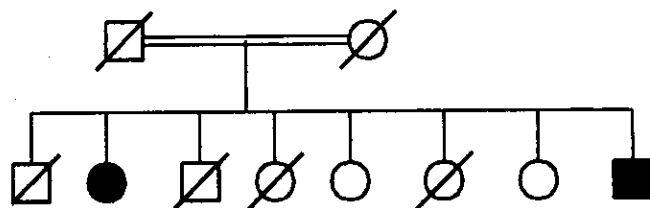
E-1



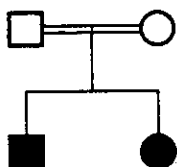
E-2



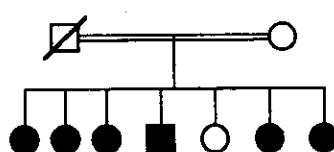
E-3



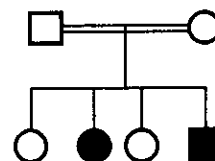
M-9



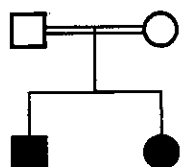
M-33



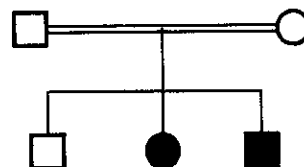
M-42



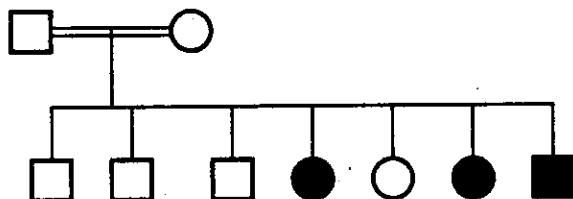
M-43



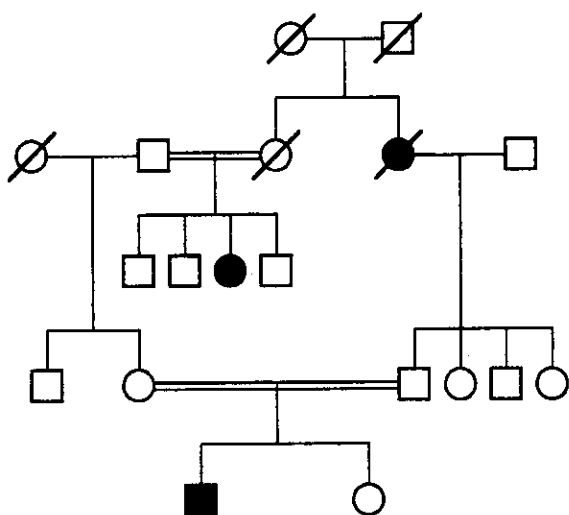
M-52



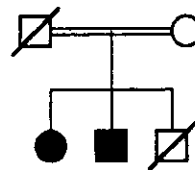
M-161



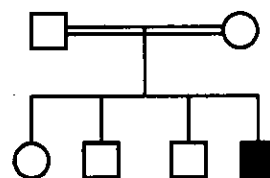
M-180



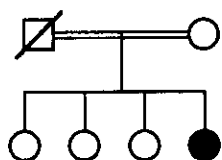
I-1



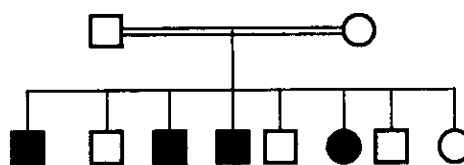
P-1



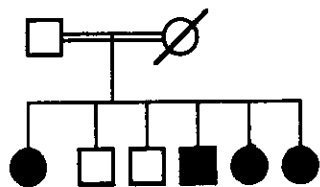
V-1



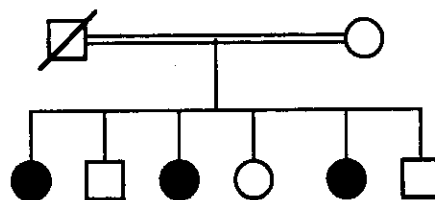
V-2



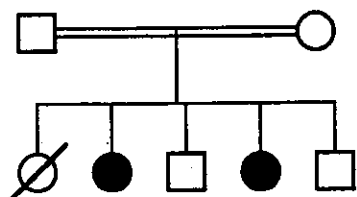
V-5



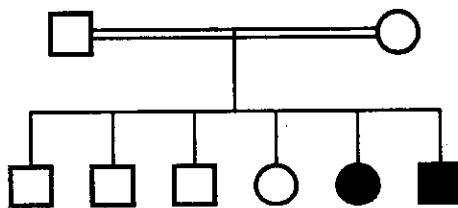
M-24



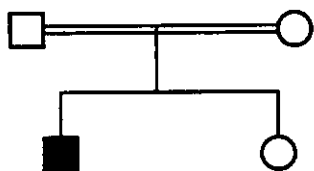
M-35



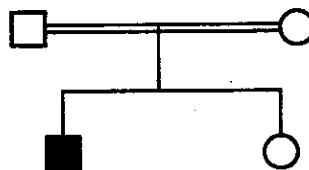
M-201



V-7



B-48





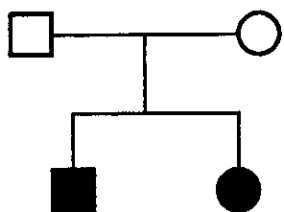
### **3.1.2 FAMILIAS NO CONSANGUÍNEAS**

En este apartado se incluyen las familias en donde no existía una consanguinidad probada y que, de padres sanos descendían más de un hijo afectado en la misma fratria.

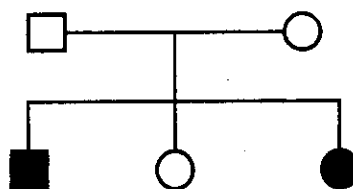
Las familias incluidas en esta categoría son 16 denominadas según sigue:

B-6, B-26, M-11, M-40, M-56, M-68, M-71, M-131, M-141, M-150, M-231, M-235, V-3, V-4, B-50.

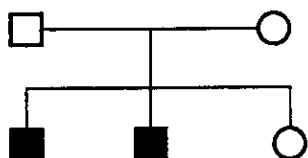
B-6



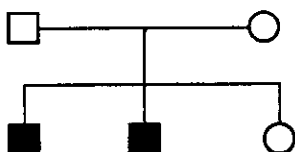
B-26



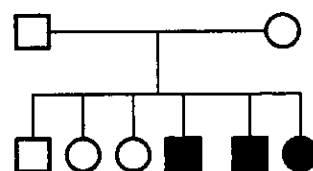
M-11



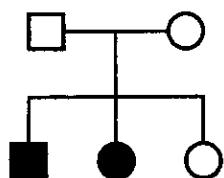
M-12



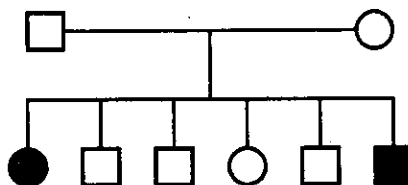
M-40



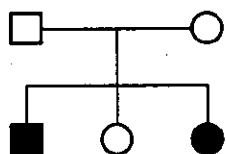
M-56



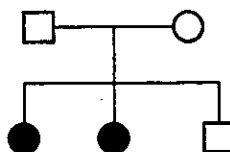
M-68



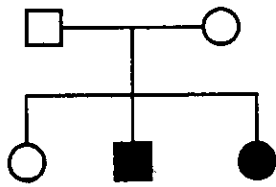
M-71



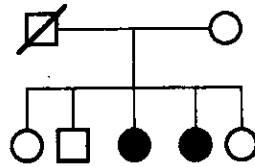
M-131



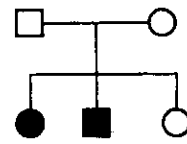
M-141



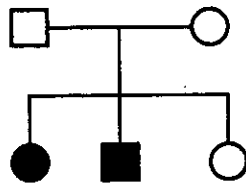
M-150



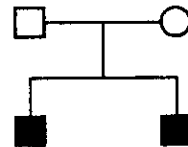
M-231



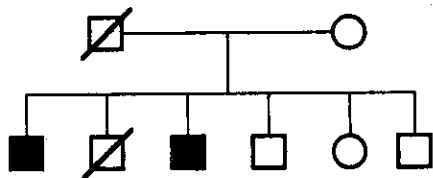
M-235



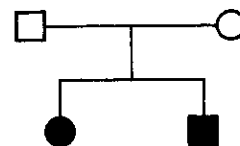
V-3



V-4



B-50



### **3.1.3 OTROS PACIENTES AFECTADOS DE ARRP**

Se analizaron 12 muestras de ADN de afectados de Retinosis Pigmentaria Recesiva, se incluyeron en el estudio del gen de la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa, realizándose la técnica de búsqueda de mutaciones puntuales en los 22 exones que comprende dicho gen. A pesar de no tener ADN de la familia se consideró interesante poder analizar estas muestras y determinar la presencia de alguna mutación.

La numeración de los ADN es la siguiente: Z-031, Z-034, Z-037, Z-039, Z-041, Z-043, 4-II.1, 5-II.2, 8-I.2, 10-II.2, 22-II.3, 24-II.7.

## 3.2 MÉTODOS CONVENCIONALES DE MANIPULACIÓN DEL ADN

### 3.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN

A partir de 10 a 30 ml de sangre recogida sobre anticoagulante EDTA, se procedió a la extracción de ADN. La sangre se lavó con suero fisiológico y mediante una centrifugación a 2500 rpm, 5 minutos a 4°C, se separó el plasma de las células sanguíneas. La masa celular se mezcló vigorosamente con 50 ml. de una solución hipotónica (20 mM Tris pH7,5, 5mM Cl<sub>2</sub>Mg) para producir la lisis de los eritrocitos, manteniendo la mezcla en hielo durante 10 min. Se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm recuperando los leucocitos. A continuación se añadió 3ml de tampón de lisis de leucocitos (10mM Tris pH7,5, 0,4M ClNa), 0,2 ml de un detergente (SDS 10%) y 0,5 ml de solución de proteinasa K (2mg/ml proteinasa K, SDS 1%, 2mM EDTA), se dejó durante toda la noche a 37°C.

La acción de la proteinasa es liberar el ADN nuclear al medio y digerir las proteínas que están asociadas a él. Posteriormente se procede a la eliminación de las proteínas mediante una deshidratación y precipitación de las mismas con una solución saturada de ClNa (5,5M). Tras centrifugar a 3400rpm durante 20 min., las proteínas precipitadas forman un botón en el fondo del tubo y el sobrenadante que contiene el ADN se transfiere a otro tubo. Se realizó una segunda centrifugación en idénticas condiciones y se volvió a recoger el sobrenadante en un tubo limpio. En este punto se procedió a la precipitación del ADN agregando 2 volúmenes de etanol absoluto, agitando cuidadosamente hasta la aparición de un precipitado de ADN con aspecto de medusa. Se separó la medusa de ADN y se lavó por inmersión en etanol 70%. El ADN se disolvió finalmente en una solución amortiguadora de tris-EDTA 10/0,2, manteniendo la mezcla en agitación suave, a 37°C durante 2 horas. Finalmente el ADN disuelto se

conserva a 4°C.

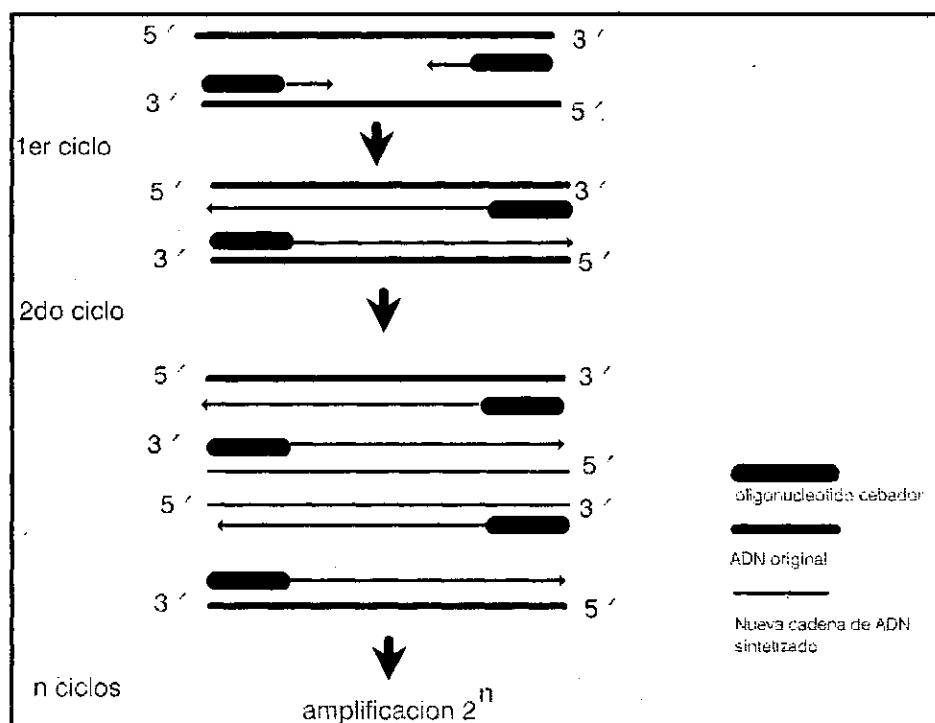
### **3.3.2 LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR): FUNDAMENTOS**

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR, es una técnica capaz de generar "in vitro" grandes cantidades de un determinado fragmento de ADN, a partir de cantidades mínimas del mismo.

Una de las propiedades de todas las enzimas ADN polimerasas es que necesitan una secuencia cebadora para iniciar la síntesis de una hebra complementaria de ADN. Esta propiedad de las ADN polimerasas se aprovecha en la técnica de la PCR para amplificar, mediante replicaciones sucesivas, la secuencia de ADN deseada. Las dos hebras de la molécula de ADN pueden disociarse y reasociarse "in vitro" por calentamiento y enfriamiento. Este proceso de hibridación es altamente específico y en condiciones adecuadas tiene lugar solamente entre las hebras de ADN cuyas bases nucleotídicas son complementarias.

La técnica de la PCR, requiere el uso de dos cebadores oligonucleotídicos que son complementarios a las secuencias situadas en los extremos del fragmento de ADN de interés. Gracias al desarrollo de ciclos repetidos de desnaturalización de la doble hebra de ADN por calor, la hibridación de los dos cebadores a sus secuencias complementarias y la síntesis de ADN mediante la acción de la ADN polimerasa, se consigue la amplificación del fragmento de ADN de interés. La amplificación selectiva de dicho fragmento, se consigue con el diseño de unos cebadores complementarios al ADN que flanquea la región seleccionada de ADN. Cuando una cadena de ADN se calienta, en la primera fase del ciclo, se separan las dos hebras que la forman (desnaturalización). Tras la desnaturalización, la segunda fase del ciclo consiste en la

hibridación de los cebadores con cada una de las dos hebras de ADN de la secuencia de interés, orientándose de modo que la síntesis de ADN (tercera fase del ciclo), en presencia de una polimerasa de ADN y un exceso de trifosfatos de desoxirribonucleósidos, tenga lugar a lo largo de la región de ADN que los cebadores flanquean. Las tres etapas (desnaturalización, hibridación y extensión) constituyen un ciclo, durante el transcurso del cual la cantidad de ADN diana se ha duplicado y que servirá como molde para la síntesis de nuevas hebras de ADN en el ciclo siguiente. El número de ciclos en un experimento de PCR se sitúa entre 20 y 50, dependiendo de la cantidad de ADN de partida y de las necesidades finales. Es inútil aumentar en más de lo necesario el número de ciclos, puesto que la amplificación sigue un proceso exponencial hasta el ciclo 15-20, para alcanzar después una meseta. En mayoría el número de copias obtenidas debería ser de  $2^n$ , siendo n el número de ciclos.



**Figura 10:** Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa

### **3.2.3 POLIMORFISMOS DE CONFORMACION DE HEBRA SIMPLE (SSCP): FUNDAMENTOS**

Los polimorfismos de conformación de hebra simple, (Single Strand Conformational Polimorphism, SSCP) es una técnica que, en un ambiente no desnaturizante, permite a una hebra simple de ADN adoptar una conformación tridimensional basada en su secuencia, esta conformación va a determinar la movilidad de la hebra simple bajo determinadas condiciones electroforéticas. (Orita y cols. 1989)

Mediante la técnica del SSCP se pueden detectar variaciones de secuencia en una región previamente amplificada por la PCR. Este método se basa en el principio siguiente:

Cuando un segmento de ADN de doble hebra se desnaturaliza mediante calor, y despues se enfría brutalmente, las hebras quedan separadas. Si a continuación se le somete a una electroforesis no desnaturizante en un gel de poliacrilamida, cada hebra se renaturaliza sobre si misma, y toma una conformación específica condicionando la migración electroforética. Una mínima variación de la secuencia, como lo es una mutación puntual puede manifestarse por una diferencia de conformación, originando en consecuencia un cambio en dicha migración (Figura 11).

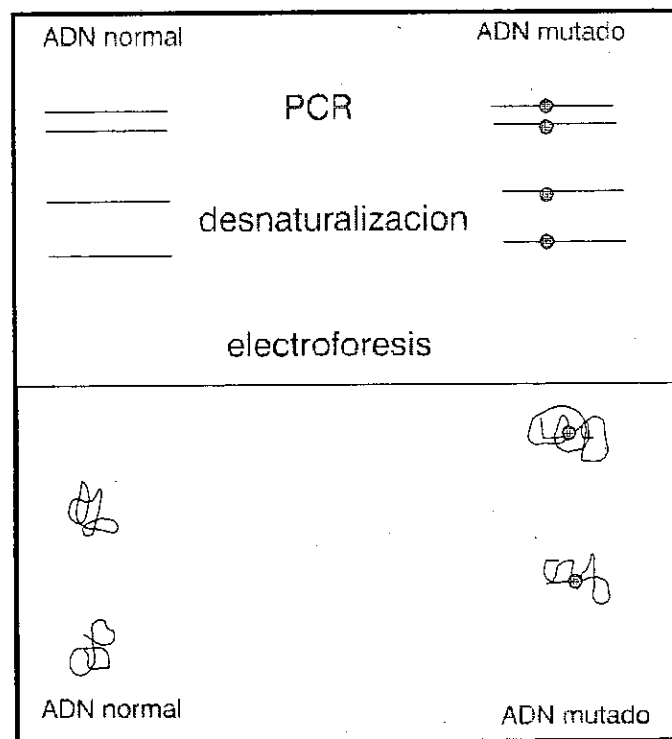
La técnica del SSCP es un método capaz de identificar la mayoría de las variaciones de secuencia en una hebra de ADN. La eficacia de la detección dependerá del tamaño del fragmento a analizar ya que, en fragmentos grandes, pequeños cambios en la conformación no producen un cambio resolutivo en la movilidad, y en fragmentos pequeños pueden existir distintas conformaciones para la misma secuencia nucleotídica. Para fragmentos entre 150-200 pares de bases esta técnica presenta una eficacia para la detección de mutaciones de un 80%-90%(Sheffield VC y cols. 1992).

Se han propuesto modificaciones al método básico con el fin de aumentar la



eficacia del método: distintas condiciones electroforéticas, temperaturas diferentes constantes, y estudio de fragmentos de tamaño adecuado.

La identificación mediante SSCP de fragmentos con una movilidad anormal sugiere la existencia de cambios en la secuencia. La identificación de estos cambios como mutaciones o polimorfismos se lleva a cabo a través del proceso de secuenciación.



**Figura 11:** Esquema de la detección de mutaciones por polimorfismos de conformación de cadena sencilla.

### 3.2.4 LA SECUENCIACION DEL ADN: FUNDAMENTOS

La secuencia de un segmento de ADN puede ser determinada, tanto si este ha sido previamente clonado como si se ha obtenido mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

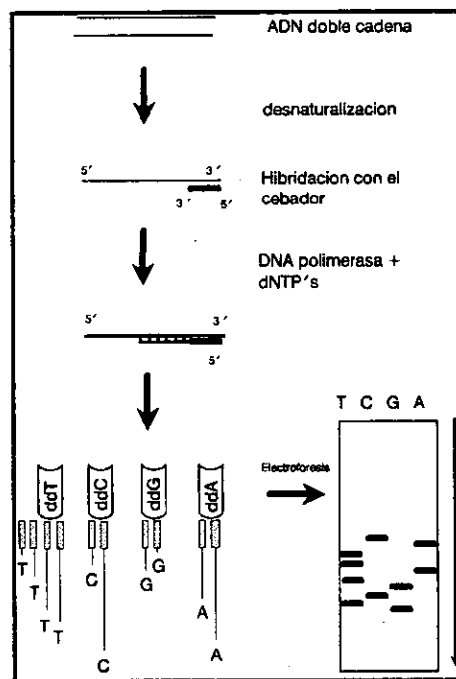
Los dos métodos originales de secuenciación fueron descritos en el año 1977. Estos dos métodos son: la secuenciación química, desarrollada por Maxam, y la secuenciación enzimática, desarrollada por Sanger. La secuenciación química implica la degradación del ADN original. En cambio, la secuenciación enzimática tiene como principio la síntesis de una cadena de ADN utilizando una ADN polimerasa. En la actualidad, el método más utilizado es el de la secuenciación enzimática, habiéndose desarrollado numerosas modificaciones.

Sanger desarrolló un método de secuenciación denominado secuenciación enzimática o método de los dideoxinucleótidos. El método de los dideoxinucleótidos implica la síntesis de una cadena de ADN por una ADN polimerasa "in vitro" a partir de un molde de ADN monocatenario o bicatenario previamente desnaturalizado.

La primera fase del método consiste en la incubación del molde de ADN con un cebador específico. Este proceso se desarrolla a una temperatura de 37°C para facilitar la unión del cebador a la cadena de ADN. Posteriormente la temperatura se aumenta a 65°C con el fin de eliminar posibles estructuras secundarias de la cadena de ADN que pudieran impedir la unión del cebador con dicha cadena. Una vez realizada esta incubación, se realiza una reacción con deoxinucleótidos (dNTPs) y la ADN polimerasa a temperatura ambiente con el fin de copiar la cadena. Luego se añaden los dideoxinucleótidos (ddNTPs) y se incuba a 37°C. En este paso es donde la síntesis de ADN se interrumpe al incorporar un dideoxinucleótido debido a que estos no tienen el grupo hidroxilo en el extremo 3' necesario para la elongación de la cadena. Esta reacción

se realiza en cuatro tubos separados, cada uno de cuales, contiene un dideoxido diferente (reacción A con ddATP, C con ddCTP, G con ddGTP y T con ddTTP). Se obtiene así gran cantidad de fragmentos de distinto tamaño que se separan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, proporcionando la secuencia nucleotídica de la cadena en estudio. El gel de poliacrilamida al igual que en la secuenciación química se lee del extremo 5' al 3', y cada banda corresponde a un nucleótido, de manera que a medida que se avanza hacia el extremo 3' o hacia la parte superior del gel se obtienen nuevas bases de la secuencia.

En la figura 12 se muestra un esquema de la secuenciación según Sanger.



**Figura 12:** Esquema de una electroforesis de una secuenciación enzimática

### **3.3 ESTRATEGIAS DE ESTUDIO**

Se han elegido dos estrategias de estudio para determinar la implicación de los genes candidatos elegidos en la patología de la Retinosis Pigmentaria autosómica recesiva.

#### **3.3.1 MAPAS DE HOMOCIGOSIDAD**

Es una estrategia muy eficiente para mapear genes que causan enfermedades recesivas raras en familias que presentan consanguinidad. Está basado en que un paciente afecto de padres descendientes de un ancestro común, heredará el mismo gen anómalo tanto vía paterna como vía materna, tendrá dos copias del gen anómalo, será homocigoto por descendencia. Smith señaló que los hijos afectados de parejas consanguíneas serían homocigotos también para marcadores genéticos cerca del gen responsable de la enfermedad. Lander y Botstein acuñaron el término de Mapaje homocigótico para describir la estrategia para la localización cromosómica de genes responsables de enfermedades. En la descendencia de un matrimonio entre primos primeros, un 1/16 del genoma se espera que sea idéntico por descendencia. La homocigosidad observada entre marcadores altamente polimórficos ponen en evidencia la común descendencia de este tipo de afectados. Por lo tanto la búsqueda de áreas genómicas homocigóticas da lugar a una buena estrategia para el mapaje de estas enfermedades recesivas poco comunes.

Esta estrategia a pesar de que sólo se puede aplicar a familias consanguíneas, nos permite evaluar genealogías de pequeño tamaño. La falta de homocigosidad en individuos afectados hijos de padres consanguíneos fué uno de los criterios utilizados para excluir en estos pacientes la región genómica en estudio como posible lugar de ubicación del gen responsable de la enfermedad en esa familia.

### 3.3.1.1 MARCADORES PARA LOS MAPAS DE HOMOCIGOSIDAD

#### 3.3.1.1.1 GEN $\beta$ PDE

##### Marcadores microsatélites

Los cebadores y condiciones utilizadas para el estudio mediante PCR del microsatélite D4S111 fueron las descritas por Scott y cols. en 1991. Después de una amplificación de 25 ciclos (95° 30 segundos, 55° 40 segundos, y una extensión final de 72° durante 5 minutos), con un volumen final de 25  $\mu$ l, y una concentración de 1,5 mM de  $Cl_2Mg$ . Las muestras fueron analizadas en geles de agarosa al 1,5% que contenían bromuro de etidio (50  $\mu$ g/100ml tampón TBE 1X) y visualizadas al transiluminador ultravioleta.

Para la región que incluye el polimorfismo D4S127 los cebadores utilizados fueron los descritos por Taylor y cols en 1992 y las condiciones fueron las siguientes: 94°C 1', 59°C 30" y 72°C 30" durante 30 ciclos. 10  $\mu$ l del producto de la PCR, mezclado con 5  $\mu$ l de tampón de carga (30% de ficoll-400, 0,2% de xylene cyanol y 0,2% de azul de bromofenol) se analizaron en geles de poliacrilamida (38% acrilamida, 2% bisacrilamida) al 8%, a 100mA con tampón TBE 1X. Se sumerge el gel en una solución de bromuro de etidio (600 $\mu$ l/L) durante 5 minutos, se baña rápidamente en agua y se visualiza en el transiluminador de luz UV.

Para el marcador D4S227, ligado al extremo 3' del gen PDE $\beta$ , los fragmentos fueron amplificados en 30 ciclos (94°C durante 30", 57°C 30", y 72°C 30") en un volumen final de 50 $\mu$ l, 100ng de ADN, 1,5 mM  $Cl_2Mg$  y 2,5U de Taq. Después de la amplificación, 10  $\mu$ l del producto de la PCR, mezclado con 5  $\mu$ l de tampón de carga se analizaron en geles de poliacrilamida (38% acrilamida, 2% bisacrilamida) al 8%, a 100mA con tampón TBE 1X. El gel teñido con bromuro de etidio se visualiza en el

transiluminador de luz UV.

En la tabla siguiente se resumen las condiciones utilizadas para el estudio de estos marcadores.

MARCADOR	SECUENCIAS CEBADORAS	CONDICIONES DE LA PCR	CONDICIONES ELECTROFORESIS	REFERENCIA
<b>D4S111</b>	F:5'TAGGTGTCTCCTCA GAGAGG3' R:5'AGGACCTGGTGGAC ACCTCA3'	95°C 30segs. 55°C 40segs. 35 ciclos 72°C 5mins.	Agarosa 1,5%	Scott, 1991.
<b>D4S127</b>	F:5'CCTCTGTTTGCAAT CCATTT3' R:5'GTCCCTTGCATGCC CTGGCT3'	94°C 1min. 59°C 30segs. 72°C 30segs. 30 ciclos	Poliacrilamida 38:2 al 8%	Taylor, 1992.
<b>D4S227</b>	F:5'GATCAGGTATCTAC TTTCTTATGTAC3' R:5'GTCCACCCACGGGA ACTGATGTTTC3'	94°C 30segs. 57°C 30segs. 72°C 30segs. 30 ciclos	Poliacrilamida 38:2 al 8%	Weber, 1993

**Tabla 4:** Marcadores utilizados en el estudio del gen de la PDE $\beta$

### **3.3.1.1.2 GEN IRBP**

#### Polimorfismo MspI

Se procedió al estudio mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior digestión del producto obtenido mediante el enzima de restricción MspI. Para estudiar este polimorfismo se emplearon los oligonucleótidos cebadores IRBP 1 y IRBP 2 descritos por Wu y col. La amplificación se realizó en tubos de reacción que contenían 100ng de ADN, 20pm de cada cebador, 200µM de cada dNTP, y 2,5 U de Taq polimerasa en 100µl de volumen final.

Tras una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, se procedió a la amplificación de la secuencia específica que contenía el polimorfismo del gen IRBP a través de 40 ciclos con los siguientes pasos: una desnaturalización de 94°C durante 1 minuto, una hibridación de 62°C durante 1 minuto y una extensión a 70°C durante 1 minuto, para terminar con una extensión final a 72°C durante 2 minutos. Una vez obtenido el producto amplificado se procedió a la digestión del mismo, en un volumen final de 29 µl: 15µl del producto amplificado, 3µl de tampón 10X correspondiente, 3 µl de albúmina de suero bovino (1mg/ml), 1µl de espermidina, y 1µl de enzima MspI (20.000 U/ml), a 37° durante dos horas.

Se añade 5µl de tampón de carga naranja G (40% sacarosa, 0,25% Orange G, Sigma) y se aplican 15µl de cada muestra en los pocillos de un gel de Nusieve al 3% en tampón TBE 1X con bromuro de etidio. Se somete a una electroforesis a 100 mA empleando tampón TBE 1X. El ADN se visualiza en un transiluminador con luz ultravioleta.

### Polimorfismo BglII

Para la amplificación de la región del gen IRBP que contiene el polimorfismo de restricción detectado por el enzima Bgl II, se utilizó el siguiente protocolo:

En el tubo de reacción se mezclan: 200 ng de ADN, 12,5 pm de los cebadores descritos por Humphries y cols, 1991, 1,5 mM de MgCl, 200 mM de cada dNTP. El volumen final de la reacción es de 25 µl. Tras una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, se procedió a la amplificación de la secuencia específica que contenía el polimorfismo a través de 30 ciclos con los siguientes pasos: 95°C durante 1 min, 55°C durante 30 s y 72°C durante 1 min, con una extensión final a 72°C durante 5 min.

Una vez realizado el control de amplificación (electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%), se procedió a la digestión de 10 µl. de la muestra amplificada con 20 U de enzima Bgl II y 1/10 del volumen final del tampón 10X correspondiente, durante 2 horas a 37°C. Se aplicaron 20 µl. del producto de la reacción en un gel de agarosa al 2%, en tampón TBE 1X, con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 100V y el resultado de la separación se visualizó empleando un transiluminador a la luz UV. Estas condiciones se resumen en la Tabla 5.



MARCADOR	SECUENCIAS CEBADORAS	CONDICIONES DE LA PCR	CONDICIONES ELECTROFÓRESIS	REFERENCIA
Polimorfismo intragénico de restricción MspI	For 5' gactagtactaatgaatt- cgtgcttcagttttccatgg 3' Rev 5' tcaaatacttcaggaatt- cgatctgtaagagttggaggt 3'	94°C 1min. 62°C 1min. 70°C 2mins. 40 ciclos	Agarosa Nusieve 3%	Wu y cols., 1991.
Polimorfismo intragénico de restricción BglII	For 5' gtggagcacatctggaaga a 3' Rev 5' ccagggttgcacatgtgtga 3'	95°C 1min. 55°C 30secs. 72°C 1min. 30 ciclos 72°C 5mins.	Agarosa 2%	Humphries, 1991.

**Tabla 5:** Marcadores utilizados en el estudio del gen IRBP

### 3.3.2 LIGAMIENTO GENÉTICO.

El ligamiento genético se define como la tendencia de los alelos correspondientes a loci cercanos en el mismo cromosoma, a ser transmitidos conjuntamente como unidad intacta a través de la meiosis. La fuerza del ligamiento puede utilizarse como una medida de la distancia física entre ellos, pero la frecuencia de recombinación no es constante a lo largo del cromosoma ni en todo el genoma.

La unidad para medir el ligamiento genético es la distancia genética de un cromosoma a la cual se observa, en promedio, un evento de recombinación por meiosis. A esta unidad se le denomina Morgan, la unidad que suele utilizarse es el centiMorgan (cM) que corresponde a la distancia genética en la que se observa recombinación en un 1% de las veces, un cM corresponde aproximadamente a un millón de pares de bases. La relación entre frecuencia de recombinación y distancia genética varía con la distancia entre los loci. Es necesario aplicar, al realizar un análisis de ligamiento, las funciones de mapa para poder calcular las distancias genéticas a través de la frecuencia de recombinación. Existen varias funciones de mapa, la más utilizada es la de Haldane:

$$X = -0,5 [\ln(1-2\theta)]$$

La variación de la relación entre  $x$ , la distancia genética, y  $\theta$ , la frecuencia de recombinación en función de la distancia entre los loci queda patente con los siguientes datos:

para  $\theta = 0,10$ ,  $X$  vale  $0,11$  cM. Pero para  $\theta = 0,40$ ,  $X=80$  cM.

Los estudios de ligamiento pueden efectuarse cuando se dispone de marcadores genéticos de las distintas regiones del genoma humano que permitan seguir en las familias

en estudio, la cosegregación entre la enfermedad y el marcador.

Mediante los programas informáticos es posible contrastar dos hipótesis; que el marcador analizado esté ligado a la enfermedad a una determinada distancia genética (esta distancia genética viene dada en % de recombinación), o que este marcador no está ligado.

A la primera hipótesis se le asignan diferentes valores de recombinación. Una vez introducidos los datos del marcador en el ordenador, se plantean dos probabilidades: que la primera hipótesis sea cierta ( $P$ : los loci están ligados), o que no lo es ( $P_0$ : los loci no están ligados). El cociente entre ambas probabilidades permitirá descartar una hipótesis en favor de la otra. Estas probabilidades se expresan normalmente como  $\log_{10}$  de este cociente y se llama "lod score" ( $Z$ ). El valor LOD correspondiente a una frecuencia de recombinación ( $\theta$ ) consiste en el logaritmo de la razón entre la probabilidad condicional de los resultados asumiendo dicha frecuencia de recombinación y la probabilidad de los mismos resultados asumiendo que no existe ligamiento ( $\theta = 0,5$ ). Por lo tanto, el valor LOD indica cuantas veces es más probable (o más improbable si resulta negativo) el ligamiento a una  $\theta$  dada que el no ligamiento. Los valores positivos de  $Z$  sugieren que los dos loci analizados están ligados mientras que los valores negativos sugieren que el ligamiento es menos probable. Se acepta que valores de LOD por debajo de -2 excluyen el ligamiento entre los dos loci estudiados.

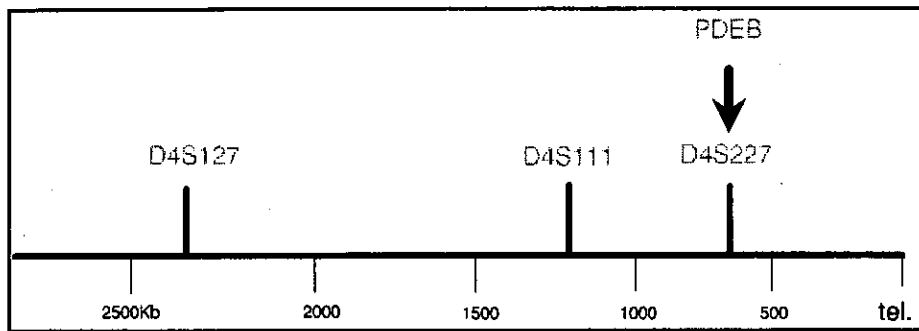
El cálculo de algunos lod scores sencillos se puede realizar a mano, pero aún en los casos más sencillos el cálculo a mano es bastante laborioso, por lo que se necesita un programa informático.

El grupo de programas más utilizado es el denominado paquete LINKAGE, desarrollado por Lathrop, Lalouel y Ott (1984). Todos los análisis comienzan por la introducción de los datos (valores de los marcadores analizados) de las familias, uno de

los programas del paquete LINKAGE, el MAKEPED, se encarga de codificar esos datos. Mediante otro programa, PREPLINK, se introducen las características de los loci a estudiar, tanto el de la enfermedad como los correspondientes a los marcadores. Una vez introducidos todos los datos, tanto de las familias como de los marcadores, se pueden realizar distintos estudios. Uno de los programas más utilizados es el MLINK, con el que se consiguen los valores de lod scores entre dos puntos. Otro programa sería el ILINK se utilizaría para determinar el orden más probable entre los marcadores. Un enfoque más potente consiste en realizar el análisis múltiple (multipoint) mediante el programa LINKMAP, en donde se estudian los distintos valores de los scores que se obtienen al situar el locus de la enfermedad, cuya posición se desconoce, en distintas posiciones entre un grupo de marcadores. Los distintos valores de lod score se sitúan en un gráfico que en abcisas tiene las distancias genéticas en cM entre los marcadores. El punto más alto de la curva corresponde al lugar más probable para situar el locus de la enfermedad.

### **3.3.2.1 ANÁLISIS DE LIGAMIENTO PARA EL GEN PDE $\beta$**

Para la realización de este análisis se procedió a la contrastación de 2 hipótesis; una que los marcadores analizados estuvieran ligados al gen que producía la enfermedad, o que estos marcadores no se heredasen ligados a la enfermedad. Los marcadores utilizados, descritos en el apartado 3.3.1.1.1 se encontraban cercanos al supuesto gen que determinaría la enfermedad, el gen de la PDE $\beta$  (Figura 13).



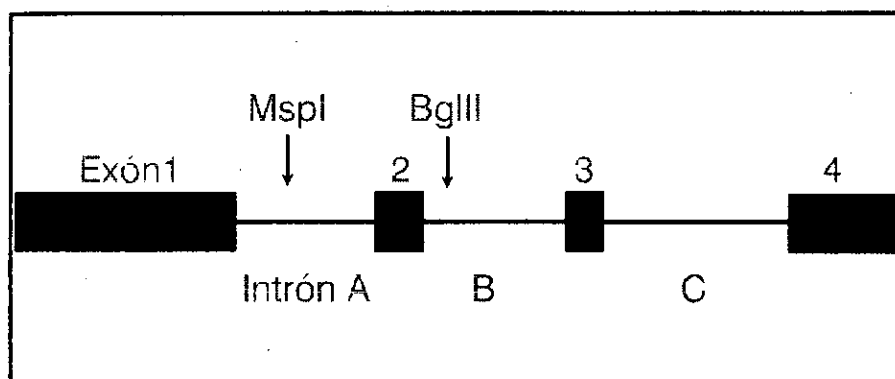
**Figura 13:** Mapa de localización de los marcadores del gen PDE $\beta$

Las frecuencias descritas para estos marcadores nos indicaron el grado de informatividad que presentaban, ya que a mayor número de alelos con frecuencias similares mayor información obtendríamos.

Mediante un ordenador y a través del programa LINKAGE se calculó el valor LOD correspondiente a distintas frecuencias de recombinación entre cada uno de los marcadores utilizados y el locus RP con la ayuda del programa MLINK del paquete de programación LINKAGE 5.1 (Lathrop y Lalouel, 1984).

### 3.3.2.2. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO PARA EL GEN IRBP

En este caso el estudio de ligamiento entre los marcadores estudiados y la enfermedad se realizó a través del análisis de segregación de los marcadores, ya que estos eran intragénicos, el valor de recombinación era 0 (Figura 14).



**Figura 14:** Mapa de localización de los marcadores del gen IRBP

### 3.4 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DEL ADN

#### 3.4.1 SSCP DEL GEN PDE $\beta$

Se procedió a la amplificación mediante PCR de los 22 exones del gen de la PDE $\beta$  y del extremo 5' UTR. Para la amplificación de todos los exones se procedió utilizando el mismo volumen final (25 $\mu$ l), con 1 $\mu$ M de cada cebador, 200 $\mu$ M de cada dNTPs, 50 mM KCl, 10mM tris-HCl pH 8,3, 300 ng de ADN, 0,25 U de Taq polimerasa, las concentraciones de Cl<sub>2</sub>Mg varían entre los diferentes exones así como las temperaturas de hibridación (Tabla 6). El protocolo estandar de PCR se llevó a cabo con una desnaturalización inicial de 5 min. a 95°C, 25 ciclos de dos pasos: una desnaturalización a 95°C 30 segs., una hibridación de 40 segs., y una extensión final a 72°C durante dos min. Una vez realizado un control de amplificación en un gel de agarosa al 2%, se añadieron a 5 $\mu$ l del producto de la PCR, 16 $\mu$ l de azul de formamida (formamida desionizada 98%, 0,5M de EDTA, 0,1% azul de bromofenol, 0,1% xilencianol. Las muestras se desnaturalizaron 5 minutos a 94°C y luego se pusieron en hielo durante unos minutos. Se sembraron 4 $\mu$ l de la muestra en un gel al 12% de acrilamida 29:1 utilizando

hielo durante unos minutos. Se sembraron 4µl de la muestra en un gel al 12% de acrilamida 29:1 utilizando tampón TBE 1X. Para cada uno de los exones se realizó la electroforesis en dos condiciones, una durante 4-6 horas a 10w y otra durante 16-18 horas a 2w en un gel vertical 24x18, más tarde se procedió a la tinción con plata. Después de una fijación con etanol 10% durante 5-10 minutos, se descarta el etanol y se trata con ácido nítrico 3 minutos, se lava el gel rápidamente con agua desionizada y se deja en una solución de plata (2,02 gr/l) durante 20 minutos en agitación. Para el revelado se baña el gel en una solución que contiene: NaCO<sub>2</sub> (29,6 gr/ml) y 540µl de formaldehído al 37%, cuando se obtiene la intensidad deseada en las bandas, se procede a la parada del revelado con ácido acético al 10% durante 5 minutos o más. Una vez parada la reacción el gel se deposita sobre un trozo de papel Whatman y se seca durante 45 min a 80°C en un secador de geles (Gel Dryer GD-3, Fisher Scientific).

Exón	Cebadores	Temperatura	Cl <sub>2</sub> Mg	Tamaño
5'UTR	F:cgctagaagccaactgtgcc R:gccggcaaaatcgtctgttcc	68°C	1mM	298
1a	F:ggaccagaaccccgtgccgc R:gttgcgtggcgtaagagg	68°C	1mM	219
1b	F:gcgtggtctcaagtgcggcg R:tccgagctgacctcacctgg	68°C	1mM	276
2	F:cgtgacgcctcagcctct R:ggcaggcaggcaggcagag	68°C	1mM	215
3	F:cacggggcacatgctgaaaactg R:aggacctggcctcgtggcagagc	68°C	2mM	146
4	F:ccctgctgctgtggtcagaccggcg R:aggagaagaggtagggggggcggt	66°C	1,5mM	243
5	F:accgcccaccctcaccctctct R:ccctaccctcctctcctgcctg	68°C	1,5mM	141
6	F:cagcccccgaccagtgttttgc R:ggcgctgagccggggtctgagggg	68°C	1,5mM	116
7	F:gagaagcacacatgcgcgaccag R:gagaagcacacatgccgaccag	68°C	1,5mM	114
8	F:ggccacagaggccatttagatcat R:catcgtgaatcaaatctcctct	66°C	1,5mM	140
9	F:ccaggccagcctcaggcggagct R:ccggcgaaccagctgcccagggt	66°C	1,5mM	195
10	F:gggagaggacgacaaagggc R:gccccgcgaccaggatga	68°C	1,5mM	312
11	F:gagctcttctcgtgacacatctg R:aacttctcctccagcctcacactg	68°C	1,5 mM	119
12	F:cctccctcagcccacaatccctccc R:tgaactatgccctcgggtgtctccc	68°C	1,5mM	153
13	F:gcgctctggcggacttacagcgtt R:gcctgcacaacctggtattcgg	64°C	2mM	154
14	F:ctggagccaggaccggtgagcaagg R:ggctaattcacatgcccgccctgag	64°C	1mM	136
15	F:cccacgggcctcacctccaccct R:cggccctgtgcctcggagcctgcg	68°C	1,5mM	138
16	F:cctgacgccctgggcataacctccg R:ggcgccccctccggaggcgcgcg	68°C	1,5mM	107
17	F:ggggcggggtctccactgtctcc R:ggaccctcgtgccccctccgccc	68°C	1,5mM	146
18	F:cagcactgtgcccggttgtgtct R:tggcctggcccagggtgcccctca	68°C	2mM	175
19	F:gctcaaccggagcctgtgtgtggg R:agaacccccctgcctgagaccaagcc	68°C	1,5mM	265
20	F:ctgttcccgcctctgttccctcc R:ttgcctgctccctgctctccca	68°C	1,5mM	134
21	F:gactggtggtgactctcactccc R:agagtcaccgagtcctgcccaca	68°C	1,5mM	174
22	F:accaggcaggagggaaggaataggg R:ggtgaagattgaggagccataggg	68°C	1,5mM	127

Tabla 6: Condiciones utilizadas en la amplificación de los exones del gen PDEβ



### **3.4.2 SSCP DEL GEN IRBP**

Se procedió a la amplificación mediante PCR de los ocho fragmentos del gen IRBP que cubren la totalidad de la zona codificante. Para todos los fragmentos obtenidos se procedió a la amplificación en un volumen final de 25  $\mu$ l con 10 pm de cada cebador, 200 $\mu$ M de cada dNTP, 1,5 mM de ClMg y 1,5 U de Taq polimerasa, con el siguiente protocolo; una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, y 25 ciclos de dos pasos, una desnaturalización a 95°C 30 segundos, una hibridación 40 segs. a 55°C, y una extensión final a 72° durante 2 minutos.

Dado que los cinco fragmentos de amplificación correspondientes al primer exón de este gen presentan un tamaño muy grande, se procedió a su digestión con distintas enzimas de restricción para de esta manera aumentar la eficacia de la técnica empleada para la detección de mutaciones (Tabla 7).

Una vez realizado un control de amplificación en un gel de agarosa al 2%, se procedió a la digestión de 10 $\mu$ l del producto de PCR, con 2 $\mu$ l de Tampón 10X correspondiente y 20 U del enzima, en un volumen total de 20 $\mu$ l, dejándolo dos horas a 37°C.

Para la preparación de las muestras se mezcló 15  $\mu$ l de azul de formamida, con 7 $\mu$ l del producto de la digestión. Estas muestras se desnaturalizaron 5 minutos a 95°C y 6 $\mu$ l de cada una de ellas se aplicaron en un gel no desnaturalizante de acrilamida 29:1 al 12% en tampón TBE 1X. La electroforesis se realizó en geles verticales de 20 cms. (Penguin P9DS-2, Owl Scientific Inc.) en dos condiciones distintas, una durante 3-4 horas a temperatura ambiente 20w y otra 17 horas a 4 w también a temperatura ambiente. El revelado de los geles se realizó mediante la técnica de tinción con plata.

**EXÓN 1 DEL GEN IRBP**

Cebadores	Posición	Tamaño	Enzima	Fragmento
1F 5'AGCCCCAGACCTTCTGTCCA 3' 1R 5'GTGCAGGTAGGAGATGATGT 3'	1-690	690	Ava I	128pb 150pb 412pb
2F 5'ACATCATCTCCTACCTGCAC 3' 2R 5'TCCACCAGCGTGTAGTAGTG 3'	690-1160	490	Msp I	112pb 124pb 234pb
3F 5'GACTACTACACGCTGGTGGA 3' 3R 5'GATCTCACCTACCAGTGTGG 3'	1160-1830	670	Msp I	77pb 87pb 125pb 142pb 239pb
4F 5'CCACACTGGTAGGTGAGATC 3' 4R 5'CTTCACTGTCTCCAGTTCAG 3'	1830-2400	570	Hae II	263pb 307pb
5F 5'CTGAACTGGAGACAGTGAAG 3' 5R 5'GGAGAATGGGTCAACTCAGT 3'	2400-3239	839	Msp I	129pb 135pb 147pb 213pb 215pb

**EXÓN 2**

Cebadores	Posición	Tamaño	Enzima	Fragmento
6F 5'ACTGAGTAGGACCTCCAAC 3' 6R 5'TCCTGGCTAGGAAGCACTGA 3'	4938-5191	253	NO	253pb

**EXÓN 3**

Cebadores	Posición	Tamaño	Enzima	Fragmento
7F 5'TGAACAGGCTCTGCTTCCCAT 3' 7R 5'GGAGAAAGCTTCTCCACGTA 3'	6989-7180	192	NO	192pb

**EXÓN 4**

Cebadores	Posición	Tamaño	Enzima	Fragmento
8F 5'ATCCTGAAGGGCCTTATGTCT 3' 8R 5'AACCTAACCAGAGCTCAGCAG 3'	8739-9252	412	NO	412pb

**Tabla 7:** Cebadores y enzimas utilizados en el análisis mediante SSCP del gen IRBP.

### 3.5 SECUENCIACIÓN

En los casos en que fué necesaria la secuenciación del producto, se procedió a la inserción del fragmento obtenido mediante PCR en un vector TA clonig (Invitrogen). Para lo cual se toman 0,5  $\mu$ l del producto amplificado, se añade 1  $\mu$ l de plásmido, 0,5  $\mu$ l de enzima ligasa, 3  $\mu$ l de agua desionizada y 0,5  $\mu$ l de tampón de ligación se deja toda la noche a 12°C para que el proceso tenga lugar. El paso siguiente consiste en introducir el plásmido con el inserto (producto de PCR) en células competentes, para lo cual se añade a 25  $\mu$ l de bacterias competentes 1  $\mu$ l de la mezcla de ligación y 2  $\mu$ l de b-mercaptoetanol, se mantiene el tubo de reacción en hielo durante 30 min. Se somete a las células a un choque térmico, 2 min a 42°C y se vuelve a poner en hielo dos min. Se añaden 450  $\mu$ l de medio LB (10 gr/l ClNa, 10 gr/l triptona, 5 gr/l de extracto de levadura, pH 7,2-7,4) y se deja durante dos horas a 37°C con agitación.

Para seleccionar las bacterias en las que ha tenido lugar la introducción del plásmido, pondremos a crecer 100  $\mu$ l de este medio en placas de LB con agar que contienen kanamicina ó ampicilina, ya que el plásmido es resistente a estos antibióticos, estas placas también tendrán X-gal (40mg/ml) que nos permitirá distinguir aquellos plásmidos que realmente han insertado el fragmento de PCR que queremos clonar. Obtendremos colonias blancas con inserto (plásmido recombinante) y colonias azules sin inserto. Picaremos una colonia blanca y la pondremos a crecer con 5ml de medio LB con antibiótico durante toda la noche a 37°C. La purificación del ADN plasmídico se realizó a traves de el kit Magic Minipreps DNA purification System (Promega), siguiendo las instrucciones del suministrador, se obtiene de 1-5  $\mu$ g de ADN/ml de cultivo bacteriano.

Una vez obtenido el ADN plasmídico se realiza la digestión con EcoRI que nos permite separar el ADN del inserto del del plásmido. Se digieren 7  $\mu$ l del ADN purificado con 40U de la enzima EcoRI y se deja dos horas a 37°C, después de lo cual se siembra

en un gel de agarosa al 1,5% y se visualiza en un transiluminador para verificar que el plásmido contiene nuestro inserto. Una vez comprobado se precipitan los 43µl restantes con 2µl de NaOH (5N), 17µl de acetato sódico 3M y 400µl de etanol frío manteniendolo a -20°C toda la noche. Se centrifugó 15 min a 4°C y se dejó secar el botón. La secuenciación se realizó mediante el método de Sanger utilizando el kit de secuenciación Sequenase version 2.0 (US Biochemicals) siguiendo las condiciones del suministrador. La electroforesis de las muestras previamente desnaturalizadas a 95°C 5 min y puestas en hielo, se realizó en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% (38:2 acrilamida/bisacrilamida) posteriormente se procedió al secado del gel sobre papel Whatman 3mm a 80°C durante dos horas en un Gel Dryer GD-3 (Fisher Scientific) y a su exposición durante toda la noche sobre una película de rayos X.

## ***RESULTADOS***

## 4.1 ESTUDIO DEL GEN PDE $\beta$

### 4.1.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE MARCADORES EN EL GEN PDE $\beta$

Los estudios de ligamiento que se presentan se han realizado en la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.

Los resultados del estudio de ligamiento así como los del estudio de homocigocidad, se presentan en las tablas 8 y 9.

Se excluyeron del estudio aquellas familias consanguíneas en donde la observación de heterocigosis en individuos afectados nos indicó la exclusión de la zona en estudio. En las familias no consanguíneas el criterio de no segregación de un haplotipo concreto con la enfermedad fué la pauta que nos guió en la decisión de la exclusión de las familias.

Los resultados se han codificado de la siguiente manera:

- **C**, cosegregación, indicaría que existe un haplotipo que se hereda asociado con la enfermedad.
- **H**, homocigosis, indicaría la existencia de homocigocidad en la zona de estudio.
- **ECH**, exclusión de la familia en estudio debido a la falta de cosegregación de un haplotipo con la enfermedad y por falta de homocigosis en la zona de estudio.
- **EH**, exclusión por falta de homocigocidad en la zona de estudio.
- **EC**, exclusión por falta de un haplotipo que se herede asociado a la enfermedad.

FAMILIA	RESULTADOS	ESTUDIO
B-2	ECH	EXCLUIDA
B-3	EH	EXCLUIDA
B-4	CH	NO EXCLUÍDA
B-5	EH	EXCLUIDA
B-14	EH	EXCLUIDA
B-15	EH	EXCLUIDA
B-22	EH	EXCLUIDA
B-27	CH	NO EXCLUÍDA
B-31	EC	EXCLUIDA
B-48	CH	NO EXCLUÍDA
E-1	ECH	EXCLUIDA
E-2	ECH	EXCLUIDA
E-3	ECH	EXCLUIDA
M-9	CH	NO EXCLUÍDA
M-24	ECH	EXCLUIDA
M-33	ECH	EXCLUIDA
M-35	ECH	EXCLUIDA
M-42	ECH	EXCLUIDA
M-43	ECH	EXCLUIDA
M-52	ECH	EXCLUIDA
M-161	ECH	EXCLUIDA
M-180	ECH	EXCLUIDA
M-201	EH	EXCLUIDA
I-1	ECH	EXCLUIDA
P-1	ECH	EXCLUIDA
V-1	EH	EXCLUIDA
V-2	ECH	EXCLUIDA
V-5	ECH	EXCLUIDA
V-7	CH	NO EXCLUÍDA

**Tabla 8.** Resultados en las familias consanguíneas

<b>FAMILIAS</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>ESTUDIO</b>
B-6	EC	EXCLUIDA
B-26	EC	EXCLUIDA
M-11	EC	EXCLUIDA
M-12	EC	EXCLUIDA
M-40	EC	EXCLUIDA
M-56	EC	EXCLUIDA
M-68	EC	EXCLUIDA
M-71	C	NO EXCLUÍDA
M-131	EC	EXCLUIDA
M-141	EC	EXCLUIDA
M-150	EC	EXCLUIDA
M-231	EC	EXCLUIDA
M-235	EC	EXCLUIDA
V-3	C	NO EXCLUÍDA
V-4	EC	EXCLUIDA
B-50	C	NO EXCLUÍDA

**Tabla 9.** Resultados en las familias no consanguíneas.



#### 4.1.2 RESULTADOS DEL ESTUDIO MEDIANTE EL SSCP EN EL GEN PDE $\beta$

De las 29 familias consanguíneas sólo cinco familias B-4, B-27, M-9, V-7, y B-48 presentaban cosegregación y homocigosis para los marcadores analizados, y de las 16 familias no consanguíneas las familias M-71, V-3, M-12, y B-50 presentaban cosegregación entre los marcadores y la enfermedad, por lo tanto, para todas estas familias fueron estudiados a través del SSCP los 22 exones y el extremo 5' del gen de la subunidad  $\beta$  de la PDE. En aquellas familias en donde la técnica del SSCP nos indicó una migración anómala se procedió a la secuenciación y análisis del fragmento.

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos y se detallan los exones en los que se identificó la presencia de una banda con migración anómala.

<b>Familias consanguíneas</b>	<b>Exón con movilidad anormal</b>
B-4	Exón 1
B-27	Exón 17
M-9	Exón 13, Exón 22
V-7	Ninguno
B-48	Ninguno
<b>Familias no consanguíneas</b>	
M-71	Ninguno
V-3	Exón 6
M-12	Ninguno
B-50	Ninguno

**Tabla 10.** Resultados del estudio mediante SSCP en el gen PDE $\beta$

### **4.1.3 CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES**

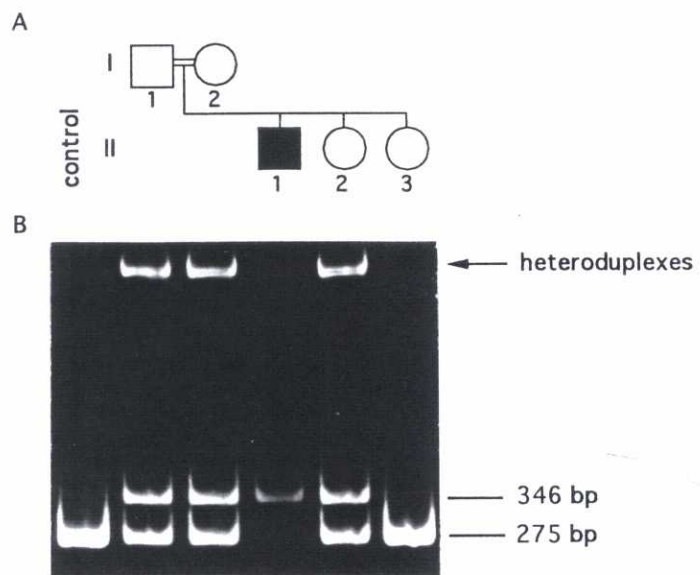
#### **4.1.3.1 MUTACIÓN EN LA FAMILIA B-4**

Al efectuar una electroforesis en gel de acrilamida al 6% no desnaturalizante como control de amplificación del exon 1A, la muestra correspondiente al probando de la familia B-4 (II-1) presentaba una banda (346pb) de migración mas lenta que la observada en los controles normales (275pb) (Figura 14). El análisis de las muestras corerspondientes a los miembros de dicha familia permitió observar que ambos padres presentaban una banda de 275 pb (normal) y otra, de migración más lenta, de mayor tamaño, idéntica a la que presentaba el afecto de esta familia. Una de las hermanas (II-3) presentaba un patrón normal, mientras que otra hermana (II-2) presentaba un patrón idéntico al de los padres. (Figura 15).

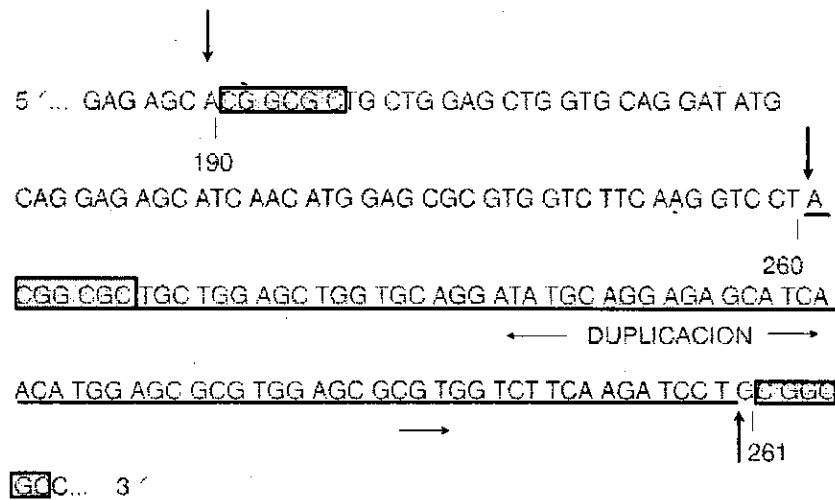
La secuenciación del exón 1 de la subunidad  $\beta$  de la PDE de la muestra de ADN del individuo afecto demostró, en homocigosis, una duplicación en tandem de un fragmento de 71 pb. La duplicación que se había producido entre el segundo y tercer nucleótido en el codón 80, daba lugar a un corrimiento de la pauta de lectura que conllevaba la aparición de un codón stop prematuro en la posición 213. La Figura 16 esquematiza esta duplicación.

El análisis adicional de 80 individuos controles (160 cromosomas) en los que no se observó esta anomalía, descartaba totalmente la posibilidad de que se tratase de un polimorfismo.

Estos resultados han sido motivo de una publicación que se incluye en el Anexo.



**Figura 15.**-Producto de PCR del exón 1 del gen PDEB con una movilidad anormal, que cosegrega con la enfermedad en la familia B-4. En los dos padres y en la hermana no afectada (I-1, I-2, II-2) se observa una banda extra mayor (346bp) además de la banda normal (275pb), el afectado (I-1) sólo presenta la banda mayor, no aparece la banda normal, y la hermana (II-3) es homocigota para la banda normal.



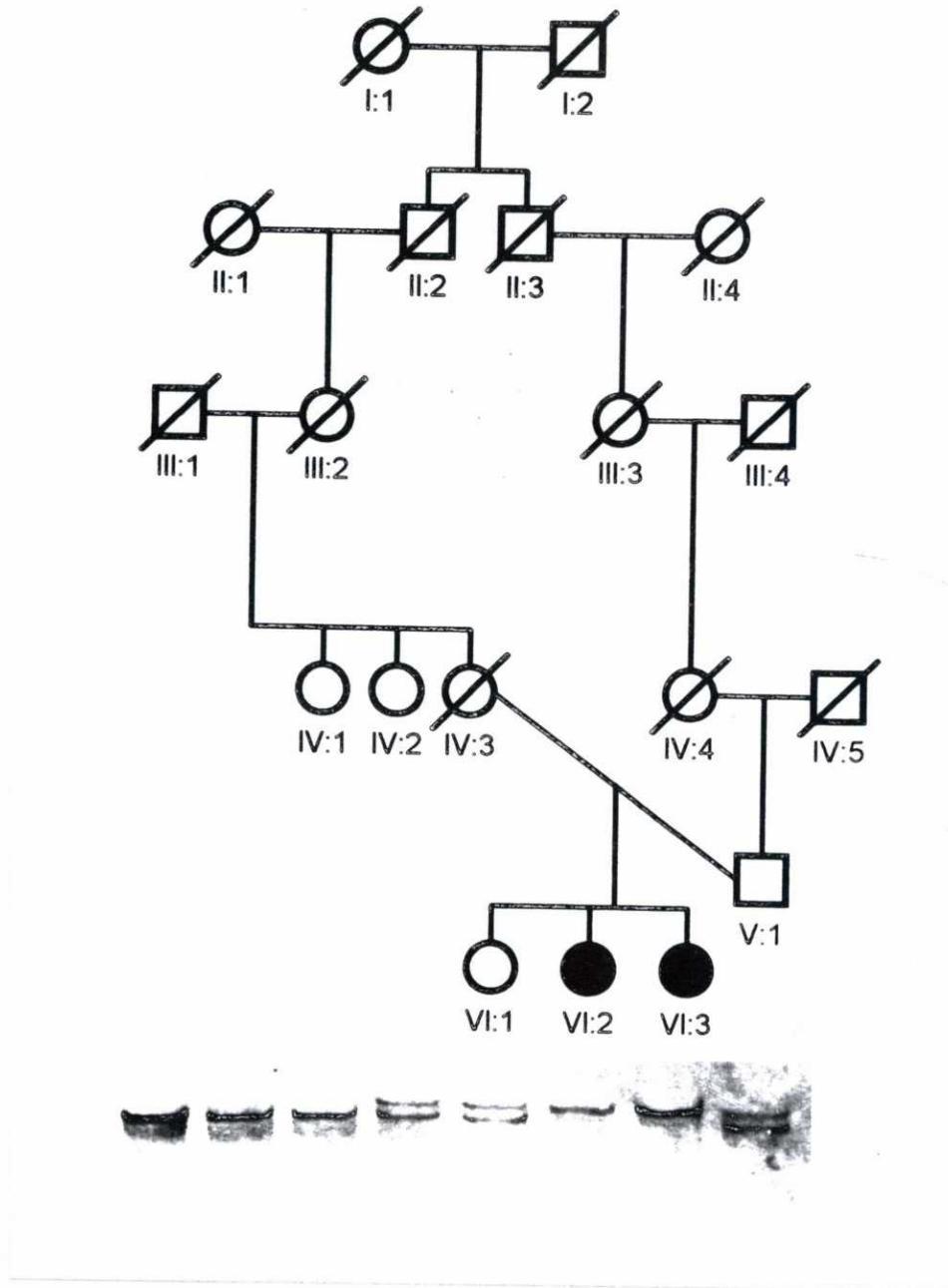
**Figura 16.** - Caracterización del alelo mutante, en donde entre la secuencia de un alelo normal aparece un motivo duplicado. Entre los nucleótidos 260 y 261 de la secuencia normal del cDNA aparece una duplicación idéntica a los nucleótidos 190 y 260. En el alelo normal una secuencia de 65pb está flanqueada por dos repeticiones de 6pb, la primera de las cuales está incluida en la región duplicada. La numeración de la secuencia es según Collins y cols.

#### **4.1.3.2 MUTACIÓN EN LA FAMILIA B-27**

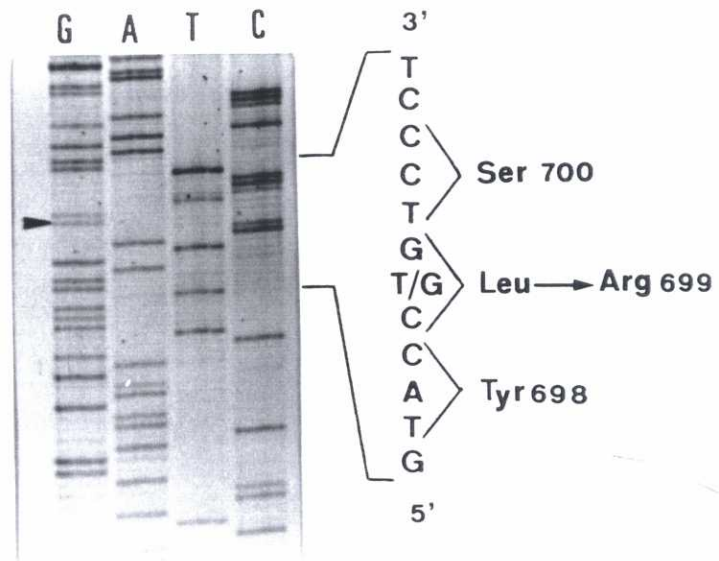
En la familia B-27, el análisis mediante SSCP de los exones de la subunidad  $\beta$  de la PDE reveló un patrón anormal en el exón 17: las dos hermanas afectadas presentaban un patrón de migración anormal comparadas con individuos control (Figura 17). El patrón observado para su padre, una tía y la hermana no afecta hacía sospechar su condición de portadores de la mutación. El análisis de secuenciación reveló que en esta familia existía una transversión de una T a una G en posición 2117 (Figura 18). Esta mutación provocaba la sustitución de un residuo hidrofóbico de leucina por un residuo hidrofílico de arginina en la posición 699 de la proteína. El dominio catalítico para la hidrólisis de cGMP ha sido asignado a los residuos 555-790 en la proteína humana por lo que esta mutación alteraría dicho dominio.

El análisis adicional de 80 individuos controles (160 cromosomas) en los que nose observó esta anomalía, descartaba totalmente la posibilidad de que se tratase de un polimorfismo.

Estos resultados han sido motivo de una publicación que se incluye en el Anexo.



**Figura 17.-** Árbol genealógico de la familia B-27. Análisis mediante SSCP del exón 17 del gen de la PDEB en los individuos de la familia y dos controles.



**Figura 18.-** Análisis de la secuencia del exón 17 en el individuo VI-2. El cambio de una T por una G en el nucleótido 699 está indicado con una flecha.

#### **4.1.3.3 MUTACIÓN EN LA FAMILIA M-9**

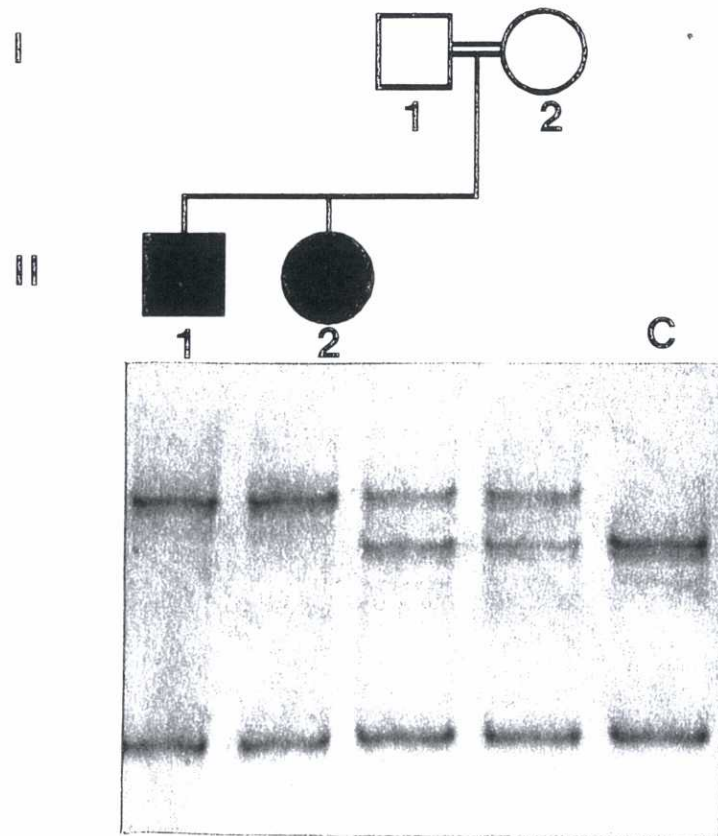
En la familia M-9 la realización del SSCP en todos los exones del gen de la subunidad  $\beta$  de la PDE llevó a la observación de una variación en el patrón de migración en el exón 13 del mismo (Figura 19).

El análisis de este fragmento mediante secuenciación evidenció una transición de una guanina por una adenina en el codón 552 de este gen. Este cambio da lugar a la sustitución de una arginina por una glutamina en la secuencia de la proteína (Figura 20). Ambos padres eran portadores de esta sustitución y ambos hijos afectados eran homocigotos para la misma.

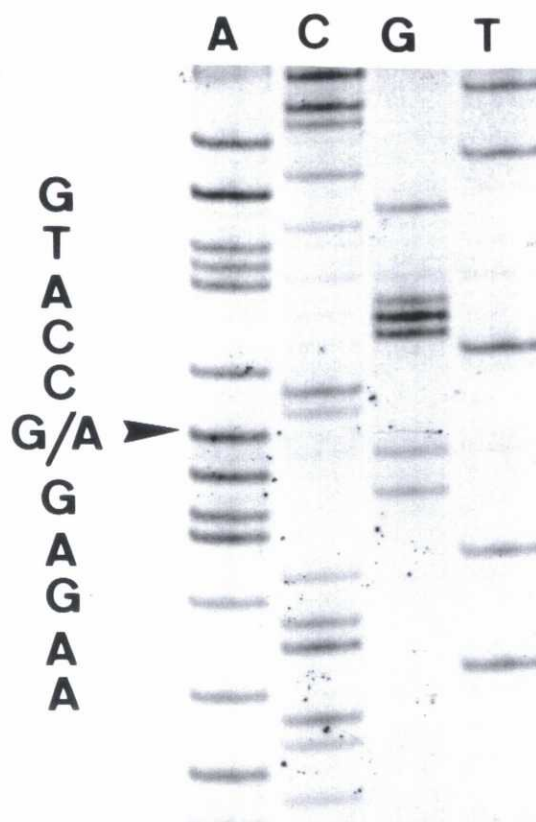
El análisis adicional de 80 individuos controles (160 cromosomas) en los que no se observó esta anomalía, descartaba totalmente la posibilidad de que se tratase de un polimorfismo.

Estos resultados han sido motivo de una publicación que se incluye en el Anexo.





**Figura 19.**-Árbol genealógico de la familia M-9. Análisis del exón 13 mediante SSCP de toda la familia y un control.



**Figura 20.-** Análisis de la secuencia del exón 13 en un afectado de la familia M-9. La flecha señala el cambio de una G por una A.

#### **4.1.4 CARACTERIZACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN $\beta$ -PDE**

A lo largo del estudio de este gen además de encontrar patrones electroforéticos anormales indicando cambios de conformación en los fragmentos analizados que se debían a mutaciones, también nos hemos encontrado patrones electroforéticos que se debían a polimorfismos en la secuencia analizada.

Los patrones anormales debidos a la existencia de un polimorfismo aparecen tanto en individuos controles sanos como afectados y no estan asociados a la enfermedad.

Una variante en la secuencia de ADN se identifica cuando:

- 1- Esta variante se observa tanto en individuos afectados como en individuos control.
- 2- No altera la proteína sintetizada

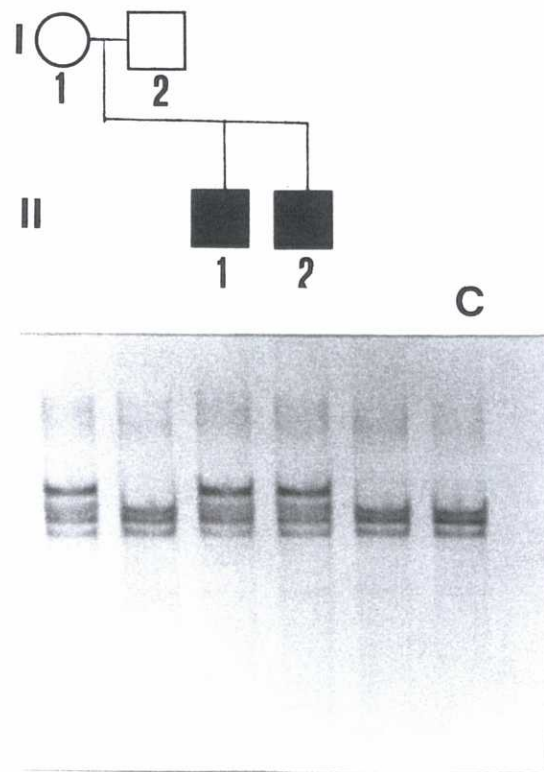
Los polimorfismos que se describen a continuación, cumplen ambos requisitos.

##### **4.1.4.1 POLIMORFISMO EN EL INTRÓN 6**

En la figura 21 se muestra el patrón en SSCP del exón 6, de una familia portadora de este polimorfismo, en donde se observa una migración electroforética característica.

Al analizar el exón 6 del gen de la PDEB mediante SSCP, las muestras pertenecientes a la familia V-3 se observó la presencia de una banda adicional en la madre y los dos hijos afectados (Figura 21).

Las muestras 2,5,6 corresponden al patrón normal, mientras que las muestras 1,3,4 poseen dicho polimorfismo.



**Figura 21:** Patrón del SSCP correspondiente al exón 6 en la familia V-3. Se observa un patrón distinto para las muestras de los dos afectados en esta familia y en su madre en comparación con los patrones normales y el padre.

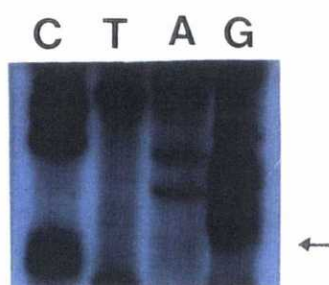
Una vez realizada la secuenciación del fragmento correspondiente al exón 6 tanto para un individuo con patrón anormal en SSCP como para un individuo control se observó que existía una transversión de una citosina a una guanina a 31 pares de bases más allá del extremo 3' sitio dador del exón 6, es decir en el intrón 6 (Figura 22). La situación de este polimorfismo en el interior del intrón no tiene evidentemente repercusión en la estructura de la proteína sintetizada.

Este polimorfismo había sido descrito por Riess y cols. (1992), obteniendo las siguientes frecuencias: 15% citosina, 85% guanina.

Para confirmar dichas frecuencias la población española se estudiaron un total de 36 cromosomas de individuos normales, observándose que 4 cromosomas presentaban una citosina, mientras que 32 presentaban una guanina. Las frecuencias del polimorfismo son las siguientes:

- Presencia de citosina 11%
- Presencia de guanina 89%

Las frecuencias observadas en este estudio concuerdan con los datos obtenidos en por el grupo de Riess.



**Figura 22:** Secuenciación de una muestra con patrón anormal en SSCP en el exón 6.

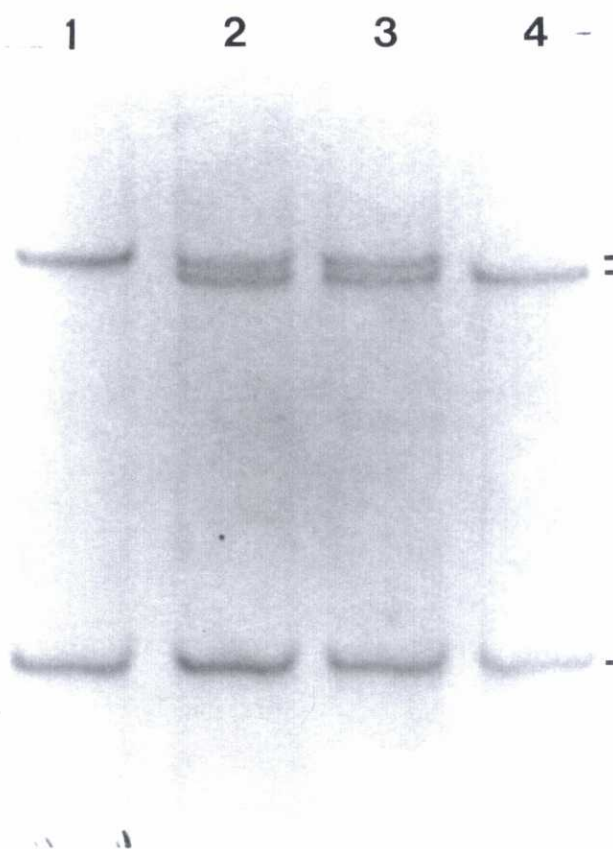
#### **4.1.4.2 POLIMORFISMO EN EL EXTREMO 3' NO TRADUCIDO DEL GEN**

Al analizar, de forma sistemática, el exon 22 mediante SSCP, se observó, a menudo, el patrón que se muestra en la Figura 23.

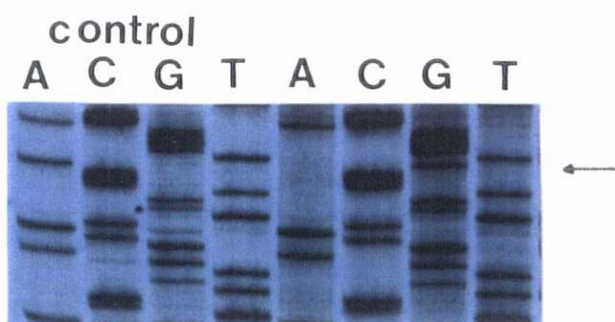
La secuenciación del exón 22 del gen PDE $\beta$  de las muestras 1 y 4 de dicha figura, evidenció un polimorfismo situado en la región no traducida del extremo 3', consistente en el cambio de una adenina (alelo 1) por una guanina (alelo2) en posición 3055 según la secuencia publicada por Weber y cols (1991) (Figura 24).

En la Figura 23, la muestra 1 corresponde a un individuo homocigoto para el alelo 1, las muestras 2 y 3 corresponden a individuos heterocigotos (alelo 1 y 2), mientras que la muestra 4 corresponde a un homocigoto para el alelo 2.

Este polimorfismo había sido descrito por Collins y cols (1992), pero no se conocían las frecuencias alélicas del mismo. Con el fin de averiguar dichas frecuencias en población española, se procesaron un total de 73 cromosomas no relacionados. Los resultados obtenidos (alelo 1: 41%; alelo 2: 59%) indican que se trata de un polimorfismo frecuente en la población estudiada.



**Figura 23:** Patrón electroforético hallado en el análisis del exón 22 del gen PDE $\beta$



**Figura 24:** Secuenciación de una muestra con patrón anormal en el análisis del exón

22.

#### **4.1.5 RESULTADOS GLOBALES DEL ESTUDIO DEL GEN PDE $\beta$**

En el estudio del gen PDE $\beta$  en las 45 familias que abarca este trabajo (29 familias consanguíneas y 16 no consanguíneas), se pudo excluir la implicación de este gen a través de los estudios de homocigosidad en el 83% de las familias consanguíneas y a través del análisis de ligamiento en el 75% de las familias no consanguíneas.

Del total de familias, en el 11% de las familias consanguíneas y en el 9% de las familias no consanguíneas, se procedió a la búsqueda de mutaciones en el gen PDE $\beta$ . Se identificaron mutaciones en el 10% de las familias consanguíneas analizadas y en el 25% de las familias no consanguíneas se hallaron polimorfismos.

En el presente estudio se han identificado tres mutaciones en el gen PDE $\beta$ , correspondiendo al 6,6% de las familias analizadas.



## **4.2 ESTUDIO DEL GEN IRBP**

### **4.2.1 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE MARCADORES EN EL GEN IRBP**

Los resultados del estudio de ligamiento así como los del estudio de homocigosidad, presentan en las tablas 11 y 12.

Los resultados se han codificado de la siguiente manera:

- **C**, cosegregación, indicaría que existe un haplotipo que se hereda asociado con la enfermedad.

- **H**, homocigosis, indicaría la existencia de homocigosidad en la zona de estudio.

- **ECH**, exclusión de la familia en estudio debido a la falta de cosegregación de un haplotipo con la enfermedad y por falta de homocigosis en la zona de estudio.

- **EH**, exclusión por falta de homocigosidad en la zona de estudio.

- **EC**, exclusión por falta de un haplotipo que se herede asociado a la enfermedad.

- **NoI**, el resultado del estudio de los haplotipos no nos revelaba ninguna información.

FAMILIA	MspI	Bgl II	ESTUDIO
B-2	NoI	EC	EXCLUIDA
B-3	CH	ECH	EXCLUIDA
B-4	EH		
B-5	CH	NoI	NO EXCLUÍDA
B-14	EH		EXCLUIDA
B-15	CH	CH	NO EXCLUÍDA
B-22	EH		EXCLUIDA
B-27	EC		
B-48	CH		NO EXCLUÍDA
E-1	EH		EXCLUIDA
E-2	50%I	50%I	NO EXCLUÍDA
E-3	CH	CH	NO EXCLUÍDA
M-9	EC		
M-24	ECH		EXCLUIDA
M-33	ECH		EXCLUIDA
M-35	ECH		EXCLUIDA
M-42	NoI	NoI	NO EXCLUÍDA
M-43	EH		EXCLUIDA
M-52	EH		EXCLUIDA
M-161	ECH		EXCLUIDA
M-180	CH	NoI	NO EXCLUÍDA
M-201	ECH		EXCLUIDA
I-1	ECH		EXCLUIDA
P-1	EH		EXCLUIDA
V-1	EH		EXCLUIDA
V-2	C		NO EXCLUÍDA
V-5	EH		EXCLUIDA
V-7	No I	NoI	NO EXCLUÍDA

Tabla 11. Resultados en las familias consanguíneas

FAMILIAS	MspI	Bgl II	ESTUDIO
B-6	C		NO EXCLUÍDA
B-26	C		NO EXCLUÍDA
M-11	EC		EXCLUIDA
M-12	No I		NO EXCLUÍDA
M-40	EC		EXCLUIDA
M-56	50%I		NO EXCLUÍDA
M-68	50%I	50%I	NO EXCLUÍDA
M-71	EC		EXCLUIDA
M-131	C	NoI	NO EXCLUÍDA
M-141	EC		EXCLUIDA
M-150	NoI	NoI	NO EXCLUÍDA
M-231	NoI	NoI	NO EXCLUÍDA
M-235	NoI	NoI	NO EXCLUÍDA
V-3	NoI	NoI	NO EXCLUÍDA
V-4	NoI	NoI	NO EXCLUÍDA
B-50	EC		EXCLUIDA

**Tabla 12.** Resultados en las familias no consanguíneas.

Al aplicar los criterios de selección a las familias españolas de ARRP incluidas en este estudio, se evidenció que:

-en 5/29 familias consanguíneas existía homocigosidad en la región genómica analizada.

-en 1/29 familias consanguíneas se demostraba cosegregación de los marcadores y la enfermedad, a pesar de no existir homocigosidad.

-en 3/29 familias consanguíneas, los marcadores empleados no resultaron informativos.

-en 20/29 familias consanguíneas el análisis de homocigosidad permitía excluir el compromiso de gen IRBP.

-en 3/16 familias no consanguíneas se demostraba cosegregación entre los marcadores y la enfermedad.

-en 8/16 familias no consanguíneas los marcadores resultaron no informativos.

-en 5/16 familias no consanguíneas la falta de cosegregación permitía excluir el compromiso del gen IRBP.

#### **4.2.2 RESULTADOS DEL ESTUDIO MEDIANTE SSCP EN EL GEN IRBP**

De las 29 familias consanguíneas, se pudo excluir mediante el estudio de homocigosidad de los marcadores intragénicos un 69%. Se procedió al estudio mediante SSCP de las siguientes familias : B-5, B-15, B-48, E-2, E-3, M-42, M-180, V-2, V-7.

De las 16 familias no consanguíneas, los estudios de ligamiento permitió excluir un 31% de las familias. Se procedió al estudio mediante SSCP de las siguientes : B-6, B-26, M-12, M-56, M-68, M-131, M-150, M-231, M-235, V-3, V-4.

Se analizaron mediante SSCP 8 fragmentos, que cubrían toda la región codificante del gen IRBP, en los casos índices de cada una de las familias señaladas anteriormente. Únicamente en el probando de la familia B-5 se observó un patrón electroforético distinto en SSCP correspondiente al extremo 3' del exón 1.

#### **4.2.3 CARACTERIZACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN IRBP**

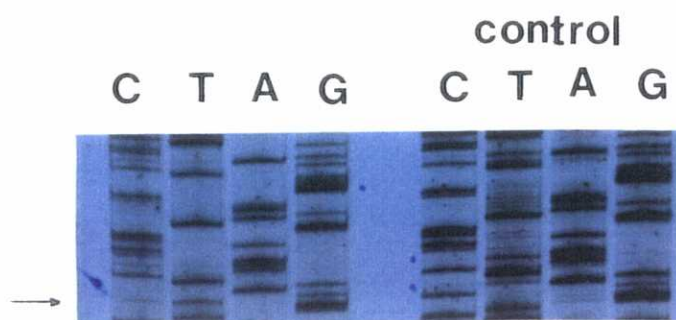
En el último fragmento de amplificación correspondiente al extremo 3' del exón 1 se observó un patrón electroforético anómalo en la madre y el hijo afectado de la familia B-5 (Figura 25).

El estudio adicional de 40 individuos no relacionados, se constató la presencia de esta variación en el 5% de los cromosomas analizados.

Los resultados de la secuenciación de la muestra correspondiente al individuo afectado en la familia B-5, revelaron una transición de una citosina a una timina en el nucleótido 3024 de la secuencia genómica, este cambio no variaba la secuencia puesto que afectaba al tercer nucleótido de un codón que codifica para el aminoácido Serina en la posición 1008, sería una mutación silenciosa (Figura 25).



**Figura 25:** Patrón anormal de SSCP del exón 1 de IRBP y secuenciación de una muestra con patrón anómalo.



***DISCUSIÓN***

## **5.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA RETINOSIS PIGMENTARIA EN ESPAÑA**

En la Retinosis Pigmentaria se ha descrito la existencia de un elevado porcentaje de casos esporádicos junto a los tres tipos de herencia mendeliana simple (dominante, recesiva y ligada al cromosoma X) (Fishman, 1978).

La proporción de casos en cada tipo genético en la RP varía según los autores consultados (Tabla 1). Estas diferencias podrían atribuirse al hecho de que la RP puede presentarse con un cuadro clínico muy amplio según la edad de diagnóstico y además, en estadios avanzados de la enfermedad, el diagnóstico diferencial entre las distintas degeneraciones retinianas no es siempre posible.

La variabilidad en la expresión fenotípica de la enfermedad puede atribuirse a distintos mecanismos. En primer lugar se ha postulado la existencia de genes moduladores o factores ambientales (cantidad de luz recibida, alimentación, etc) que modificarían la expresión de una misma mutación (Berson y cols. 1991). Ocurre también que mutaciones en un mismo gen pueden tener manifestaciones clínicas diferentes: es lo que se denomina heterogeneidad alélica. Por último, la posibilidad de que mutaciones en distintos genes tengan una expresión fenotípica muy similar (heterogeneidad genética) ha sido ampliamente documentada (Rosenfeld y cols 1994).

Se han observado también diferencias en el tipo de mutación y en su distribución entre distintos grupos étnicos. La mutación Pro-23-His en el gen de la rodopsina aparece en el 15% de pacientes americanos afectados de ADRP, mientras que estudios realizados en otras regiones europeas no reportan la presencia de esta mutación (Farrar y cols. 1990) (Dryja y cols. 1990). Se ha postulado que la prevalencia de esta mutación podía ser el resultado de un efecto fundador en los EEUU.

En nuestro estudio, (Ayuso y cols 1995) se muestran las frecuencias halladas en la población española de los diferentes tipos genéticos, observándose que existe una alta



proporción de familias con RP recesiva (39%) posiblemente debido a la alta consanguinidad existente en la población española (Tabla 1).

El porcentaje de casos de XLRP oscila entre el 2 y el 9% en las poblaciones estudiadas, exceptuando los datos referentes a Francia (Kaplan y cols 1990) e Inglaterra (Bundey y cols.1984)(Jay 1982) que muestran una mayor proporción de casos con herencia recesiva ligada al cromosoma X. En España, los porcentajes observados en dos estudios diferentes aportan unos resultados muy similares (Tabla 1).

Con respecto a la herencia autosómica dominante, existen grandes diferencias entre los porcentajes reportados por los distintos autores. Los dos grupos de pacientes españoles analizados muestran frecuencias similares de casos con ADRP (Tabla 1).

Las formas esporádicas de RP representan mas del 40% en la población española. Cabe la posibilidad de que un número no determinado de casos de RP considerados como casos esporádicos puedan ser, en realidad, afectados que han heredado la enfermedad de padres asintomáticos (herencia recesiva). Este hecho podría haber ocurrido en familias con fratrias de pequeño tamaño, de manera que no se hubiesen documentado mas individuos afectados al existir un número muy bajo de hermanos.

En España y si se consideran únicamente las familias de RP en las que existe una historia familiar de la enfermedad, la herencia autosómica recesiva es, con mucho, la forma mas frecuente (67%). Las familias con patrón de herencia autosómica dominante representan el 26%, mientras que la transmisión recesiva ligada al cromosoma X ocurre en el 7% de las familias españolas (Tabla 1).

## **5.2 ESTRATEGIAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA GENESIS DE LA RETINOSIS PIGMENTARIA AUTOSÓMICA RECESIVA**

Existen varias estrategias convencionales para la identificación de genes:

- i) Clonaje funcional. Se emplea cuando se conoce el producto del gen o su función y la purificación de la proteína permite, mediante diferentes estrategias, identificar el gen.
- ii) Clonaje posicional. Se basa en el aislamiento del gen cuando se conoce únicamente su localización en el genoma. Es una tarea muy laboriosa que ha facilitado el clonaje de genes humanos de gran relevancia biológica (gen de la distrofina, gen CFTR).
- iii) Estrategia de estudio de genes candidatos. Se plantea su utilización cuando:
  - a) el fenotipo de la enfermedad corresponde a otro fenotipo similar en animales y se conoce el gen o genes implicados en el modelo animal.
  - b) la información de su función bioquímica sugiere que el gen en cuestión forma parte de una familia de genes.
  - c) existe un gen clonado cuya producto pueda estar relacionado con la patología en estudio.

La estrategia utilizada en este trabajo se ha basado en el análisis de genes candidatos. Se han seleccionado, de entre los genes ya clonados, aquellos que codifican proteínas implicadas en la fototransducción y en el metabolismo de la vitamina A: la subunidad beta de la fosfodiesterasa (fototransducción) y proteína de unión al retinoide intersticial (metabolismo de la vitamina A).

Para la elección de estos genes candidatos se consideraron los siguientes puntos:

- i) la existencia de modelos animales con degeneración retiniana relacionada con estos genes.
- ii) El conocimiento de su localización cromosómica precisa y de su estructura genómica.
- iii) La existencia de polimorfismos en el locus correspondiente y/o en el interior del gen.

En las familias consanguíneas se han utilizado los criterios de homocigosidad para determinar si el gen candidato está involucrado en la enfermedad. En familias no consanguíneas se ha analizado la cosegregación del polimorfismo marcador con la enfermedad (Apartado 3.3).

Las enfermedades recesivas raras se manifiestan en la descendencia de padres consanguíneos porque los individuos afectados han heredado dos copias defectivas de un ancestro común. Smith (1953) ya había señalado que la descendencia afectada de matrimonios consanguíneos debían de ser homocigotos para los marcadores cercanos al locus responsable de la enfermedad. La observación de homocigosidad en marcadores polimórficos ligados constituye una evidencia de homocigosidad por descendencia en estas personas afectadas de familias consanguíneas. En este trabajo se ha analizado la homocigosidad en las regiones genómicas en las que se ubican los genes candidatos en estudio (Apartado 3.3.1).

En este trabajo se han procesado, siguiendo esta metodología, un total de 45 familias de Retinosis Pigmentaria con un patrón de herencia autosómico recesivo. En las 29 familias consanguíneas, los estudios efectuados evidenciaron la existencia de homocigosidad en la región genómica que contiene el gen PDE $\beta$  en 5 de ellas (Familias:

B-4, B-27, M-9, V-7 y B-48) . En el grupo de 16 familias no consanguíneas, se demostró cosegregación de los marcadores analizados y de la enfermedad en 4 de ellas (Familias M-71, V-3, M-12 y B-50). Estos resultados identifican aquellas familias en las que es altamente probable que las anomalías en el gen PDE $\beta$  sean las responsables del desarrollo de la Retinosis Pigmentaria y, representan, por lo tanto, un material de estudio seleccionado para la búsqueda de mutaciones en este gen.

Un repaso de la literatura nos ha permitido constatar que un abordaje de este tipo para la selección de familias previo a la búsqueda de mutaciones había sido realizado en uno de los trabajos que reportan mutaciones en este gen. Si se considera la magnitud del esfuerzo necesario para el estudio de un gen de gran tamaño, como es el gen PDE $\beta$ , está plenamente justificado emplear un método capaz de seleccionar previamente las familias susceptibles de análisis.

### 5.3 EL GEN PDE $\beta$

Siguiendo con los criterios expuestos en el Apartado 5.2, el gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la enzima fosfodiesterasa tiene las características que se detallan a continuación:

-Existen modelos animales de degeneración retiniana. En 1990 Bowes y cols. describieron una cepa de ratones denominada rd (retinal degeneration), que eran defectivos para el gen PDE $\beta$  homólogo murino. Más tarde, en 1993, Suber y cols. describieron una mutación sin sentido en el exón 21 del gen de la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa en perros setter irlandeses afectados de una displasia de bastones/conos.

-El gen PDE $\beta$  humano se había clonado en 1991 (Weber y cols), existiendo una alta homología entre las secuencias de los genes en ratón. La estructura del gen estaba definida por 22 exones y estaba situado en 4p16 (Apartado 1.7.1).

-Se dispone de marcadores polimórficos del tipo microsatélite en regiones genómicas adyacentes al locus PDE $\beta$ : en las regiones D4S127 y D4S111. (Apartado 3.3.2.1) y dentro del propio locus D4S227.

Hasta el momento se han descrito 13 mutaciones en este gen, incluyendo las tres identificadas en este estudio. En 12 de ellas el fenotipo resultante es una Retinosis Pigmentaria, existiendo una mutación que se manifiesta como una ceguera nocturna congénita estacionaria (Tabla 3).

Siete de estas mutaciones han sido descritas por el grupo de McLaughlin en 1993 y 1995 (Tabla 3). Tres de ellas (Glu298X, Arg531X, Lys706X) son mutaciones sin sentido que dan lugar a un codón stop y por tanto a una proteína truncada. Dos de las mutaciones descritas por estos autores son de sentido erróneo que tienen como consecuencia el cambio de un aminoácido por otro en la proteína sintetizada (Leu527Pro, His557Tyr). Encuentran también una delección de un par de bases que dá lugar al corrimiento de la pauta de lectura y que genera un codón de parada prematuro en el aminoácido 574. Por último describen una mutación que crea un sitio de "splicing" alternativo en el extremo donante del intrón 18. Esta mutación podría influir de varias maneras en la estructura de la proteína, produciendo la eliminación de un exón o incluyendo un intrón en el ARN mensajero.

Dancinger y cols., en 1995, publican tres nuevas mutaciones (Tabla 3). La primera corresponde a una delección de un par de bases (His620) que al desplazar la pauta de lectura genera un codón de parada. La segunda es una mutación de sentido erróneo (Gly576Asp) y la tercera mutación descrita por este grupo es una mutación puntual que altera el lugar de "splicing" en el intron 2, produciendo la pérdida del exón 3.

Existen tres grupos de investigadores (Riess y cols. 1992, Mclaughlin y cols. 1993,1995, Dancinger y cols.1995) que han realizado el estudio de mutaciones en el gen PDE $\beta$  en familias afectadas de RP y tan solo el grupo de Dancinger y cols ha seleccionado las familias previamente. En estas familias, en las que no se documenta la existencia de consanguinidad, se han encontrado en heterocigosis las mutaciones anteriormente comentadas. Hecho que apoya la validez del escrutinio previo realizado en las familias españolas.

Las nuevas mutaciones en el gen PDE $\beta$  identificadas en el presente estudio han sido tres, todas ellas detectadas en pacientes con ARRP pertenecientes a familias consanguíneas. En los tres casos, los afectados eran homocigotos para la mutación, como cabría esperar en este tipo de genealogías. A continuación se comentan las características de estas tres mutaciones.

#### **-Nuc 260 71 pb ins.: Familia B-4**

El afecto en esta familia es un varón de 39 años que presentaba anomalías en la de visión nocturna desde la infancia. La oftalmoscopia reveló una retina pálida, vasos retinales atenuados y depósitos de pigmento de tipo espicular. Los estudios electrofisiológicos mostraban los electrorretinogramas planos típicos de RP. En el estudio de los potenciales evocados (VECP's) que en la mayoría de los casos están atenuados y desorganizados, en este caso estaban organizados pero atenuados y retardados.

A nivel molecular encontramos una inserción de 71pb que da lugar a una duplicación en tandem. El punto de inicio del fragmento duplicado se encuentra entre el segundo y el tercer nucleótido en el codon 80. Esta duplicación produce un corrimiento de la pauta de lectura, dando lugar a un codon de parada prematuro en la

posición 213. Tal y como se muestra en la figura 16 el fragmento de 71pb normal está flanqueado por dos repeticiones directas de 6pb (CGGCGC) lo que sugiere que el mecanismo por el cual la duplicación ha podido ocurrir es un entrecruzamiento desigual.

El entrecruzamiento desigual ocurriría entre el nucleótido 571 adyacente al extremo 5' del segundo fragmento repetido y el nucleótido 499 flanqueante al extremo 5' del primer fragmento repetido. Los productos resultantes consistirían en un alelo con una duplicación en tandem y otro alelo en el que aparece una delección de 71pb.

Este alelo mutante no debe de ser funcional puesto que dará lugar a una proteína que ha perdido los dominios catalítico y no catalítico de unión al GMPc.

#### **-Leu699Arg: Familia B-27**

Las dos pacientes (VI.2 y VI.3) de esta familia presentaban en el estudio clínico las características típicas de RP. En esta familia se constata un cierto grado de heterogeneidad clínica entre las dos hermanas afectadas, ya que la mayor de ellas (VI-2) con 35 años, presentaba ausencia de visión nocturna desde la infancia, mientras que en la hermana menor (VI-3) con 33 años, este signo se ponía de manifiesto en la adolescencia.

La oftalmoscopia reveló un epitelio retiniano hipopigmentado con vasos retinales atenuados y depósitos de pigmento en la periferia en ambas hermanas. Los estudios electroretinográficos para VI-2 aparecían planos con luz azul y con valores normales en condiciones fotópicas y para VI-3 aparecía una pequeña respuesta con luz blanca en el ojo derecho mientras que, en el izquierdo estaba abolido. El estudio de los potenciales evocados (VEPC's) en respuesta a flashes de luz blanca en ambas hermanas, estaban atenuados y con períodos de latencia largos.

A nivel molecular se evidenció una transversión de una Timina a una Guanina en posición 2117 que daba lugar a el cambio de un aminoácido Leucina (aminoácido hidrofóbico neutro) por una Arginina (aminoácido hidrofílico cargado) en el codón 699 de la proteína madura. Este residuo está conservado en la secuencia del gen homólogo en ratones (Collins y cols.1992). La localización de esta mutación en centro catalítico de la proteína (codones 555-790) señala que esta mutación podría ser la causa de la enfermedad en esta familia, produciendo un cambio en la estructura proteica que impidiese su correcta actuación en la hidrólisis de GMPC.

**-Arg552Gln: Familia M-9.**

El estudio clínico de los dos afectados en esta familia (II-1 y II-2) de 39 y 31 años respectivamente, resultó típico de una RP. En ambos casos el fondo de ojo se presentaba con vasos retinianos atenuados y con depósitos de pigmento característicos. Los ERG estaban abolidos en ambos ojos en ambos pacientes.

El análisis del gen reveló una transición de una Guanina a una Adenina en posición 1656 provocando un cambio en el codón 552 de un aminoácido hidrofílico con carga positiva (Arginina) por un residuo polar neutro (Glutamina). Este residuo, adyacente al dominio catalítico de la proteína (aminoácidos 555-790), está conservado en la secuencia murina, por lo tanto un cambio en la estructura podría afectar a la función de la proteína.

El análisis de 50 individuos control no relacionados (100 cromosomas) ha demostrado que estos tres cambios descritos no aparecen en esta muestras, descartando la posibilidad de que se traten de variantes polimórficas no relacionadas con el desarrollo de la Retinosis Pigmentaria.



El descenso de actividad de la proteína PDE $\beta$  y el correspondiente aumento de los niveles de GMPc se ha documentado en los dos modelos animales: el ratón con fenotipo rd (con degeneración retiniana) y en el perro setter irlandés (con una displasia de bastones/conos). Se ha postulado que las elevadas concentraciones de GMPc son deletéreas para los fotorreceptores (Lolley y cols. 1977), pero el mecanismo exacto que lleva a los fotorreceptores a la degeneración no se conoce.

Cabe plantear la hipótesis de que un mecanismo idéntico o muy similar ocurra en el hombre: una deficiencia en la actividad de la proteína PDE $\beta$  daría como resultado un aumento en la concentración de cGMP y este aumento tendría como consecuencia la muerte celular de los fotorreceptores.

Las mutaciones descritas en el gen de la PDE $\beta$  producen una disrupción de la función enzimática de la proteína sintetizada que da lugar a una deficiencia en su actividad. Este hecho sería, pues, el punto de arranque del proceso de apoptosis de los fotorreceptores.

Las mutaciones sin sentido y las deleciones identificadas en el gen PDE $\beta$  (Tabla 3) dan lugar a proteínas que carecen del dominio catalítico. Las mutaciones de pérdida de sentido repercuten, en su gran mayoría, en la estructura del centro catalítico de la proteína, produciendo un cambio en la estructura de la misma capaz de alterar su función en la vía metabólica de la fototransducción. Se predice que como resultado de las mutaciones puntuales que involucran los puntos de "splicing" del gen PDE $\beta$  (Tabla 3), se producen unas moléculas de RNA mensajero aberrantes que generan unos productos proteicos disfuncionales.

En el caso de las mutaciones presentadas en este trabajo, la primera es una inserción que genera un codón de parada que da lugar a una proteína truncada. Esta proteína truncada no es funcional puesto que carece del dominio catalítico y de los dominios de unión al GMPc.

En el caso de la segunda mutación presentada, el cambio producido en la estructura primaria conllevaría una alteración en la conformación de la proteína a nivel del centro catalítico capaz de disminuir la actividad enzimática de la PDE $\beta$ . De una forma similar se interpreta la expresión fenotípica resultante de la tercera mutación descrita en este trabajo: el cambio de un residuo aminoacídico en una zona adyacente al centro catalítico de la proteína.

Existen descritos en la actualidad más de 13 polimorfismos en este gen que no cosegregan con la enfermedad. En este estudio se presentan dos polimorfismos hallados en la población estudiada que ya habían sido descritos por Riess y cols, y Collins y cols. y que nos han servido como marcadores intragénicos para seguir la herencia de este gen a través de la familia.

Las frecuencias halladas en estos polimorfismos nos indican que el polimorfismo situado en el intrón 6 es poco informativo con un valor PIC de 0.17 (Información contenida en el polimorfismo) y las frecuencias halladas en nuestro estudio concuerdan con las publicadas por Riess y cols. El polimorfismo situado en el extremo 3' es mucho más informativo su PIC es de 0.36 y las frecuencias obtenidas en este estudio no habían sido descritas por ningún otro grupo.

En 1994, Gal y cols describieron una mutación en el gen PDE $\beta$  (Figura 27) que no daba lugar a una RP, sino a una ceguera nocturna congénita estable. La mutación se presenta con una herencia dominante y se trata de un cambio de una Histidina por una Asparagina en el codón 258 que se han conservado a lo largo de la evolución de las fosfodiesterasas, indicando un papel importante de esta parte del polipéptido en la función de la proteína.

Esta mutación está situada adyacente al dominio donde teóricamente la subunidad  $\beta$  interactúa con la subunidad  $\gamma$ , que específicamente inhibe la subunidad  $\beta$ .

El mecanismo planteado mediante el cual esta mutación da lugar a este tipo de ceguera y no a una Retinosis Pigmentaria es el siguiente: esta mutación impediría la completa inactivación de la subunidad  $\beta$  por parte de la subunidad  $\gamma$  en los fotorreceptores adaptados a la oscuridad. Dado que los afectados presentan un sólo alelo con el gen de la PDE $\beta$  normal, aproximadamente un 50% de las moléculas de PDE serían mutantes y no serían capaces de asociarse con la subunidad inhibitoria  $\gamma$  o se asociarían de manera muy frágil. Así una cantidad significativa de PDE estaría parcialmente activa y mantendría bajos los niveles de cGMP en la oscuridad. Como consecuencia los canales catiónicos de cGMP se mantendrían cerrados en la oscuridad, los bastones estarían permanentemente hiperpolarizados e incapaces de volver al estado de despolarización y por tanto incapaces de responder a la luz. El resultado de esta insensibilidad es la incapacidad de realizar el proceso de transducción visual con niveles bajos de luz y por tanto ocasionaría una ceguera nocturna. Si la acumulación de cGMP es deletérea para las células fotorreceptoras, unos niveles bajos de cGMP en la oscuridad no afectan al metabolismo normal de los fotorreceptores, lo que explicaría la ausencia de distrofia de retina en pacientes afectados con esta enfermedad.

Se ha visto que ratones, perros y humanos heterocigotos para las mutaciones de PDE $\beta$  que dan lugar a una Retinosis Pigmentaria gozan de buena visión a pesar de tener la mitad de los valores normales de PDE $\beta$ . Esto indica que la patología en el caso de mutaciones recesivas dan lugar a una pérdida de función (Bennett y cols. 1995).

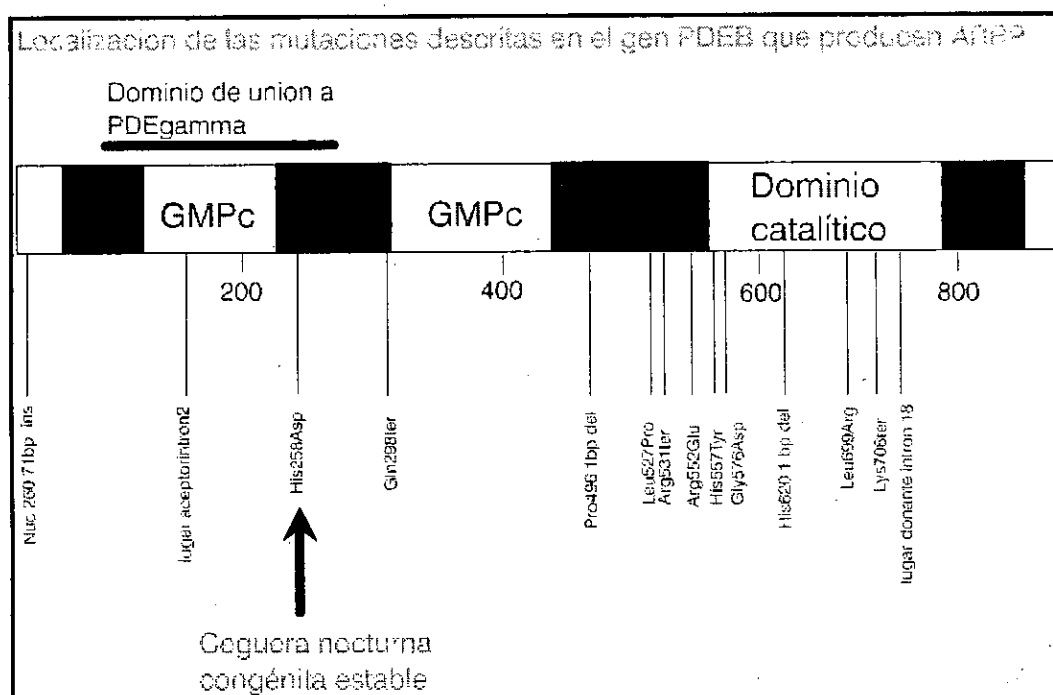
Es interesante tener en cuenta que también en el gen de la rodopsina han sido descritas mutaciones responsables de RP y también dos mutaciones (G90D,Ala292Glu) que en heterocigosis dan lugar a una ceguera nocturna congénita estable.

**Comparación con otros estudios**

En el grupo de las 45 familias estudiadas españolas, el gen PDEβ es el responsable de la patología en el 6,6% de los casos.

En los estudios llevados a cabo por McLaughin (1995), en donde, de 92 pacientes se encontraron mutaciones en el gen PDEβ en 4 de ellos, este gen era responsable en un 4,3% de los casos. Dancinger (1995) estudiando 24 familias encuentran mutaciones en este gen en dos de ellas, esto supone un 8,3%.

Por lo tanto los porcentajes obtenidos en nuestro estudio están dentro del rango de los descritos por otros grupos. Las mutaciones en este gen son las responsables de la enfermedad en un 4,3-8,3% de las familias estudiadas.



**Figura 27.** Localización de las mutaciones halladas en el gen de la subunidadβ de la PDE.

#### 5.4 ESTUDIO DEL GEN IRBP

Siguiendo los criterios expuestos en el Apartado 5.2, el gen que codifica para la proteína de unión al retinide intersticial (IRBP) tiene las siguientes características:

-La actividad de esta proteína ha sido estudiada en diferentes especies animales. En mutantes "eya" de *Drosophila* (mutación de ojos ausentes) se ha observado que no existe actividad (Kutty y cols. 1991). En 1991 Wiggert y cols. observaron que una disminución de la actividad de esta proteína se correlacionaba con la pérdida de células fotorreceptoras en perros de lana con una degeneración de bastones-conos. En 1994, el mismo grupo, observaron una disminución de los niveles de proteína y de RNAm en gatos abisinios con una degeneración de conos y bastones un año antes del desarrollo de síntomas clínicos.

-El gen humano había sido localizado en el cromosoma 10 (Liou y cols 1987) en 10q21.1 (Nickerson y cols. 1991). Se conocía la estructura del gen con cuatro exones, siendo el primer exón de este gen uno de los más grandes descritos con 3.2Kb (Apartado 1.7.2). La estructura de la proteína IRBP tanto en humanos como en bovinos había sido ya descrita en el año 1989 (Borst y cols, Liou y cols.).

-Se habían descrito polimorfismos de restricción intragénicos (Wu y cols 1991) (Humphries y cols 1991). Un esquema de la localización de estos marcadores se muestra en la Figura 14 del Apartado(3.3.2.2).

-Diversos autores (Adler 1982, Bunt-Milam 1983, Pfeffer 1983, Okajima y cols 1990, 1992) habían constatado que la proteína IRBP era el componente mayoritario de la matriz interfotorreceptora, que parecía ser esencial en la regeneración de la rodopsina y que facilitaba el transporte de retinoides desde la retina al epitelio retiniano.

Un único trabajo, publicado en forma de comunicación (McGee y cols. 1992) ha planteado el estudio de este gen y su implicación en el desarrollo de una Retinosis Pigmentaria. Los autores analizaron la secuencia del gen IRBP en varios cientos de pacientes afectados de RP, que incluían tanto formas autosómicas dominantes como recesivas de RP, así como casos de amaurosis congénita de Leber y casos de degeneración de conos y bastones. Los resultados muestran la existencia de 6 mutaciones puntuales que, al afectar al tercer nucleótido de codón, no alteran el residuo aminoacídico codificado por dicho codón (GGC a GGA en el codón 272; ACG a ACA en el codón 279; CCC a CCT en el codón 281; GGG a GGC en el codón 287; CCG a CCA en el codón 308 y GCC a GCA en el codón 309). Además, reportan una transición G-A en el codón 282, en un individuo con RP dominante, pero este cambio no cosegrega con la enfermedad. En este trabajo no se detectó ninguna mutación en el gen IRBP asociada a las diversas patologías analizadas.

Al aplicar los criterios de selección a las familias españolas de ARRP incluidas en este estudio, se evidenció que 6 familias consanguíneas y 3 familias no consanguíneas cumplían los requisitos (homocigosidad y/o cosegregación) necesarios para continuar el análisis del gen IRBP y la búsqueda de mutaciones en el mismo. Estos análisis se hicieron extensivos a 11 familias adicionales en las que el estudio de marcadores resultó no informativo.

Los resultados del presente estudio han puesto de manifiesto una única variación en la secuencia del gen IRBP, que se ha demostrado que se trata de un polimorfismo poco frecuente (Apartado 4.2.3).

A pesar de que los estudios bioquímicos efectuados demostraron que el efecto tóxico del 11 cis retinol en los bastones se reducía en presencia de un exceso de IRBP, sugiriendo que el IRBP juega un papel importante mitigando el efecto deletéreo de los retinoides (Jones y cols. 1989), ni los datos moleculares aportados por McGee y cols en

1992, ni los resultados del presente trabajo han identificado mutaciones en el gen IRBP en pacientes afectados de Retinosis Pigmentaria o síndromes relacionados. La interpretación de estos resultados admite dos enfoques. El primero, y en base al número de muestras analizadas, parece descartar el compromiso de este gen en el desarrollo de las degeneraciones retinianas en el hombre. El segundo, en base a los datos bioquímicos y a los modelos animales que avalan dicho compromiso, mantendría al gen IRBP en la categoría de gen candidato y postularía la existencia de mutaciones en regiones no codificantes del gen (intrones y regiones promotoras) no estudiadas en la actualidad.

## **5.5 NUEVAS PRESPECTIVAS**

El desarrollo de las técnicas de genética molecular han ayudado a ampliar nuestro conocimiento sobre la base genética de las enfermedades oculares hereditarias. El conocimiento de los genes y su función en el ojo harán que la terapia génica sea un proyecto real en las patologías oculares. La existencia de modelos animales con degeneración retinal, tanto espontáneos como el ratón *rd*, que presenta mutaciones en el gen *PDEβ*, ó el ratón *rds*, con mutaciones en el gen de la periferina, y el perro setter irlandés con mutación en el gen *PDEβ*, como aquellos animales "knock out" y transgénicos nos proveen del material ideal para valorar, la eficiencia de los sistemas de transferencia génica somática y la eficacia del gen transferido en recuperar el fenotipo. Las dificultades presentadas se basan en la eficacia de los distintos vectores y la complicación observada en la respuesta inmune.

A pesar de todo, queda todavía un largo camino para la identificación de todos los genes que de alguna manera son responsables de las formas de RP, ya que no existe un gen mayoritario responsable.

La correlación fenotipo-genotipo para una clasificación clínica mejor, la investigación de los procesos patofisiológicos que tiene lugar en las enfermedades oculares identificadas hasta ahora, el desarrollo de técnicas de detección de mutaciones nos permitirá una mejor comprensión de los procesos celulares que llevan a los fotorreceptores a su degeneración. En estudios en tres modelos animales murinos incluido el ratón rd, han puesto de manifiesto la apoptosis (muerte celular programada) como vía común para diversos defectos genéticos que afectan a los fotorreceptores (Portera-Caillian y cols. 1994).



***CONCLUSIONES***

## 6 CONCLUSIONES

1.- Las frecuencias de los distintos tipos genéticos de Retinosis Pigmentaria en España son las siguientes:

con herencia autosómica recesiva 39%.

con herencia autosómica dominante 12%

con herencia ligada al cromosoma X 4%

casos esporádicos 41%

2.- Los estudios de ligamiento y/o homocigosidad han permitido excluir la implicación del gen  $PDE\beta$  en el desarrollo de la patología en el 80% de las familias ARRP estudiadas.

3.- Se han caracterizado tres nuevas mutaciones en el gen  $PDE\beta$  que, de forma homocigota, afectan a pacientes diagnosticados de ARRP pertenecientes a familias consanguíneas:

i) una inserción de 71 pares de bases en el exón 1 que produce un codon de parada.

ii) la mutación Leu699Arg que modifica el centro catalítico de la proteína.

iii) la mutación Arg553Glu situada en la zona adyacente del centro catalítico de la proteína.

4.- Se han caracterizado y analizado los siguientes polimorfismos en el gen  $PDE\beta$ :

i) polimorfismo en el intrón 6. Cambio C-T a 31 pb del extremo 3' del exón

6.

ii) polimorfismo en el extremo 3' no traducido del gen. Cambio A-G en posición 3055.

5.- Las mutaciones en el gen de la PDE $\beta$ , afectan al 6,6% de las familias.

6.- Los estudios de ligamiento y homocigosidad han permitido excluir la implicación del gen IRBP en el desarrollo de la patología en el 52% de las familias ARRП estudiadas.

7.- No se han identificado mutaciones en la región codificante del gen IRBP en las familias ARRП analizadas.

8.- Se ha caracterizado un polimorfismo intragénico en el exón 1 del gen IRBP. Se trata de una transición C a T en posición 3024, que no da lugar a un cambio de aminoácido.

9.- Las mutaciones en los dos genes candidatos estudiados (PDE $\beta$  e IRBP) no son responsables mayoritarias de la ARRП, confirmando la gran heterogeneidad genética que subyace a esta entidad.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

**-Adler AJ, Martin KJ (1982).** Retinol-binding proteins in bovine interphotoreceptor matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 108:1601-1608.

**-Al-Magtheth m., Inglehearn C.F., Keen T.J. et al.(1994).** Identification of a sixth locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19. *Hum.Mol.Genet.* 3:351-354

**-Allitto BA, Horn GT,Altherr MR,Richards B, McClatchey AI, Wasmuth JJ, Gusella JF (1991).** Detection by PCR of the VNTR polymorphism at D4S95. *Nucleic Acids Res.*19:4015.

**-Altherr MR, Wasmuth JJ, Seldin MF, Nadeau JH, Baehr W,Pittler SJ. (1992)** Chromosome mapping of the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase  $\beta$  Subunit gene in mouse and human:tight linkage to the huntington disease region (4p16.3).*Genomics* 12, 750-754.

**-Bardien S., Ebenezer N., Greenberg J., Inglehearn CF., Bartman L., Goliath R., Beighton P.,Ramesar R.,Bhattacharya S.(1995).** An eighth locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa is linked to chromosome 17q. *Hum Mol Genet.* 4:1459-1462.

**-Bascom RA., Liu L., Heckenlively JR., Stone EM.,McInnes RR. (1995)**Mutation analysis of the ROM1 gene in retinitis pigmentosa. *Hum. Mol. Genet.* 4:1895-1902.

**-Bateman J.B., Klisak I.,kojis T.et al.(1991)** Assignment of the  $\beta$  subunit of rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase gene PDEG (homolog of the mouse rd gene) to human Chromosome 4p16. *Genomics* 12:601-603.

**-Bayés M., Valverde D., Balcells S. et al.** Evidence against involvement of recoverin in autosomal recessive retinitis pigmentosa in 42 Spanish families. *Hum.Genet.* 96: 89-94 (1995)

**-Bell J:** Retinitis pigmentosa and allied diseases. In Pearson K. *Treasury of Human Inheritance*, vol II, part I. Cambridge University Press, 1922

**-Ben Hamida C., Doerflinger N., Belal S., Linder C., Reitenauer L., Dib C., Gyapay G., Vignal A., Le Paslier D., Cohen D., Pandolfo M., Mokini V., Novelli G., Hentati F., Ben Hamida M., Mandel JL., Koenig M. (1993).** Localization of Friedreich ataxia phenotype with selective vitamin E deficiency to chromosome 8q by homozygosity mapping. *Nature Genet.* 5:195-200.

**-Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Weigel-DiFranco C, Dryja TP.(1991).** Ocular findings in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa and rhodopsin, proline 347 leucine. *Am J Ophthalmol* 111:614-623.

**-Berson EL.(1993)** Retinitis Pigmentosa-The Friedenwald Lecture. *Inves. Ophthalmol. Vis Sci* 34:1659-1676.

**-Bhattacharya S., Lester D., Keen J., et al.(1991)** Retinitis pigmentosa and mutations in rhodopsin. *Lancet* 337:8734.

**-Bhattacharya S.S., Wright A.F., Claton J.F. et al. (1984).** Close genetic linkage between X-linked retinitis pigmentosa and a recombinant DNA probe L1.28. *Nature* 309:253-255.

**-Blanton S.H., Heckenlively J.R., Cottingham A.W. et al.(1991).** linkage mapping of autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP1) to the pericentromeric region of human chromosome 8. *Genomics* 11:857-869.

**-Bleeker-Wagemakers LM., Gal A.,Kumar-Singh R.,van den Born LI., Li Y., Schwinger E., Sandkuijl LA.,Bergen AAB, Kenna P., Humphries P., Farrar GJ.(1992)** Evidence for nonallelic genetic heterogeneity in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Genomics* 14:811-812.

**-Borst DE, Redmond tm, Elser JE, Gonda MA, Wiggert B, Chader GJ Nickerson JM. (1989).** Interphotoreceptor retinoid binding protein. Gene characterization, protein structure and its evolution. *J Biol Chem* 264:1115-1123.

**-Botermans CHG:**Primary pigmentary retinal degeneration and its association with neurological diseases. In Vinken PJ, Bruyn GW (eds):*Neuroretinal Degenerations*, vol 13, p 148. Amsterdam, North Holland publishing Co, 1972

**-Boughman JA, Conneally PM, Nance WE (1980).** Population genetic studies of retinitis pigmentosa. *AM. J. Hum. Genet* 32:223-235.

**-Boughman JA, Fishman GA.(1983).** A genetic analysis of retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol.* 67:449-454.

**-Bowes C, Li T, Dancinger M, Baxter LC, Applebury ML, Farber DB.(1990).** Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the  $\beta$  subunit of rod cGMP phosphodiesterase. *Nature* 347:677-680.

**-Bunker CH, Berson EL.(1984).** Prevalence of retinitis pigmentosa in Maine. *AM J Ophthalmol.*97:357-365.

**-Bunt-Milam AH, Saari JC.(1985).** Characterization of the interstitial space: immunocytochemical and biochemical studies, The interphotoreceptor matrix in health and disease (Bridges CD and Adler AJ, eds) Liss, New York, pp151-170.

**-Collins C., Hutchinson G., Kowbel D., Riccs O., Weber B. y Hayden M.R.(1992).** The human  $\beta$ -subunit of rod phosphodiesterase: complete retinal cDNA sequence and evidence for expression in brain. *Genomics* 13:698-704

**-Chen J.D., Denton M.J., Donald J- et al.** Analysis of linkage relationships of X-linked retinitis pigmentosa with the following Xp loci: DXS7, OTC, DXS84, XJ-1, DXS164 and DXS28. *Cytogenet. Cell Genet.* (1987).46:592 Only.

**-Cote RH, Bownds MD, Arshavsky VY. (1994).** cGMP binding sites on photoreceptor phosphodiesterase: Role in feedback regulation of visual transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4845-4849.

**-D'Amico JD.(1994).** Diseases of the retina. *N Engl.J. Med.*331:95-106.

**-Dancinger M, Blaney J, Gao YQ, Zhao DY, Heckenlively JR, Jacobson SG, Farber DB (1995).** Mutations in the PDEB gene in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Genomics* 30:1-7.

**-Donders FC:** Beiträge zur pathologischen Anatomie des Auges. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol* 1(ii):106-118,1855;3(i):139-165,1857.

**-Donders FC:** Torpeur de la retine congenital e hereditarie. *Ann Ocul (Paris)*34:270-273,1855.

-Dryja T.P., Li T. (1995). Molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Human Mol Genet.* 4:1739-1743.

-Dryja T.P., Hahn L.B., Cowley G.S., McGee T.L. y Berson E.L. (1991). Mutation spectrum of the rhodopsin gene among patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:9370-9374.

-Dryja T.P., McGee T.L., Hahn L.B. et al. (1990a). A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature.* 343:364-366.

-Dryja T.P., McGee T.L., Hahn L.B. et al. (1990b). Mutations in the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *N. Engl. J. Med.* 323:1302-1307.

-Dryja TP, Berson EL., Rao VR., Oprian DD (1993) Heterozygous missense mutation in the rhodopsin gene as a cause of congenital stationary night blindness. *Nature Genet.* 4:280-283.

-Farrar G.J., Jordan S.A., Kenna P. et al. Autosomal dominant retinitis pigmentosa: Localization of a disease gene (RP6) to the short arm of chromosome 6. *Genomics* (1991a). 11:870-874.

-Farrar G.J., Kenna P., Jordan S.A. et al (1990) A three base deletion in the peripherin/RDS gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 354:478-480.

-Farrall M. (1993). Homozygosity mapping: familiarity breeds debility. *Nature Genet.* 5:107-108.

-Fishman GA. (1978). Retinitis pigmentosa. Genetic percentages. *Arch Ophthalmol* 96:822-826.

-Fishman GA., Alexander KR., Anderson RJ. (1985) Autosomal dominant retinitis pigmentosa. A method of classification. *Arch. Ophthalmol* 103:366-374.

-Fong SL, Fong WB, Morris A, Kedzie KM, Bridges CDB. (1990) Characterization and comparative structural features of the gene for human interstitial retinol binding protein. *J. Biol. Chem.* 265:3648-3653.

-Fong S.L., Liou G.I., Landers R.A., Alvarez R.A. and Bridges C.D.B. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:6534-6542.



**-Fong S.L., Liou G.I., Landers R.A., Alvarez R.A., González-Fernández F., Glazebrook P.A., Lam D.M.K., and Bridges C.D.B. (1984)** *J.Neurochem.* 42 1667-1676.

**-Francke U., Ochs H.D., de Martinville B. et al. (1985)**. Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa and McLeod syndrome. *Am. J.Hum. Genet.* 37:250-267.

**-Friedrich U., Warburg M., Wicacker P. et al. (1985)**. X-linked retinitis pigmentosa: linkage with the centromere and a cloned DNA sequence from the proximal short arm of the X chromosome. *Hum. Genet.* 88:683-687.

**-Fujiki K, Hotta Y, Murakami A, Yoshii M, Hayakawa M, Nicolas MG, Takeda M, Yano H, Kishishita H, Yokoyama T, Kanai A. (1995)**. Heterozygous ASn15 Ser and Gly 174 Ser mutations in rhodopsin gene found in Japanese retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthalmmol. Vis. Sci. Suppl* S890.

**-Gal A.,et al. (1994)**. Gene for autosomal dominant congenital stationary night blindness maps to the same region as the gene for the  $\beta$  subunit of the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase in chromosome 4p16.3. *Hum. mol. Genet.* 3:323-325.

**-Gal A., Orth U., Bachr W., Schwinger E. y Rosenberg T. (1994)**. Heterozygouse missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase b subunit gene in autosomal dominant stationary night blindness. *Nature Genet.* 7:64-68.

**-González-Fernández F., Landers R.A., Glazebrook P.A., Fong S.L., Liou G.I., Lam D.M.K. and Bridges C.D.B. (1984)** *J.Cell.Biol.* 99:2092-2098.

**-Gouras P, Carr RE:** Electrophysiological studies in early retinitis pigmentosa. *Arch Opththalmol* 72:104-110, 1964

**-Greenberg J., Goliath R., Beighton P. y Ramesar R. (1994)**. A new locus for autosomal dominant reinitis pigmentosa on the short arm of vchromosome 17. *Hum Mol Genet* 3:915-918.

**-Greenberg J, Bartmann L, Ramesar R, Beighton P. (1993)**. Retinitis pigmentosa in Southern Africa. *Clin Genet* 44: 62-70.

- Grondahl J. (1987).** Estimation of prognosis and prevalence of retinitis pigmentosa and Usher syndrome in Norway. *Clin Genet* 31:255-264.
- Haim M. (1993).** Retinitis pigmentosa: problems associated with genetic classification. *Clin Genet* 44:62-70.
- Hayashi K., Yandell DW (1993).** How sensitive is PCR-SSCP?. *Hum. Mut.* 2:338-346.
- Hecklenlively JR, Martin DA, Rosales TO:** Telangiectasia and optic atrophy in cone-rod degenerations. *Arch Ophthalmol* 99:1981-1991, 1981
- Hecklenlively JR (1988).** Ewan H(ed): "Retinitis Pigmentosa". Philadelphia: JB Lippincott.
- Hecklenlively JR (1982)** Preserved paraarteriole retinal pigment epithelium(pprpe) in retinitis pigmentosa. *Br. J. Ophthalmol.* 66:26.
- Hu DN.(1987)** Prevalence and mode of inheritance of major genetic eye disease in China. *J Med Genet* 24; 584-588.
- Huang SH, Huang X, Pittler SJ, Oliveira L, Berson EL, Dryja TP. (1995).** A mutation in the gene encoding the alfa subunit of rod cGMP phosphodiesterase (PDEA) in retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci. Suppl* S825.
- Humphries P, FarrarJG, Keena P, McWilliam P.(1990).** Retinitis pigmentosa: Genetic mapping in X-linked and autosomal forms of the disease. *Clin.Genet.* 38:1-13.
- Humphries P., Kenna P., Farrar J.(1992).** On the molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Science* 256:804-808.
- Humphries P., Kenna P., Farrar J. (1994).** New dimensions in macular dystrophies. *Nature Genet.* 8:315-317.
- Imaizumi K. (1971).** Statistical investigation on retinitis pigmentosa. *Jpn J Clin ophthalmol.* 25:293-304.
- Inglehearn C.F., Keen T.J, Al-Magthteh M. et al. (1994).** Further refinement of the location for autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 7p (rp9). *Am. J. Hum. Genet.* 54:675-80.

**-Inglehearn CF., Carter SA., Keen TJ., Lindsey J., Stephenson AM., Bashir R., Al-Magtheth M., Moore AT., Jay M., Bird AC., Bhattacharya SS. (1993).** A new locus for autosomal dominant retinitis on chromosome 7p. *Nature Genet.* 4:51-53.

**-Inglehearn C.F., Keen T.J., Al-Magtheth M. et al. (1994).** Further refinement of the location for autosomal dominant retinitis pigmentosa on 7p (RP)9. *Am.J.Hum.Genet* 54:657-680.

**-Inglehearn C.F., Keen T.J.,Bashir R. et al. (1992).** A completed screen for mutations of the rhodopsin gene in a panel of patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum.Mol.Genet.* 1:41-45.

**-Jay M. (1982).** On the heredity of retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 66: 402-416.

**-Jones GJ., Crouch RK, Wiggert B., Cornwall MC.,Chader GJ.(1989).**Retinoid requirements for recovery of sensitivity after visual pigment bleaching in isolated photoreceptors.*Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 86:9606-9610.

**-Jordan SA, Farrar GJ., Kenne P. et al (1993).** Localization of autosomal dominant retinitis pigmentosa gene to chromosome 7q. *Nature Genetics* 4:54-58.

**-Kajiwara K, Hahn LB, Mukai S, Travis GH, Berson EL, Dryja TP.(1991)** Mutations in the human retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa.*Nature* 354:480-483.

**-Kajiwara K., Sandberg MA., Berson EL.,et al.(1993).** A null mutation in the peripherin/RDS gene in a family with autosomal dominant retinitis punctata albescens.*Nature Genet.*3:208-12.

**-Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP (1994)** Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science* 264:1604-1608.

**-Kaplan J., Bonneau D., Frézal J.,Munnich A., Dufier JL. (1990).** Clinical and genetic heterogeneity in retinitis pigmentosa. *Hum Genet* 85:635-642.

**-Karpe G:** The basis of clinical electroretinography. *Acta Ophthal (kbh)* 24(suppl):1-118, 1945.

**-Knowles JA, Shugart Y, Poulabi B., Gilliam TC., Lewis CA., Jacobson SG., Ott J. (1994)** Identification of a locus, distinct from RDS-peripherin, for autosomal recessive retinitis pigmentosa on chromosome 6p. *Hum Mol Genet* 3: 1401-1403.

**-Kumaramanickavel G, Maw M, Denton MJ, John S, Srisailapathy CR, Orth U, Oehlmann R, Gal A. (1994)**. Missense rhodopsin mutation in a family with recessive RP. *Nature Genet.* 8:10-11.

**-Kumar-Singh R., Farrar GJ., Mansergh F. et al. (1993)**. Exclusion of the involvement of all known retinitis pigmentosa loci in the disease present in a family of Irish origin provides evidence for a six autosomal dominant locus (rp8). *Hum. Mol. Genet.* 2: 875-8.

**-Kunkel LM., Monaco AP., Middlesworth W et al. (1985)**. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82:4778-4782.

**-Lander ES, Botstein D (1987)**. Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science* 236:1567-1568.

**-Lathrop GM., Lalouel JM. (1984)**. Easy calculations of lod scores and genetic risks on small computers. *Am. J. Hum. Genet.* 36:460-465.

**-Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C., Ott J. (1984)** Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3443-3446.

**-Liou GI, Bridges CD, Fong SL, Alvarez RA. (1982)**. Vitamin A transport between retina and pigment epithelium- an interstitial protein carrying endogenous retinol. *Vision Res* 22:1457-1467.

**-Liou GI, Ma DP, Yang YW, Geng L, Zhu C, Baehr W. (1989)**. Human interstitial retinoid binding protein. Gene structure and primary sequence. *J Biol Chem* 264:8200-8206.

**-Liou GI, Wang M, Matragoon S. (1994)**. Timing of interphotoreceptor retinoid binding protein gene expression and hypomethylation in developing mouse retina. *Develop. Biol.* 161:345-356.

**-Liou GI, Wang M, Matragoon S. (1994).** Precocious IRBP gene expression during mouse development. *Inves Ophthal Vis Sci.* 35:1083-1088.

**-Lisman J., Gordon F. (1995).** Support for the equivalent light hypothesis for RP. *Nature Med.* 12: 1254-1255.

**-Lolley RN, Farber DB, Rayborn ME, Hollyfield JG. (1977).** Cyclic GMP accumulation causes degeneration of photoreceptor cells: Simulation of an inherited disease. *Science* 196:664-666.

**-Massof RW, Finkelstein D:** Subclassifications of retinitis pigmentosa from two-color scotopic static perimetry. *Doc Ophthalmol Proc Series* 26:219-225, 1981

**-Meeks RG, Zaharevitz D., Chen F. (1981).** Membrane effects of retinoids: possible correlation with toxicity. *Arch Biochem. Biophys* 207:141-147.

**-McGee TL., Berson EL., Dryja TP. (1992).** Search of point mutations in the interstitial retinoid-binding protein gene in patients with hereditary retinal degenerations. *Invest. Ophthalmol Vis Sci.* 33 (Suppl):1396.

**-McGee TL., Lin D., Berson EL., Dryja TP. (1994).** Defects in the rod cGMP gated channel gene in patients with retinitis pigmentosa. *Inves. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35:1716.

**-McGuire RE, Sullivan LS., Blanton SH., Church MW., Heckenlively JR, Daiger SP. (1995).** X-linked dominant cone-rod degeneration :linkage mapping of a new locus for retinitis pigmentosa (RP15) to Xp22.13-p22.11. *Am. J. Hum. Genet* 57:87-94.

**-McLaughlin ME., Sandberg MA., Berson EL., Dryja TP. (1993).** Recessive mutations in the gene encoding the  $\beta$  subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nature Genet.* 4:130-134.

**-McLaughlin ME, Ehrhart TL, Berson EL, Dryja TP. (1995).** Mutation spectrum of the gene encoding the beta subunit of rod phosphodiesterase among patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:3249-3253.

**-McWilliam P., Farrar GJ., Kenna P., Bradley DG., Humphries MM., Sharp EM., McConnell DJ., Lawler M., Sheils D., Ryan C., Stevens K., Daiger SP., Humphries P.(1989).** Autosomal dominant retinitis pigmentosa: Localization of an ADRP gene to the long arm of chromosome 3. *Genomics* 5:619-622.

**-Miller SA, Dyke DD, Polesky HF (1988)** a simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 16:1215.

**-Mullis KB., Faloona FA. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155:335-350.

**-Nathans J., Hogness DS: (1984).** Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81: 4851-4855.

**-Nettleship E:** On retinitis pigmentosa and allied diseases. *Roy Lond Ophthal Hosp Rep* 17(I):1-56; (II):151-166; (III):333-427, 1907/1908

**-Nichols BE, Sheffield VC., Vandeburgh K., Drack AV., Kimura AE., Stone EM.(1993)** Butterfly shaped pigment dystrophy of the fovea caused by a point mutation in codon 167 of the RDS gene. *Nature Genet.* 3:202-207.

**- Nickerson JM, Borst DE, Redmon TM, Si JS, Toffenetti J, Chader GJ (1991).** The molecular biology of IRBP : applications to problems of uveitis, protein chemistry and evolution., en *The Molecular biology of the retina :basic and clinically relevant studies* (Farber DB, Chader GJ eds.) Wiley-Liss, New York pp 139-161.

**-Okajima TL, Pepperberg DR, Ripps H., Wiggert B., Chader GJ.(1989)** Interphotoreceptor retinoid binding protein: role in delivery of retinol to the pigment epithelium. *Exp. eye Res* 49:639-644.

**-Okajima TL, Pepperberg DR, Ripps H., Wiggert B., Chader GJ. (1990)** Interphotoreceptor retinoid binding protein promotes rhodopsin regeneration in toad photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6807-6811.

**-Orita M., Suzuki Y., Sekiya T., Hayashi K.(1989)** Rapid and sensitive detection of point mutations and ADN polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874-879.

**-Ott J., Bhattacharya S., Chen J.D. et al. (1990).** Localizing multiple X chromosome-linked retinitis pigmentosa loci using multilocus homogeneity tests. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 87:-701-704.

**-Ovelgün.** Nyctalopia haerediotria. *Acta Physico Med (Nuremburg)*7:76-77obs.28,1744.

**-Peppeberg DR, Okajima TL, Wiggert B, Ripps H, Crouch RK, Chader GJ. (1993).** Interphotoreceptor retinoid binding protein: Molecular biology and physiological role in the visual cycle of rhodopsin. *Mol Neurobiol.* 7: 61-85.

**-Pollak MR., Chou YW., Cerda JJ., Steinmann B., La Du BN., Seidman JG., Seidman CE. (1993).** Homozygosity mapping of the gene for alkaptonuria to chromosome 3q2. *Nature Genet.* 5:201-204.

**-Redmon T.M., Wiggert B., Robey F.A., Nguyen N.Y., Lewis M.S., Lee L., and Chader G.J. (1985)** *Biochemistry* 24:787-793.

**-Reig C., Liecha N., Antich J. et al. (1994).** A missense mutation (His211Arg) and a silent (Thr160) mutation within the rhodopsin gene in a Spanish autosomal dominant pigmentosa family 3:195-196.

**-Riess O, Noerremoele A, Weber B, Musarella MA, Hayden MR (1992).** The search for mutations in the gene for the beta subunit of the cGMP phosphodiesterase in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *AM. J. Hum. Genet.* 51:755-762.

**-Ringens PJ, Fang M, Shinahara T, Bridges CD, Lerea CL, Berson EL, Dryja TP (1990)** Analysis of gene encoding for S-antigen, interstitial retinol binding protein, and the alpha subunit of cone transducin in patients with retinitis pigmentosa. *Inves Ophthalmol Vis Sci* 31:1421-1426.

**-Rao VR, Cohen GB., Oprian DD. (1994).** Rodhopsin mutation g90D and a molecular mechanism for congenital night blindness. *Nature* 367: 639-642.

**-Rosenfeld PJ, McKusick VA, Amberger JS, Dryja TP. (1994).** Recent advances in the gene map of inherited eye disorders: primary hereditary diseases of the retina, choroid, and vitreous. *J.Med Genet* 31: 903-915.

**-Rosenfeld P.J., Cowley G.S., McGee T.L., Sandberg M.A., Berson E.L. y Dryja T.P.(1992).** A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nature Genet.* 1:209-213.

**-Sanger F., Nicklen S., Coulson AR.(1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Próc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.

**-Saari J.C., Teller D.C., Crabb J.W., and Bredberg L. (1985)** *J.Biol.Chem.* 260:195-201.

**-Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S., Sharf SJ., Higuchi R., Horn GT. Erlich HA (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.

**-Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. (1989)** *Molecular cloning: A laboratory manual* 2nd ed. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)

**-Sakuma H., Inana G., Murakami A., Yajima T., Weleber RG., Murphey WH., Gass DM., Hotta Y et al.(1995).** A heterozygous putative null mutation in ROM1 without a mutation in perpherin/RDS in a family with retinitis pigmentosa. *Genomics* 27:384-386.

**-Scott HS., Nelson PV., Hopwood JJ., Morris CP. (1991).** PCR of a VNTR linked to mucopolysaccharidosis type I and Huntington disease. *Nucl. Acid Res.* 19:6348.

**-Sheffield VC, Beck J, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM.(1993).** The sensitivity of single-strnd conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16:325-332.

**-Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE.** Analysis of the efficiency of single base substitution detection by SSCP . (Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1992)1-149

**-Shon M:**Handbuch der pathologischen Anatomie des menschlichen Auges, p202.Hamburg,1828

**-Sieving PA., Richards JE, Bingham EL., Naarendorp F. (1992).** Dominant congenital nyctalopia and Gly90Asp Rhodopsin mutation. *Inves Ophthal. Vis.Sci.*33:1397.



**-Suber ML, Pittler SJ, Qin N, Wright GC, Holcombe V, Lee RH, Craft CM, Lolley RN, Baehr W, Hurwitz RL (1993).** Irish setter dogs affected with *ros*/cone dysplasia contain a nonsense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta subunit gene. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 90:3968-3972.

**-Shung CH., Davenport CM., Hennessey JC. et al.(1991).** Rhodopsin mutations in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Proc.Natl. Acad Sci USA* 88:6481-5.

**-Taylor SAM,Barnes GT, McDonald ME, Gusella JF (1992).** A dinucleotide repeat polymorphism at the D4S127 locus. *Hum Mol Genet* 1:142.

**-Tiller GE, Polumbo PA, Heinzmann C, Kojis TL, Baterman JB. (1994).** The gene for the beta subunit of rod cGMP phosphodiesterase is tightly linked to the huntington locus on human chromosome 4p16. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* 35(Suppl):1265.

**-Travis GH., Sutcliffe JG., Bok d. (1991).** The retinal degeneration slow (*rds*) gene product is a photoreceptor disc membrane-associated glycoprotein. *Neuron* 6:61-70.

**-Travis GH., Christerson L.,Danielson PE. et al .(1991).** The human retinal degeneration slow (*RDS*) gene: chromosome assignment and structure of the mRNA. *Genomics* 10:733-9.

**-Travis GH., Helper JE.(1993).**A medley of retinal dystrophies. *Nature Genet.*3:191-192.

**-Usher CH:**On the inheritance of retinitis pigmentosa with notes of cases. *Roy Lond Ophthal Hosp Rep* 19:1930-203, 1914

**-van den Born LL, van Soest S., van Schooneveld MJ., Riemsdag FCC., De Long PTVM., Bleeker-Waagemakers LM. (1992)** Autosomal recessive retinitis pigmentosa with preserved para-arteriolar retinal pigment epithelium. *Am. J. Ophthalmol.*

**-van Soest S., van den Born L.I., Gal A. et al.(1994).** Assignment of a gene for autosomal recessive retinnitis pigmentosa (*RP12*) to chromosome 1q31-q32.1 in an inbred and genetically heterogeneous disease ppopulation. *Genomics* 22:499-504.

**-Von Ammon FA:** Klinische Darstellungen der Krankheiten und Bildungsfehler des menschlichen Auges, vol 1. Berlin, G Reimer, 1838

**-von Graefe A:** Exceptionnelles Verhalten des Gesichtsfeldes bei Pigmententartung der Netzhaut. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 4(II):250-253, 1858

**-Weber JL., May PE. (1989)** Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using polymerase chain reaction. Am. J. Hum. Genet. 44:388-396.

**-Weber J.L., Kwitck A.E., May P.E. y Zoghbi H.Y. (1991).** Dinucleotide repeat polymorphism at the D6S105 locus. Nucleic Acids Res. 19:968.

**-Weber B, Riess O, Daneshvar H, Graham R, Hayden R (1993)** (CA)<sub>n</sub> dinucleotide repeat at the PDEB locus in 4p16.3. Hum Mol Genet 2:827.

**-Wells J., Wroblewski J., Keen J., Inglehearn C., Jubb C., Eckstein A., Jay M., Arden G., Bhattacharya SS, Fitzke F., Bird A. (1993).** mutations in the human retinal degeneration slow (RDS) gene can cause either retinitis pigmentosa or macular degeneration. Nature Genet 3:213-218.

**-Wiessenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal, et al (1992).** A second generation linkage map of the human genome. Nature 359:794-801.

**-Wiggert B., Kutty G., Long KO., Inouye L., Gery I., Chader GJ., Aguirre Gd (1991)** Interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP) in progressive rod-cone degeneration (pcrd)-biochemical, immunocytochemical and immunologic studies. Exp Eye Res 53:389-398.

**-Wiggert B., van Veen T., Kutty G., Ling L., Nickerson J., Si JS., Nilsson SE. Chader GJ, Narfström K. (1994).** Cell Tissue Res 278:291-298.

**-Wu J., Nickerson JM.(1991)** PCR detection of the MspI polymorphism in the human IRBP gene(RPB3).Nucleic Acids Res. 19:4016.

**-Xu SY, Schwartz M, Rosenberg T, Gal A. (1996).** A ninth locus for ADRP maps in the pericentromeric region of chromosome 1. Human Mol Genet 5, vol8: 1193-1197.

***ANEXO***

# Retinitis pigmentosa in Spain

Ayuso C, Garcia-Sandoval B, Najera C, Valverde D, Carballo M, Antiñolo G and the Spanish Multicentric and Multidisciplinary Group for Research into Retinitis Pigmentosa. Retinitis pigmentosa in Spain. Clin Genet 1995; 48: 120-122. © Munksgaard, 1995

Retinitis pigmentosa is a term commonly given to a group of inherited and progressive disorders which affect the photoreceptors of the retina. As part of an ongoing research programme throughout Spain, clinical, epidemiological, and genetic studies have been carried out on these diseases. Here, we report the relative frequencies of the different genetic types in 503 non-syndromic and 89 syndromic RP families of Spanish origin. The most frequent syndromic RP forms were Usher syndrome type 1 (20/89 families=30%) and Usher syndrome type 2 (44 families=49%). Among non-syndromic RP forms, 12% were autosomal dominant, 39% autosomal recessive and 4% X-linked. Forty-one percent were isolated or simplex cases and in 4% the genetic type could not be established.

**C. Ayuso<sup>1</sup>, B. Garcia-Sandoval<sup>1</sup>,  
C. Najera<sup>2</sup>, D. Valverde<sup>3</sup>,  
M. Carballo<sup>4</sup>, G. Antiñolo<sup>5</sup>**  
and the Spanish Multicentric and  
Multidisciplinary Group for  
Research into Retinitis Pigmentosa

<sup>1</sup>Fundacion Jimenez Diaz, Universidad Autonoma, Madrid, <sup>2</sup>Department of Genetics Facultad C. Biologicas, Universidad, Valencia, <sup>3</sup>Hospital San Pablo, Universidad, Barcelona, <sup>4</sup>Hospital San Juan De Dios, Barcelona and <sup>5</sup>Hospital Universitario Virgen del Rocío, Universidad, Sevilla, Spain

Key words: genetic types - non-syndromic RP - retinitis pigmentosa - Spain - syndromic RP

C. Ayuso, Fundacion Jimenez Diaz, Universidad Autonoma, Madrid, Spain

Received 21 February 1994, revised version received 6 March, accepted for publication 18 April 1995

Retinitis pigmentosa (RP) is a term used to describe a group of inherited disorders which primarily affect the photoreceptor of the retina, mainly the rods. The pigmented epithelium that underlies and supports these cells is also involved.

RP is clinically and genetically heterogeneous, progressive (leading to blindness) and, so far, there is no treatment.

The broad definition of RP encompasses diseases confined to the eye (non-syndromic RP) and diseases involving the eye and other organs (syndromic RP). The most frequent syndromic RP is Usher syndrome. This disorder causes congenital hearing loss, progressive RP and vestibular dysfunction. Other syndromes associated with retinal symptoms include Cockayne syndrome, Bardet-Biedl syndrome, Alström syndrome and Refsum disease.

All modes of inheritance (autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked) have been described (Fishman 1978). There are also many cases with a negative family history (simplex RP=SRP).

## Patients and methods

A "Concerted Action of the European Community is being developed for research on clinical and genetic aspects of RP. Five Spanish research teams have joined in this research programme.

The patients were ascertained by the Spanish RP Patient Association and also by the Departments of Ophthalmology of the hospitals participating in this study. All the patients included in this report are living in Spain and are of Spanish origin.

Extensive ophthalmological examinations were carried out on patients and relatives, and included measurements of the best corrected visual acuity, visual field tests, funduscopy, biomicroscopy, and electroretinograms.

The mode of inheritance was determined following the HAIM criteria (1993) with the following modifications:

1. Autosomal dominant inheritance was assumed in pedigrees with vertical transmission in at least

Table 2. Geographical distribution of the genetic types in retinitis pigmentosa

Country (Authors)	No. of families	S (%)	NS (%)	AD (%)	AR (%)	XL (%)	S (%)	U (%)
China (Hu 1987)	151		151	17	50	12	72	
Maine U.S. (Bunker et al. 1984)	85	—	85	16	16	7	39	7
Norway (Grondahl 1987)	71	18 (25%)	53	8	25	1	19	8%
U.K. (Bundey & Crews 1984)	134	18 (14%)	116	27	14	19	51	5
U.K. (Jay 1982)	426		426	104	57	67	175	23
U.S. (Boughman et al. 1980)			380	65	315	19		
U.S. (Boughman & Fishman 1983)	300		300	65	48	27	150	10
U.S. (Fishman 1978)	124		124	23	24	10	65	2
France (Kaplan et al. 1990)	116		93	19	20	12	39	3
Denmark (Haim 1993)	366		366	22	63	23	197	61
South Africa (Greenberg et al. 1993)			125	6%	17%	6%	54%	17%
Spain (Present study 1994)	592	89 (13%)	503	29	33	3	50	10
				23%	27%	3%	40%	8%
				59	198	21	207	18
				12%	39%	4%	31%	4%

S: syndromic, NS: non-syndromic, AD: Autosomal dominant, AR: autosomal recessive, XL: X-linked, S: simplex, U: unclassified.

in female relatives of some sporadically affected patients were negative.

Nevertheless, additional clinical studies in asymptomatic female relatives of every male SRP patient could facilitate correct diagnosis of the genetic type.

#### Acknowledgements

This research was supported by a grant from F.I.S. and grants from the F.A.A.R.P.E.E/Fundación ONCE. We also are very grateful for the Concerted Action of the E.C. "Prevention of Blindness", for their assistance.

We thank all the scientists (more than 60 in all) belonging to the five research teams and the RP patients and their relatives for participating in this research.

#### References

Boughman JA, Conneally PM, Nance WE. Population genetic studies of retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 1980; 32: 223-235.

- Boughman JA, Fishman GA. A genetic analysis of retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 1983; 67: 449-454.
- Bundey S, Crews S. A study of retinitis pigmentosa in the City of Birmingham. I & II. *J Med Genet* 1984; 21: 417-428.
- Bunker CH, Berson EL, Bromley WC, Hayes RP, Roderick TH. Prevalence of retinitis pigmentosa in Maine. *Am J Ophthalmol* 1984; 97: 357-365.
- Fishman GA. Retinitis pigmentosa. Genetic percentages. *Arch Ophthalmol* 1978; 96: 822-826.
- Greenberg J, Bartmann L, Ramesar R, Beighton P. Retinitis pigmentosa in Southern Africa. *Clin Genet* 1993; 44: 232-235.
- Grondahl J. Estimation of prognosis and prevalence of retinitis pigmentosa and Usher syndrome in Norway. *Clin Genet* 1987; 31: 255-264.
- Haim M. Retinitis pigmentosa: problems associated with genetic classification. *Clin Genet* 1993; 44: 62-70.
- Hu DN. Prevalence and mode of inheritance of major genetic eye disease in China. *J Med Genet* 1987; 24: 584-588.
- Jay M. On the heredity of retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 1982; 66: 402-416.
- Kaplan J, Bonneau D, Frézal J, Munnich A, Dufier JL. Clinical and genetic heterogeneity in retinitis pigmentosa. *Hum Genet* 1990; 85: 635-642.

ESTUDIOS MOLECULARES DE LA RETINOSIS PIGMENTARIA AUTOSOMICA  
RECESIVA

M.Baiget, D. Valverde

Unitat de Gènetica Molecular  
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau  
Barcelona

En el libro:

ASPECTOS CLÍNICOS Y GENÉTICOS DE LA RETINOSIS PIGMENTARIA

Editado por:  
Francesc Duch i Bordás, 1994.

## RESUMEN

La Retinosis Pigmentaria es una enfermedad genética cuyo patrón de herencia más frecuente es la transmisión autosómica recesiva. Se han descrito dos estrategias de estudio para la identificación de los genes involucrados en dicha enfermedad: estudios de ligamiento genético y búsqueda de genes candidatos. Hemos estudiado 21 familias españolas afectadas de Retinosis Pigmentaria autosómica recesiva, proponiendo como gen candidato el que codifica para la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa ( $\beta$ PDE). Los resultados indican que en el 90% de los casos, puede excluirse la hipótesis de que fuesen las mutaciones en el gen de la  $\beta$ PDE las responsables de esta enfermedad.

## SUMMARY

Retinosis Pigmentaria is a genetic disease most frequently inherited in an autosomal recessive form (ARRP). Two different strategies has been described to study the genes involved in this form of retinal degeneration: linkage analysis and the study of candidate genes. We have analyzed the involvement of the  $\beta$ PDE gene in 21 Spanish families with ARRP. In the 90% of the families, this gene can be excluded as a responsible of this form of RP.

PALABRAS CLAVE:

Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva; Genes candidatos;  
Ligamiento genético; Análisis molecular; Subunidad  $\beta$  de la PDE.

KEW WORDS:

Autosomal Recessive Retinosis Pigmentaria; Candidate genes;  
Genetic linkage; Molecular analysis;  $\beta$  subunit of the PDE.



La Retinosis Pigmentaria que se transmite con un patrón de herencia autosómico recesivo (ARRP) representa la categoría genética más frecuente con que se presenta esta enfermedad (1-6). Los estudios moleculares encaminados a identificar cuales son los genes involucrados en la ARRP y las anomalías de dichos genes que son responsables de la enfermedad son hasta el momento escasos. A continuación revisaremos las distintas estrategias de estudio que se han aplicado para el análisis molecular de la ARRP y los resultados obtenidos por los distintos autores, en este campo.

#### **Estrategias de estudio para la identificación de los genes involucrados en la ARRP**

Los estudios de ligamiento genético se basan en el mapeo o localización del gen mediante el análisis del patrón de herencia de distintos marcadores genéticos en los miembros de familias en las que la retinosis pigmentaria se hereda de forma autosómica recesiva. Esta metodología de estudio ha servido para identificar los genes responsables de muchas enfermedades hereditarias, como por ejemplo, la corea de Huntington, la fibrosis quística, la neurofibromatosis, la distrofia miotónica, etc.

Los estudios de ligamiento pueden efectuarse cuando se dispone de:

a) familias en las que pueda afirmarse que la herencia de la RP

es autosómica recesiva ( familias consanguíneas y/o familias con mas de un afectado en la misma fratría) (Figura 1).

b) marcadores genéticos de las distintas regiones del genoma humano que permitan seguir, en aquellas familias, la cosegregación entre la enfermedad y el marcador.

**El estudio de genes "candidatos"** es la segunda estrategia que se ha empleado para el análisis molecular de la ARRP y se han considerado como genes candidatos aquellos que codifican para las distintas proteínas involucradas en el proceso de la transducción visual que se esquematiza en la Figura 2.

El proceso de la transducción visual se desencadena cuando la absorción de un fotón de luz activa la molécula del pigmento fotoreactivo transmembránico denominado **rodopsina**. La rodopsina activada es capaz de interaccionar con una proteína, la **transducina**, formada por tres subunidades distintas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). La subunidad  $\alpha$  de la transducina activada, activa, a su vez, un enzima: la **fosfodiesterasa del GMP cíclico (PDE)** que tiene una estructura tetramérica formada por cuatro unidades (una subunidad  $\alpha$ , una subunidad  $\beta$  y dos subunidades  $\gamma$ ).

La PDE activada hidroliza el GMP cíclico que se encuentra unido a una **proteína transmembránica** cuya función es la de controlar el paso de cationes monovalentes y bivalentes ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^+$ ) a través

de la membrana de los bastones. La hidrólisis del GMP cíclico conlleva el cierre de los canales de iones y, con ello, una hiperpolarización de la membrana de los fotorreceptores. Este fenómeno inicia la señal de la transducción visual. Los iones  $\text{Ca}^+$  continúan siendo bombeados hacia el exterior de la célula por una glicoproteína que intercambia iones  $\text{Ca}^+$  y  $\text{Na}^+$ . Como resultado del descenso en la concentración de iones  $\text{Ca}^+$ , se activa una proteína: la **recoverina**, que, a su vez, activa el enzima **guanilato-ciclase** que, se encarga de restablecer los niveles celulares de GMP cíclico y, en consecuencia, se abren de nuevo los canales de transporte iónico de la membrana. Por su parte, la rodopsina vuelve al estado desactivado como resultado de la acción combinada de dos proteínas: la **rodopsina kinasa** y la **arrestina**. La rodopsina kinasa fosforila la rodopsina activada y reduce su capacidad de unión a la transducina; esta capacidad de unión se ve más reducida cuando la rodopsina fosforilada se une a la arrestina. El producto resultante de esta unión (todo trans-retinal) es transportado mediante el concurso del **IRBP** (intersticial retinol binding protein) hacia el epitelio celular. En este punto, el todo trans-retinal da lugar al 11-cis-retinal que volverá, de nuevo, al interior del segmento externo del bastón unido al IRBP y, una vez allí, se unirá a la opsina para dar lugar a rodopsina excitable por la luz.

De hecho, cualquiera de los genes que codifican para las proteínas, ya sean estructurales o enzimas, que intervienen en la cascada de la transducción visual, son candidatos a ser responsables de la retinosis pigmentaria si sufren algún tipo de

mutación. La tabla 1 recoge de forma no exhaustiva estos genes candidatos y su localización en el genoma humano.

## Patología molecular de la ARRP

Como resultado del estudio de genes candidatos se publicó, en 1992 (7) la identificación de una mutación en el gen de la rodopsina que tenía una expresión fenotípica de ARRP. En este trabajo se analizó una familia consanguínea y se evidenció que la hija afectada de RP era homocigota para una mutación puntual (G T) en el codon 249 del gen de la rodopsina que creaba una señal de terminación en dicho codon. El gen de la rodopsina que posee esta mutación codifica para una proteína que, si fuese estable, sería funcionalmente inactiva porque no posee la secuencia de aminoácidos a los que se une el 11-cis retinal.

En el mismo trabajo, los autores identificaron en una mujer del grupo control, que era portadora de otra anomalía en el gen de la rodopsina: una mutación puntual (G T) en el codon 4335 de dicho gen. Esta mutación ocurre en una secuencia de nucleótidos muy conservada que cubre la región genómica que separa el exon 3 del intrón 4 del gen de la rodopsina, y, por lo tanto, interfiere el proceso de maduración del ARN mensajero. Sea cual fuere el defecto del ARN resultante, la rodopsina que sintetiza este gen mutado será funcionalmente inactiva puesto que se habrán alterado la parte de la proteína que interacciona con la transducina.

El segundo gen candidato comprometido en la expresión fenotípica de ARRP es el gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la PDE. McLaughlin y cols, han publicado en 1993 (8) la identificación de cuatro mutaciones distintas en dicho gen que se presentan en forma de doble heterocigocia en afectados de ARRP, pertenecientes a tres familias. El gen de la subunidad  $\beta$  de la PDE se localiza en el extremo del brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3) y está formado por 22 exones separados por los correspondientes intrones. Dos de las mutaciones identificadas se localizan en el exon 12, una en el exon 5 y otra en el exon 13. Las tres primeras crean un codon de terminación prematuro y la cuarta origina el cambio de un residuo de histidina por uno de tirosina en la posición 557 de la secuencia de aminoácidos de la subunidad  $\beta$  de la PDE.

## Estudios moleculares efectuados en familias españolas con ARRP

En familias españolas afectadas de ARRP se ha estudiado, mediante análisis de ligamiento y de homocigosidad, el compromiso del gen de la subunidad  $\beta$  de la PDE en dicha patología (9).

Se han analizado 21 familias, habiéndose demostrado consanguinidad en 14 de ellas y cumpliendo el requisito de tener más de un afectado en la misma fratría en las 7 restantes.

Los análisis de ligamiento se han realizado con cuatro marcadores polimórficos del ADN ubicados muy cerca del gen en estudio. En 12 de ellas no existía cosegregación entre los marcadores analizados y la enfermedad. En la Figura 3 se muestra, a modo de ejemplo, algunas de estas familias. Las 9 familias restantes incluían 8 árboles familiares con clara consanguinidad. En estos últimos se efectuó estudio de homocigosidad para la región que contiene el gen de la  $\beta$ PDE. En 7 familias consanguíneas no se demostró homocigosidad. La Figura 4 muestra el patrón obtenido en tres de estas familias. Estos resultados indican que, en 19 de las 21 familias estudiadas, puede excluirse la hipótesis de que fuesen las mutaciones en el gen de la  $\beta$ PDE las responsables de la enfermedad. Las dos familias restantes en las que no se ha podido excluir el papel de este gen en el desarrollo de la ARRP son motivo de estudio en la actualidad.

## REFERENCIAS

- 1.- Jay, M. Figures and fantasies: the frequencies of the different genetic forms of retinitis pigmentosa. Birth defects Original Article Series. 1982, 18: 167-173.
- 2.- Kaplan, J., Bonneau, D., Frezal, J., Munnich, A., Dufier, J.L. Clinical and genetic heterogeneity in retinitis pigmentosa. Human Genetics. 1990, 85: 635-642.
- 3.- Boughman, J.A., Fishman, G.A. A genetic study of retinitis pigmentosa. British Journal of Ophthalmology. 1983, 67: 449-454.
- 4.- Millán, J.M., Beneyto, M., Wedemann, H., Nájera, C., Prieto, F. Genetic study of retinitis pigmentosa in Valencia (Spain). 1993. European Society of Human Genetics, 25th Annual Meeting.
- 5.- Molina, M., Tejada, I., Onaindia, L., Arostegui, E., Llecha, N., Barreña, B., Martín, R. Clinical and genetic study of retinitis pigmentosa in the autonomous basque community. Preliminary results. 1993. European Society of Human Genetics, 25th Annual Meeting.
- 6.- Antiñolo, G., López, F., Borrego, S., Chaparro, P., Rueda, T., Sánchez, J., Aznares, J. Analysis of clinical variability and genetic heterogeneity of retinitis pigmentosa in the South of Spain. 1993. European Society of Human Genetics, 25th Annual Meeting.
- 7.- 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. Nature Genetics 1992, 1:209-213.
- 8.- 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. Nature Genetics 1993; 4: 130-134.
- 9.- Exclusion of the gene for the  $\beta$  subunit of the cGMP phosphodiesterase (PDEB) as the cause of Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa in a large group of Spanish families. M. Bayés, S. Balcells, D. Grinberg, L. Vilageliu, I. Martínez, S. Bhattacharia, C. Ayuso, J. Benitez, T. Solans, E. del Rio, M. Baiget, R. González. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 1993. Sometido.



Tabla1.- Localización de algunos de los genes candidatos en la ARRP.

GENES CANDIDATOS	LOCALIZACION
Rodopsina	3q21
Transducina ( $\alpha$ )	3p21
Transducina ( $\beta$ )	1p31.2 - pter
Transducina ( )	
PDE ( $\alpha$ )	5q31.2 -q24
PDE ( $\beta$ )	4p16.3
PDE ( )	17q21.1
Recoverina	17
cGMP gated channel protein	4p14 -q13
Rodopsina kinasa	
Arrestina	2q24 -q37
IRBP	10p11.2 -q11.2
Periferina	6p12

## RESEARCH ARTICLE

# Homozygous Tandem Duplication Within the Gene Encoding the $\beta$ -Subunit of Rod Phosphodiesterase as a Cause for Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa

Mònica Bayés, Mara Giordano, Susana Balcells, Daniel Grinberg, Lluïsa Vilageliu, Immaculada Martínez, Carmen Ayuso, Javier Benítez, María A. Ramos-Arroyo, Pilar Chivelet, Teresa Solans, Diana Valverde, Serge Amselem, Michel Goossens, Montserrat Baiget, Roser González-Duarte\*, and Claude Besmond

*Department de Genètica, Universitat de Barcelona, 08071 Barcelona, Spain (M.B., S.B., D.G., L.V., R.G.-D.); Inserm U91, Hôpital Henri Mondor, 94010 Créteil, France (M.G., S.A., M.G., C.B.); Departamento de Genética, Fundación Jiménez Díaz, 28040 Madrid, Spain (C.A., J.B.); Servicio de Genética, Hospital Virgen del Camino, 31008 Pamplona, Spain (M.A.R.-A.); Servei d'Oftalmologia (P.C., T.S.) and Unitat de Genètica Molecular, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain (D.V., M.B.); Fax: 34-3-411-0969*

Communicated by Jean-Louis Mandel

Autosomal recessive retinitis pigmentosa (ARRP) is a degenerative disease of photoreceptors in which defects in the rhodopsin and phosphodiesterase  $\beta$ -subunit (PDEB) loci have been reported. To assess the involvement of PDEB in ARRP families from Spain, we screened a panel of 19 families for linkage to markers within or close to the PDEB gene. Homozygosity was also tested in cases of consanguinity. This combined approach ruled out PDEB as the cause of the disease in all but one of the families. Molecular characterization of the gene in that family (a consanguineous pedigree) revealed a homozygous 71-bp tandem duplication in exon 1 of the affected member, the parents being heterozygous. This defect causes a frameshift mutation which leads to a premature stop codon, suggesting that this mutant allele is the underlying cause of ARRP in this patient. According to the data presented here, the PDEB gene is not the main gene responsible for ARRP, but accounts for about 5% of the cases.

© 1995 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: Retinitis pigmentosa, PDEB, Spanish population

## INTRODUCTION

Retinitis pigmentosa (RP) is a hereditary condition characterized by slow outer-retinal degeneration. The incidence in Europe and United States has been estimated to range from 1:3,000 to 1:5,000 (Humphries et al., 1990; Berson, 1993). Prominent clinical features include night blindness and constriction of visual fields, leading to severe visual loss (Heckenlively, 1988). RP presents multiple modes of inheritance, as it can be transmitted as an autosomal dominant, autosomal recessive, or X-linked disorder (Boughman et al., 1980; Heckenlively, 1988; Humphries et al., 1990). In addition, genetic heterogeneity has been demonstrated within each hereditary pattern. As a remarkable number of genes involved in the visual transduc-

tion cascade have been cloned, the candidate gene approach (Dryja, 1990) is the favoured strategy to investigate the molecular mechanism underlying RP.

Mutation analysis in candidate genes revealed mutations in the rhodopsin (Dryja et al., 1990) and peripherin/rds (Farrar et al., 1991; Kajiwara et al., 1991) genes as causes of autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP). About 30% of ADRP cases are caused by rhodopsin mutations, whereas mutations in peripherin/rds account for 2-4%. Genetic linkage studies based on single

Received April 13, 1994; accepted July 16, 1994.

\*To whom reprint requests/correspondence should be addressed.

large families permitted the localization of 4 other loci for ADRP: to the pericentromeric region of chromosome 8 (Blanton et al., 1991), to the long (Jordan et al., 1993) and short (Inglehearn et al., 1993) arms of chromosome 7, and to the long arm of chromosome 19 (Al-Maghteh et al., 1994). Additionally, two loci (RP-2 and RP-3) have been genetically mapped for the X-linked form of the disease (Ott et al., 1990).

So far, despite extensive search for mutations responsible for ARRP, only two loci have been identified. A null mutation in the rhodopsin gene is responsible for one case of recessive RP (Rosenfeld et al., 1992). Besides, four point mutations (2 null and 2 missense mutations) in the gene encoding the  $\beta$ -subunit of rod phosphodiesterase (PDEB) have recently been found in a group of 100 independent ARRP patients (McLaughlin et al., 1993).

PDEB involvement has also been reported in mice and dogs suffering autosomal recessive eye disorders similar to human ARRP. A nonsense mutation has been identified in the PDEB gene as the cause of the rd phenotype in the mouse (Bowes et al., 1990), and a nonsense mutation in exon 21 of the PDEB gene has recently been identified in an Irish setter dog affected by rod/cone dysplasia (Suber et al., 1993).

We report a cosegregation study between the PDEB gene and ARRP in 19 Spanish families. In the only pedigree for which PDEB involvement could not be ruled out, we found a tandem duplication in exon 1, leading to the occurrence of a nonsense codon, which is putatively responsible for photoreceptor degeneration.

## MATERIALS AND METHODS

### Clinical and Electrophysiological Studies

Most of the families were ophthalmologically examined at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau in Barcelona or at the Fundación Jiménez Díaz in Madrid. All patients were assessed with best-corrected visual acuity, slit-lamp biomicroscopy, colour vision by the Farnsworth-Munsell test, ocular tension by air tonometer, perimetry, using the Octopus 500 automated perimeter, and electroretinography (ERG) using the Sereme Spectral Ophthalmologie. In addition, both direct and indirect ophthalmoscopy were performed.

ERG and VECP (Visual Evoked Cortical Potential) analyses were performed using needle electrodes, after pharmacologic (tropicamide 0.5%) dilation of the pupils and adaptation to the dark for 40 min. Electronic flash stimuli of 1,500–3,000

lux were used in all cases. Photoscopic ERG and macular VECPs were performed under white light, scotopic ERG under blue light (480 nm), and photopic ERG and the VECP from the fovea under red light (600 nm). Simultaneous stimulation of both eyes was used for the ERG, while for VECPs stimulation was strictly monocular.

### Analyses of DNA Polymorphisms

Genomic DNA was prepared from peripheral leukocytes according to Miller et al. (1988), with minor modifications. The polymorphic dinucleotide repeat at the PDEB locus was analyzed as described by Weber et al. (1993). The dinucleotide polymorphism at D4S127 was amplified using the primers described by Taylor et al. (1992), and the following PCR conditions: 94°C 1', 59°C 30" and 72°C 30" for 30 cycles. PCR products were resolved on 8% polyacrylamide gels and visualized by ethidium bromide staining. Primers and conditions for the VNTR at D4S111 were as described by Scott et al. (1991), and for the VNTR at D4S95 as described by Allito et al. (1991).

### Screening for PDEB Mutations

Screening of mutations within PDEB exons was initially performed using SSCP analysis. PCR amplification was performed as previously described (Saiki et al., 1988) with some modifications. Briefly, genomic DNA (1  $\mu$ g) was amplified in a 50- $\mu$ l reaction mixture containing 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8.4), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% (w/v) gelatin, 200  $\mu$ M of each dNTP, 20 pM of each primer, and 1U *Taq* polymerase (ATCC). Amplification conditions consisted of 35 cycles of denaturing at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. To enhance heteroduplex formation, the PCR cycles were followed by a 10-min denaturing step at 94°C and a 1-hr annealing step at relevant temperatures.

PCR reactions were performed using oligonucleotide primers based on the sequence described by Riess et al. (1992). For example, the region encompassing the duplication in exon 1 was amplified with the following primers: sense 5'-GGACCA-GAACCCCGATTTTGCCCGC-3', antisense 5'-GTTGCGTGGCGGTACATGAAGAGG-3'.

The nucleotide sequence of DNA samples was determined by direct sequencing (Gyllensten and Erlich, 1988). Briefly, single-strand DNA was generated by 60 PCR cycles using an unequal primer ratio of 1 pmol of primer 1 to 50 pmoles of primer 2. The product of asymmetric amplification was purified by ethanol precipitation and an aliquot

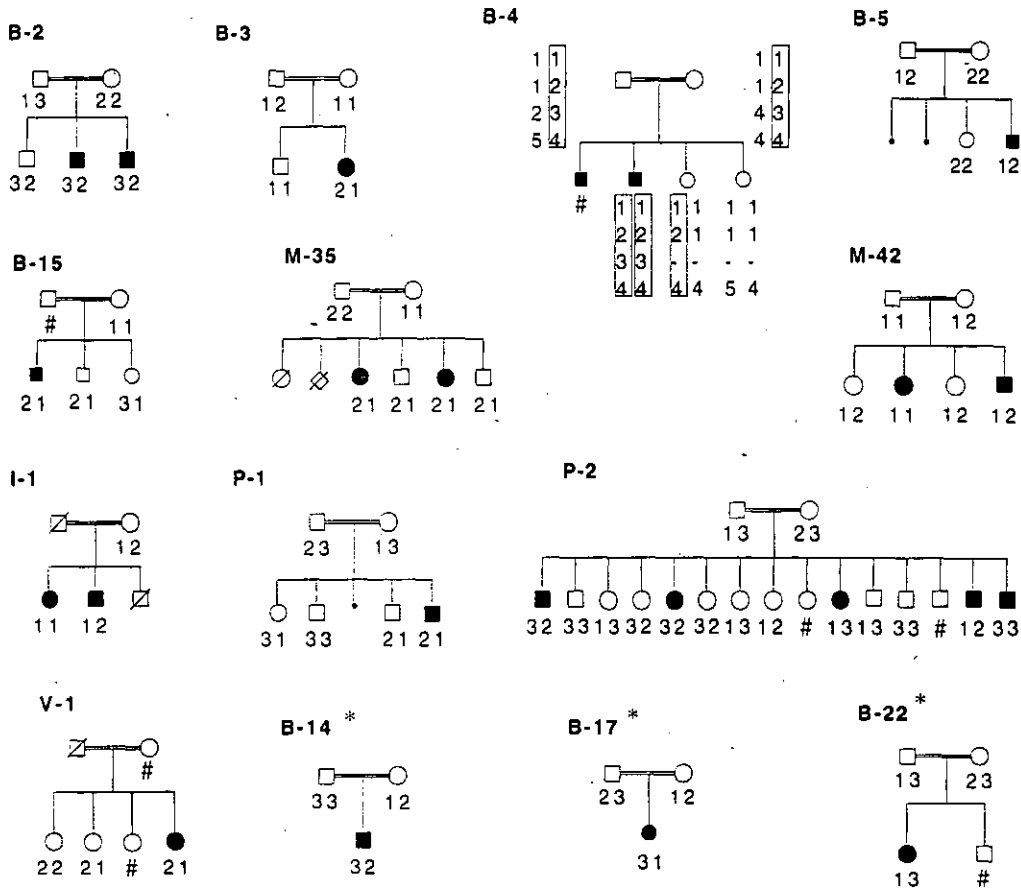


FIGURE 1. Pedigrees of the fourteen consanguineous ARR P families used in this study. Alleles correspond to the PDEB internal marker. In family B-4, alleles for D4S111, D4S95, and D4S127 are depicted below them, in this order. Boxes

indicate the haplotype cosegregating with the disease. \*Pedigrees only suitable for homozygosity analysis. #DNA not available.

was used as DNA template for sequencing using a Sequenase version 2.0 kit (United States Biochemicals Corp.). The sequencing reaction products were electrophoresed on a 6% polyacrylamide denaturing gel. The gel was dried and autoradiographed overnight using Kodak X-OMAT AR film.

**RESULTS**

**Linkage and Homozygosity Analyses**

Nineteen Spanish ARR P families, comprising 14 consanguineous (Fig. 1) and 5 nonconsanguineous multiplex pedigrees (not shown), were used in this study. In a nonconsanguineous pedigree comprising two affected males, X-linked transmission was ruled out by clinical examination of the mother, by family history and by genetic analysis (data not shown). A microsatellite marker located within the PDEB gene (Weber et al., 1993) was used to assay linkage to ARR P and to analyse ho-

mozygosity in ARR P patients from consanguineous pedigrees.

Of the 14 consanguineous ARR P pedigrees (Fig. 1), 11 were suitable for cosegregation and homozygosity analyses, while three consanguineous families containing only one affected child (or in which only one affected child was available) were included for the purpose of homozygosity studies only. The remaining 5 families were nonconsanguineous and showed exclusion of linkage to PDEB (not shown). Lack of linkage was also observed in 4 of 11 consanguineous pedigrees (M-42, I-1, P-1, and P-2). The other 7 families (B-2, B-3, B-4, B-5, B-15, M-35, and V-1) were uninformative for the marker. As these families, along with the 3 only-child pedigrees (B-14, B-17, and B-22), are consanguineous, they were further analyzed under the hypothesis that the affected members will be homozygous by descent for the disease gene. As shown in Figure 1A, all were heterozygous for the

PDEB marker, with the single exception of member II-2 of family B-4.

Cosegregation and homozygosity analyses were extended in this family to other markers located close to PDEB in 4p16.3, namely a VNTR at D4S111 (Scott et al., 1991), another VNTR at D4S95 (Allitto et al., 1991), and a dinucleotide polymorphism at D4S127 (Taylor et al., 1992). Approximate distances between these markers and the gene are 400 kb, 1,500 kb, and 1,600 kb respectively. Results showed that the parents shared one haplotype from this region (see boxes in Fig. 1A). Individual II-2 inherited two copies of this haplotype, while the unaffected sisters inherited either one or none.

### PDEB Mutation

In order to search for a mutation in the PDEB gene in family B-4, four of the 22 exons (1, 2, 18, 19) were amplified by PCR in the affected member (II-1). The products were tested on a 6% nondenaturing polyacrylamide gel prior to a more detailed analysis. In the amplified 5' portion of exon 1, patient II-1 showed a variant band that migrated more slowly than the normal 275-bp band, thus indicating the presence of a rearranged sequence (Fig. 2). Analysis of the family revealed the slower migrating band and heteroduplexes in addition to the normal band in both parents (I-1 and I-2). The unaffected sisters displayed either only the normal band (II-3) or both the normal and the mutant alleles (II-2). These data indicated that the abnormal band was associated with the disease in this family and are in accordance with the consanguinity of the parents.

In order to characterize the insertion, exon 1 of the PDEB gene was sequenced for all members of family B4. The sequence of II-1 revealed an insertion of 71 bp as a perfect tandem duplication of an adjacent 71-bp sequence (Fig. 3). The starting point of the duplicated fragment is between the second and the third nucleotide in codon 80. This duplication causes a shift in the translation reading frame, leading to a premature stop codon at position 213. Screening of 80 unrelated ARRP patients and 20 unrelated control individuals did not reveal the presence of the same mutation in the tested individuals.

### Clinical Findings

All families studied showed clinical findings typical of RP. Here we present data for patient II-1 of family B-4 (homozygous for the PDEB mutation). He is a 39-year-old man who reported ab-

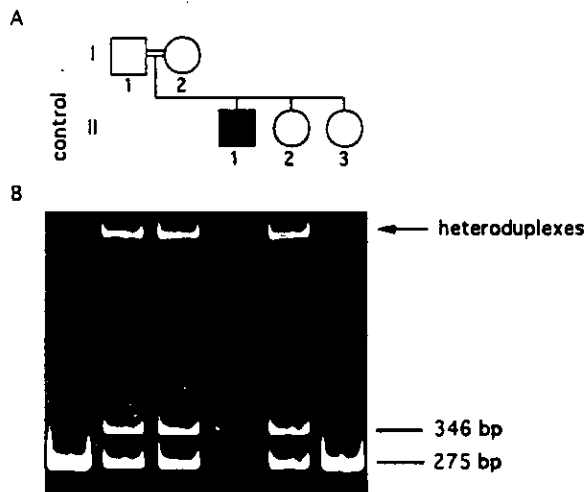


FIGURE 2. A PCR product from exon 1 of PDEB gene with abnormal mobility, cosegregates with the disease in family B-4. A: Partial pedigree of the family. The affected offspring (II-1) is designated by the filled symbol. B: Migration pattern observed on nondenaturing 6% polyacrylamide gel. In both parents (I-1 and I-2) and in the nonaffected child (II-2), a larger extra band (346 bp) and heteroduplexes are seen in addition to the wild-type band (275 bp). The patient (II-1) displays only the larger band, with no wild-type band. III-3 is homozygous for the normal allele.

sence of night vision since childhood. At age 33, his lenses were removed for cataract surgery. At present he has a best-corrected visual acuity of 20/40 (+1 cyl. +12 sph. in both eyes) and visual fields constricted to about 10° diameter. Ophthalmoscopy revealed a pale retina, attenuated retinal vessels, and typical intraretinal bone-spicule pigment in the midperiphery and around the periphery. Dim blue light ERG recordings appeared flat, revealing no detectable rod response. No response either by cones or by rods was shown by flat ERG with red or white light.

The central retina and macular area, studied by registration of VECs in response to a white flash, showed attenuated early waves, extended latency periods for  $N_{IV}$  (of approximately 140 msec) and a difference of maximal amplitude between  $N_{IV}$  and  $P_V$  of about 15  $\mu V$  (Fig. 4). Together, these data demonstrated alterations at the maculocortical bundle. There was symmetry between the eyes.

Red light VECs allowed specific exploration of macular cones of the central bundle of the optic nerve. The observed latency times extended to 158 msec and the differences of maximal amplitude between  $N_{IV}$  and  $P_V$ , slightly lower than 10  $\mu V$ , showed a significantly affected permeability in the central area of this bundle. Latency times were identical for left and right eyes. In our examination

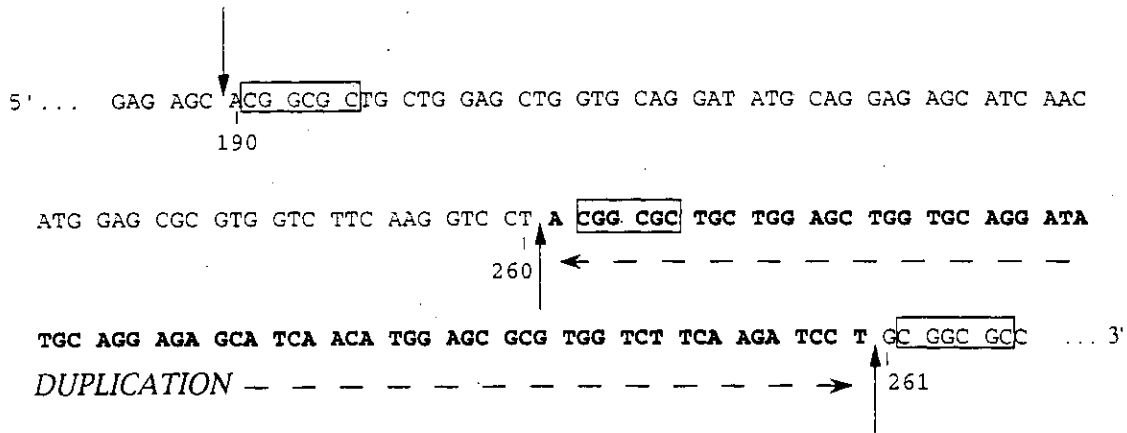


FIGURE 3. Characterization of the mutant allele, with representation of the duplicated motif within the mutated sequence. Between nucleotides 260 and 261 of the normal cDNA sequence (plain text) there is a 71-bp duplication (bold) identical to nucleotides 190 and 260. Note that in the

normal allele a 65-bp sequence is flanked by two-6 bp direct repeats (boxes), the first of which is included in the duplicated region. Sequence numbers are as in Collins et al. (1992).

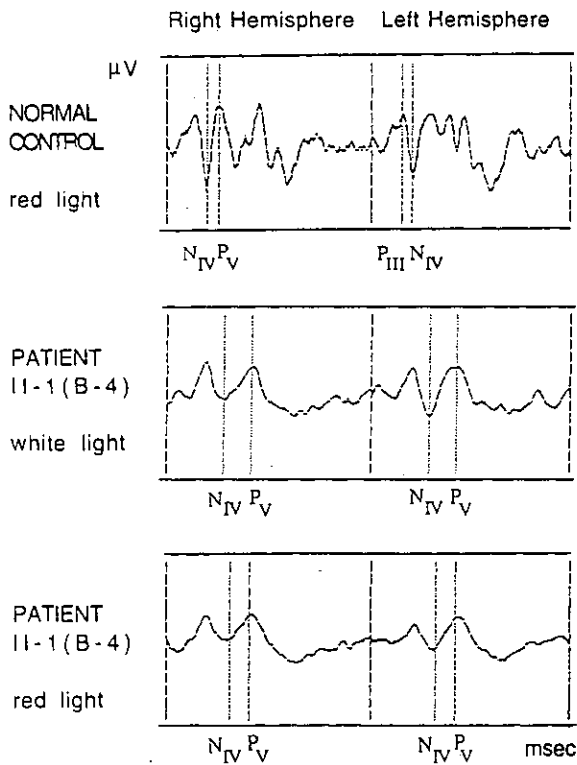


FIGURE 4. VECP recordings. Top row shows normal pattern under red light. A similar pattern was obtained under white light (not shown). Middle and bottom rows show patient's white and red VECPs respectively.  $N_{IV}$  and  $P_{IV}$  indicate latency times of minimal and maximal responses. Normal value for  $N_{IV}$  is 100 msec.

of more than 200 RP patients, VECP analyses consistently showed attenuated and disorganized patterns. Surprisingly, the case presented here showed

structured VECPs which allowed the study described above. Whether this physiologic feature is related to the mutation found in the PDEB gene is unknown.

### DISCUSSION

The PDEB gene and the rhodopsin gene are the only two human loci at which mutations have been found in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. We performed cosegregation and homozygosity analyses to determine the involvement of the PDEB gene in a panel of 19 Spanish ARRP families. Nine of these showed no cosegregation between an internal marker and the disease. The remaining 10 families were consanguineous pedigrees, 9 of which showed no homozygosity for the marker. The combined results excluded the PDEB gene from all but one family. Examination of other markers in the PDEB region clearly demonstrated homozygosity in the affected member and cosegregation between the haplotype and the disease in this family.

These findings prompted us to search for mutations in the PDEB gene in this family. A homozygous duplication of 71 bp in exon 1 cosegregating with the disease was characterized. This duplication produces a frameshift leading to a premature stop codon located 133 residues downstream the insertion point. It is therefore likely that the mutant allele is nonfunctional. The predicted product is a truncated protein of 213 amino acids in which both the catalytic and the non-catalytic cGMP binding domains are deleted.

As shown in Figure 3, the 71 bp normal se-

quence is flanked by two 6 bp direct repeats (CG-GCGC) thus suggesting that the duplication could have occurred by means of an unequal crossing-over. The unequal exchange might have occurred between nucleotide 571 adjacent to 5' of repeat 2 and nucleotide 499 flanking the 5' of repeat 1. The resulting products would then consist of an allele containing a tandem duplicated 71-bp sequence and an allele with a 71-bp deletion.

Nonsense mutations have been observed to cause a severe reduction in the amount of mutant allele transcript (Baserga and Benz, 1988; Hamosh et al., 1992). However, in some cases, such as gyrate atrophy (Dietz et al., 1993), the skipping of a constitutive exon containing a nonsense mutation has been reported to lead to the restoration of the open reading frame in vivo. In the case reported here, the mutation does not generate an alternative splice site. Although the unavailability of the mRNA renders the exploration of these hypotheses difficult, clinical and ERG data show that the mutation disrupts the enzymatic function of the PDEB protein.

According to the data presented here, the PDEB gene is not the main gene responsible for ARRP. In our sample it accounts for only one case out of 19. This is in agreement with the results of McLaughlin et al. (1993), who found four mutations in the PDEB gene in 99 unrelated patients (4%), although the actual figure could be larger, since they only screened 7 of the 22 exons of the gene. Besides, Riess et al. (1992) did not find any disease-causing mutation in this gene in 13 unrelated ARRP patients. The rhodopsin gene moreover, has been found to be involved in only one case of the disease (Rosenfeld et al., 1992). In summary, all the analyses reported so far indicate that the cause of ARRP in most of the pedigrees (>90%) is unknown.

Other candidate genes and regions should be analyzed in the remaining cases. A search strategy like the one presented here, combining cosegregation and homozygosity analysis and the search for mutations, has the advantage that linkage analysis can either exclude a given gene in a given pedigree or identify which families may be suitable for mutation analysis. A number of such candidate genes encoding other proteins of the phototransduction cascade have now been localized and cloned.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the families for their generous cooperation, Dr. Magdalena Beneyto for collecting family V-1, and R. Rycroft for revising the

English version of the manuscript. In Spain, this work was supported by CICYT (SAF92-0759-C02-01), FIS (91-00030501), and the Federación de Asociaciones de Afectados de Retinosis Pigmentaria del Estado Español (FAARPE). In France, financial support was obtained from the Association Française Retinitis Pigmentosa (AFRP), INSERM, and the Association Française Contre les Myopathies (AFM). M. Bayés is a recipient of a fellowship from the Generalitat de Catalunya. M. Giordano is a recipient of a fellowship from the European Community.

#### REFERENCES

- Al-Maghteh M, Inglehearn CF, Keen TJ, Evans K, Moore AT, Jay M, Bird AC, Bhattacharya SS (1994) Identification of a sixth locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19. *Hum Mol Genet* 3:351-354.
- Allitto BA, Horn GT, Altherr MR, Richards B, McClatchey AI, Wasmuth JJ, Gusella JF (1991) Detection by PCR of the VNTR polymorphism at D4S95. *Nucleic Acids Res* 19:4015.
- Baserga SJ, Benz EJ (1988) Nonsense mutations in the human  $\beta$ -globin gene affect mRNA metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2056-2060.
- Berson EL (1993) Retinitis-pigmentosa—The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 34:1659-1676.
- Blanton SH, Heckenlively JR, Cottingham AW, Friedman J, Sandler LA, Wagner M, Friedman LH, Daiger SP (1991) Linkage mapping of autosomal dominant retinitis-pigmentosa (RP1) to the pericentric region of human chromosome-8. *Genomics* 11:857-869.
- Boughman JA, Conneally PM, Nance WE (1980) Population genetic studies of retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 32:223-235.
- Bowes C, Li T, Dancinger M, Baxter LC, Applebury ML, Farber DB (1990) Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the  $\beta$  subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* 347:677-680.
- Collins C, Hutchinson G, Kowbel D, Riess O, Weber B, Hayden MR (1992) The human beta-subunit of rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase: Complete retinal cDNA sequence and evidence for expression in brain. *Genomics* 13:698-704.
- Dietz HC, Valle D, Francoromano CA, Kendzior RJ, Pyeritz RE, Cutting GR (1993) The skipping of constitutive exons in vivo induced by nonsense mutations. *Science* 259:680-683.
- Dryja TP (1990) Deficiencies in sight with the candidate gene approach. *Nature* 347:614.
- Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandel DW, Sandberg MA (1990) A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 343:364-366.
- Farrar GJ, Kenna P, Jordan SA, Kumarsingh R, Humphries MM, Sharp EM, Sheils DM, Humphries P (1991) A 3-base-pair deletion in the peripherin-RDS gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 354:478-480.
- Gyllenstein UB, Erlich HA (1988) Generation of single-strand DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7652-7656.
- Hamosh A, Rosenstein BJ, Cutting GR (1992) CFTR nonsense mutations G542X and W1282X associated with severe reduction of CFTR mRNA in nasal epithelial cells. *Hum Mol Genet* 1:542-544.

- Heckenlively JR (1988) Autosomal dominant retinitis pigmentosa. In Ewan H (ed): "Retinitis Pigmentosa." Philadelphia: JB Lippincott, pp 125-149.
- Humphries P, Farrar JG, Keena P, McWilliam P (1990) Retinitis pigmentosa: Genetic mapping in X-linked and autosomal forms of the disease. *Clin Genet* 38:1-13.
- Inglehearn CF, Carter SA, Keen TJ, Lindesey J, Stephenson AM, Bashir R, Al-Maghteh M, Moore AT, Jay M, Bird AC, Bhattacharya SS (1993) A new locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 7p. *Nature Genet* 4:51-53.
- Jordan SA, Farrar GJ, Kenna P, Humphries M, Sheils DM, Kumar-Singh R, Sharp EM, Soriano N, Ayuso C, Benitez J, Humphries P (1993) Localization of an autosomal dominant retinitis pigmentosa gene to chromosome 7q. *Nature Genet* 4:54-57.
- Kajiura K, Hahn LB, Mukai S, Travis GH, Berson EL, Dryja TP (1991) Mutations in the human retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature* 354:480-483.
- McLaughlin ME, Sabberg MA, Berson EL, Dryja TP (1993) Recessive mutations in the gene encoding the  $\beta$ -subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 4:130-133.
- Miller SA, Dyke DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
- Ott J, Bhattacharya S, Chen JD, Denton MJ, Donald J, Dubay C, Farrar GJ, Fishman GA, Frey D, Gal A, Humphries P, Jay B, Jay M, Litt M, Mächler M, Musarella M, Neugebauer M, Nussbaum RL, Terwilliger JD, Weleber RG, Wirth B, Wong F, Worton RG, Wright AF (1990) Localizing multiple X chromosome-linked retinitis pigmentosa loci using multilocus homogeneity tests. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:701-704.
- Riess O, Noerremoele A, Weber B, Musarella MA, Hayden MR (1992) The search for mutations in the gene for the beta-subunit of the cGMP phosphodiesterase (PDEB) in patients with autosomal recessive retinitis-pigmentosa. *Am J Hum Genet* 51:755-762.
- Rosenfeld PJ, Cowley GS, McGee TL, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP (1992) A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 1:209-213.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Scott HS, Nelson PV, Hopwood JJ, Morris CP (1991) PCR of a VNTR linked to mucopolysaccharidosis type I and Huntington disease. *Nucleic Acids Res* 19:6348.
- Suber ML, Pittler SJ, Qin N, Wright GC, Holcombe V, Lee RH, Craft CM, Lolley RN, Baehr W, Hurwitz RL (1993) Irish setter dogs affected with rod/cone dysplasia contain a nonsense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3968-3972.
- Taylor SAM, Barnes GT, MacDonald ME, Guseilla JF (1992) A dinucleotide repeat polymorphism at the D4S127 locus. *Hum Mol Genet* 1:142.
- Weber B, Riess O, Daneshvar H, Graham R, Hayden R (1993) (CA)<sub>n</sub>-dinucleotide repeat at the PDEB locus in 4p16.3. *Hum Mol Genet* 2:827.



## ORIGINAL INVESTIGATION

Diana Valverde · Teresa Solans · Daniel Grinberg  
 Susana Balcells · Lluïsa Vilageliu · Mónica Bayés  
 Pilar Chivelet · Claude Besmond · Michel Goossens  
 Roser González-Duarte · Montserrat Baiget

## A novel mutation in exon 17 of the $\beta$ -subunit of rod phosphodiesterase in two RP sisters of a consanguineous family

Received: 28 February 1995 / Revised: 17 April 1995

**Abstract** We report the molecular analysis of the  $\beta$  subunit of the rod phosphodiesterase (PDEB) gene in a consanguineous autosomal recessive retinitis pigmentosa family that shows homozygosity for polymorphisms in the genomic region comprising this gene, and positive linkage between a PDEB marker and the disease. The two affected sisters are homozygous for a T to G transversion in codon 699 of the PDEB gene, leading to the substitution of a leucine by an arginine residue. This change, enclosed in the catalytic domain of the PDEB, could result in a modification of the protein structure preventing the physiological hydrolysis of cGMP.

### Introduction

Retinitis pigmentosa (RP) is a set of hereditary disorders that affects photoreceptor and pigment epithelial function. RP can be inherited as an autosomal dominant, autosomal recessive (ARRP), or X-linked disease. Results from a study of RP patients in Spain show that 12% of cases are inherited as an autosomal dominant trait, 39% are autosomal recessive, 4% are X-linked, whereas 41% are simplex cases. The genetic type has not been established in the remaining 4% (Ayuso et al. 1995). Several genes involved in the visual transduction cascade have been proposed as candidate genes for RP. With respect to ARRP, mutations in the genes encoding rhodopsin (Rosenfeld et al. 1992;

Kumaramanickavel et al. 1994), the  $\beta$  subunit of the phosphodiesterase (PDEB) (McLaughlin et al. 1993; Bayés et al. 1995a), and the rod cGMP gated channel (McGee et al. 1994) have been reported to be involved in a small percentage of cases.

Phosphodiesterase (PDE) is an heterotetrameric peripheral membrane-bound protein, composed of catalytic  $\alpha$  and  $\beta$  subunits, and two inhibitory  $\gamma$  subunits. Activated PDE hydrolyzes cGMP, resulting in the closure of the ion channels and leading to the hyperpolarization of the rod cell plasma membrane (Cote et al. 1994). Mutations in homologous genes in mice and Irish setter dogs are also responsible for retinal degenerations (Bowes et al. 1990; Suber et al. 1993). Based on these findings, we have undertaken the molecular analysis of the PDEB gene in a consanguineous ARRP family that shows homozygosity for polymorphisms in the genomic region comprising this gene, and positive linkage between a PDEB marker and the disease.

### Materials and methods

#### Subjects and clinical evaluation

A consanguineous RP family with two affected sisters (Fig. 1) was studied. The protocol for this study was approved by the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau Ethical Committee and consent was obtained from the participating patients and their relatives. Patients were assessed with best-corrected visual acuity, slit-lamp biomicroscopy, color vision test, ocular tension, perimetry, and electroretinography (ERG). In addition, both direct and indirect ophthalmoscopy were performed. ERG and visual evoked cortical potential tests (VECPs) were performed using conventional protocols.

#### Linkage and mutation analysis

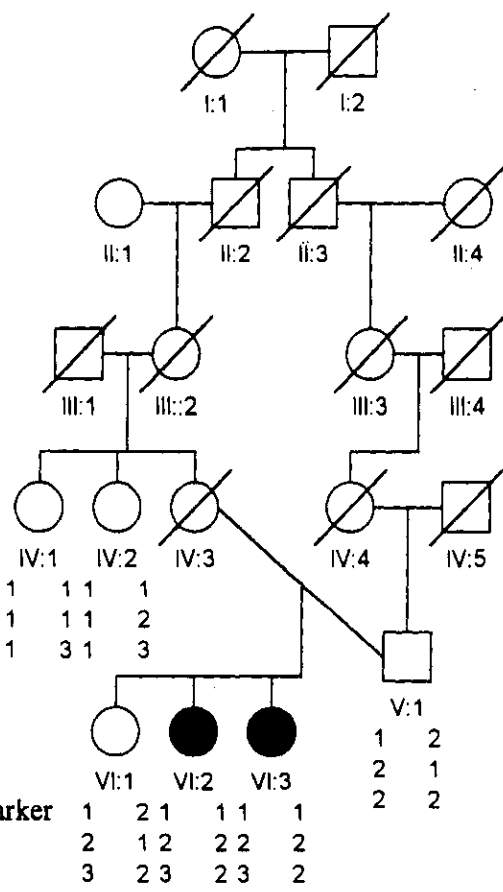
Genomic DNA was prepared from peripheral leukocytes by standard methods, and polymorphic markers at the PDEB locus (Weber et al. 1993), at D4S127 (Taylor et al. 1992), and at D4S111 (Scott et al. 1991) were analyzed. Two-point linkage analysis was performed using the MLINK programme from the LINKAGE package, version 5.1 (Lathrop et al. 1984). Homozygosity for the markers analyzed in the affected members of this consanguineous family was also considered a criterion in favor of PDEB involvement.

Diana Valverde · Montserrat Baiget (✉)  
 Unitat de Genètica Molecular, Hospital de Sant Pau,  
 Pare Claret 167, 08025 Barcelona, Spain

Teresa Solans · Pilar Chivelet  
 Servei d'Oftalmologia, Hospital de Sant Pau,  
 08025 Barcelona, Spain

Claude Besmond · Michel Goossens  
 Inserm U91, Hôpital Henri Mondor, 94010 Créteil, France

Mónica Bayés · Daniel Grinberg · Susana Balcells  
 Lluïsa Vilageliu · Roser González-Duarte  
 Departament de Genètica, Universitat de Barcelona,  
 08071 Barcelona, Spain



**Fig. 1** Pedigree of the consanguineous ARRP family in which the PDEB mutation segregates. Haplotypes below the pedigree symbols correspond to the polymorphisms indicated in the lower left corner

For single-strand conformation polymorphism (SSCP) analyses, genomic DNA from living family members was amplified with primers of the 22 exons and 196 bp of the 5' region of the PDEB gene, based on the sequence described by Riess et al. (1992). The samples were denatured at 94°C for 5 min, immediately cooled on ice, and 4 µl of each sample were loaded onto a 12% (1:29 bisacrylamide) polyacrylamide gel. Electrophoresis was performed without glycerol at room temperature, at 10 W for 6 h. Gels were silver-stained as described (Bayés et al. 1995b).

DNA presenting an abnormal mobility was amplified using primers identical to those designed for polymerase chain reaction amplification, and ligated into a TA cloning vector (Invitrogen). The product was sequenced using a Sequenase version 2.0 kit (US Biochemicals). The sequencing reaction products were electrophoresed on a 6% polyacrylamide denaturing gel. The gel was dried and autoradiographed overnight using Kodak X-OmatAR film.

## Results and discussion

Individuals VI.1 and VI.3 showed clinical findings typical of RP. Patient VI.2 is a 35-year-old female who has reported the absence of night vision since childhood. Now she has best-corrected visual acuity of 20/50 and visual fields constricted to about 15° diameter. Ophthalmoscopy revealed a generalized hypopigmented retinal pigment ep-

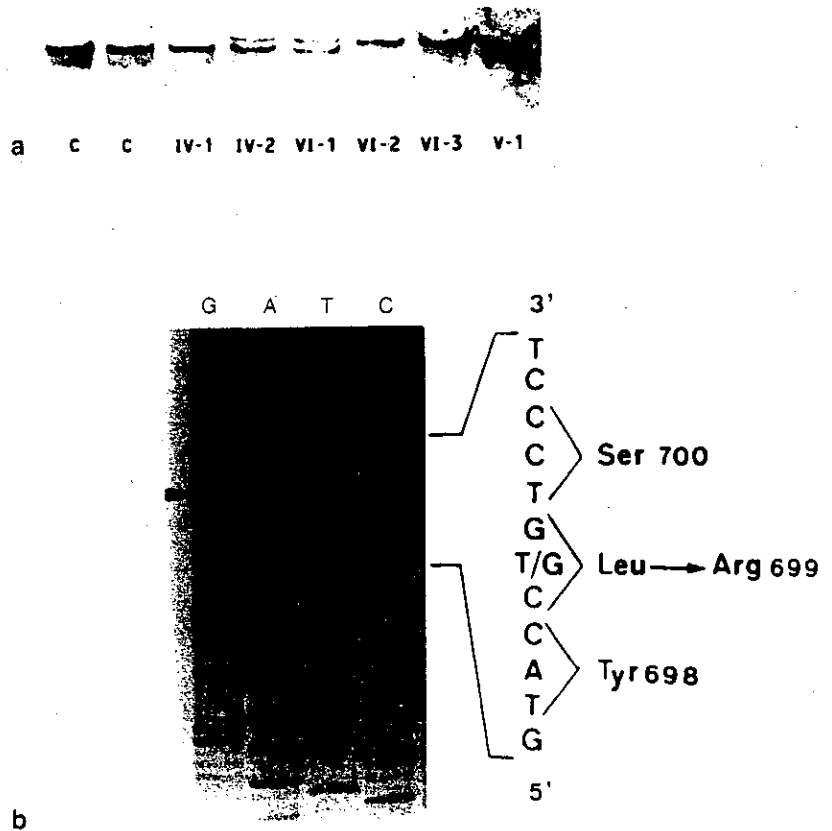
ithelium, attenuated retinal vessels, and typical intraretinal bone-spicule pigment in the midperiphery and around the periphery. Dim blue light ERG recordings appeared flat, revealing no detectable rod response. Photopic ERG recordings appeared within the normal ranges. The central retina and macular area, studied by registration of VECPs in response to a white flash, showed attenuated early waves and extended latency periods for N<sub>IV</sub> (of approximately 140 ms). Red light VECPs showed latencies of 120 ms in both eyes, reflecting better conserved fovea in comparison with the rest of the macular area. Intraocular pressure and color vision were normal in both eyes. Patient VI.3, is a 33-year-old female who has reported the absence of night vision since adolescence. At present, she has best-corrected visual acuity of 20/50 and visual fields constricted top about 12°–15° diameter. Ophthalmoscopy revealed a pattern of pigmentation and retinal vessels identical to that seen in her sister. Dim blue and white light ERG recordings showed a low voltage response (8 mV) in the right eye, whereas no response was recorded in the left eye. Registration of VECPs in the right eye showed a central retina and macular area pattern similar to that observed in VI.2: latency times could not be measured in the left eye because of an anarchic register. Intraocular pressure and color vision were normal in both eyes. The father (V.1) of these two RP patients, aged 65, reported no difficulty with night vision and had no fundus findings of RP.

A dinucleotide polymorphism located at the PDEB locus (Weber et al. 1993) was used to assay linkage to ARRP and to analyze homozygosity in the two affected sisters of this consanguineous family. The alleles of the PDEB marker showed cosegregation with the disease (lod score: 0.849 at  $\theta:0$ ), and the affected sisters were homozygous. The homozygosity analysis was extended to include markers located in the vicinity of the PDEB locus, and the haplotypes obtained are shown in Fig. 1.

SSCP screening of the 22 exons of the PDEB gene revealed a normal pattern in all exons except for exon 17. The two affected sisters (VI.2 and VI.3) had an altered migration band compared with the controls. The SSCP pattern in IV.2, V.1, and VI.1 indicates that they are probably heterozygous carriers of the mutation (Fig. 2). Sequence analysis revealed a T to G transversion at position 2117 (Fig. 2), resulting in the substitution of a neutral hydrophobic leucine to a hydrophilic arginine amino acid at codon 699 of the mature PDEB protein.

Rod photoreceptor cell cGMP-specific PDE is a key enzyme in phototransduction. In the signaling cascade, photoexcited rhodopsin activates, via transducin, PDE, which hydrolyses intracellular cGMP. This results in a decrease of the intracellular concentrations of cGMP, a reactive hyperpolarization of the plasma membrane, and thereby, visual signaling. Inactivation of PDE by mutations in the PDEB gene would lead to reduced enzyme activity and, consequently, high rod cGMP levels. It has been suggested that accumulation of cGMP is deleterious for the photoreceptor cells (Lolley et al. 1977). The T to G transversion reported here results in the substitution of a

**Fig. 2** a SSCP analysis of exon 17 of the PDEB gene of the members of the pedigree and two normal controls (*C*). b Sequence analysis in the region around nucleotide 699. The T to G base change is indicated by the *arrowhead*



neutral hydrophobic leucine to a hydrophilic charged arginine residue at codon 699 of the mature PDEB protein. The catalytic site of the cGMP hydrolysis has been assigned to the peptide region between residues 555–790 in the human protein. Therefore, the T to G change enclosed in this catalytic domain would probably involve a structural modification restraining, or perhaps even preventing, the physiological hydrolysis of cGMP.

Four mutations in the PDEB gene have been described, in heterozygous form, in patients of non-consanguineous ARRP families (McLaughlin et al. 1993). More recently, a homozygous tandem duplication in exon 1 of the same gene was reported as being the cause of the disease in a consanguineous ARRP pedigree (Bayés et al. 1995a). In the present work, three factors clearly suggest the involvement of the missense mutation in the photoreceptor degeneration diagnosed in the family: (1) the homozygosity of the mutation in the two RP patients of this ARRP consanguineous family, (2) the location (in the catalytic domain of the protein) and the nature of the mutation (the substitution of a neutral residue by a charged one), and (3) the failure to detect the same DNA change in 100 chromosomes of unaffected controls.

**Acknowledgements** This work was supported by CICYT (SAF93-0479-CO2-01), FIS (95/1953), and the Federación de Asociaciones de Afectados por Retinosis Pigmentaria del Estado Español (FAARPE).

## References

- Ayuso C, Garcia-Sandoval B, Najera C, Valverde D, Carballo M, Antiñolo G (1995) Retinitis pigmentosa in Spain. *Clin Genet* 48: 120–122
- Bayés M, Giordano M, Balcells S, Grinberg D, Vilageliu LI, Martínez I, Ayuso C, Benítez J, Ramos MA, Chivelet P, Solans T, Valverde D, Anselm S, Goossens M, Baiget M, González-Duarte R, Besmond C (1995a) Homozygous tandem duplication within the gene encoding the  $\beta$  subunit of rod phosphodiesterase as a cause for autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* 5: 228–234
- Bayés M, Valverde D, Balcells S, Grinberg D, Vilageliu LI, Benítez J, Ayuso C, Beneyto M, Baiget M, González-Duarte R (1995b) Evidence against involvement of recoverin in autosomal recessive retinitis pigmentosa in 42 Spanish families. *Hum Genet* 96: 89–94
- Bowes C, Li T, Dancinger M, Baxter LC, Applebury ML, Farber DB (1990) Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the  $\beta$  subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* 347: 677–680
- Cote RH, Bownds MD, Arshavsky VY (1994) cGMP binding sites on photoreceptor phosphodiesterase: role in feedback regulation of visual transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4845–4849
- Kumaramanickavel G, Maw M, Denton MJ, John S, Srisailapathy CR, Orth U, Oehlmann R, Gal A (1994) Missense rhodopsin mutation in a family with recessive RP. *Nature Genet* 8: 10–11
- Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J (1984) Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3443–3446
- Lolley RN, Farber DB, Rayborn ME, Hollyfield JG (1977) Cyclic GMP accumulation causes degeneration of photoreceptor cells: simulation of an inherited disease. *Science* 196: 664–666

- McGee TL, Lin D, Berson EL, Dryja TP (1994) Defects in the rod cGMP-gated channel gene in patients with retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:1716
- McLaughlin ME, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP (1993) Recessive mutations in the gene encoding the  $\beta$  subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 4:130-133
- Riess O, Noerremoele A, Weber B, Musarella MA, Hayden MR (1992) The search for mutations in the gene for the beta subunit of the cGMP phosphodiesterase (PDEB) in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 51:755-762
- Rosenfeld PJ, Cowley GS, McGee TL, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP (1992) A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 1:209-213
- Scott HS, Nelson PV, Hopwood JJ, Morris CP (1991) PCR of a VNTR linked to mucopolysaccharidosis type I and Huntington disease. *Nucleic Acids Res* 19:6348
- Suber ML, Pittler SJ, Qin N, Wright GC, Holcombe V, Lee RH, Craft CM, Lolley RN, Baehr W, Hurwitz RL (1993) Irish setter dogs affected with rod/cone dysplasia contain a nonsense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta subunit gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3968-3972
- Taylor SAM, Barnes GT, McDonald ME, Gusella JF (1992) A dinucleotide repeat polymorphism at the D4S127 locus. *Hum Mol Genet* 1:142
- Weber B, Riess O, Daneshvar H, Graham R, Hayden R (1993) (CA)<sub>n</sub>-dinucleotide repeat at the PDEB locus in 4p16.3. *Hum Mol Genet* 2:827

IDENTIFICATION OF A NOVEL ARG552GLN MUTATION IN EXON 13 OF THE  $\beta$ -SUBUNIT OF ROD PHOSPHODIESTERASE GENE IN A SPANISH FAMILY WITH AUTOSOMAL RECESSIVE RETINITIS PIGMENTOSA.

Diana Valverde<sup>1</sup>, Montserrat Baiget<sup>1</sup>, Ramón Seminago<sup>1</sup>, Elisabeth del Rio<sup>1</sup>, Blanca García-Sandoval<sup>2</sup>, Teresa del Rio<sup>2</sup>, Mónica Bayés<sup>3</sup>, Susana Balcells<sup>3</sup>, Amalia Martínez<sup>3</sup>, Daniel Grinberg<sup>3</sup>, Carmen Ayuso<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

<sup>2</sup>Fundación Jimenez Diaz. Madrid.

<sup>3</sup>Facultat de Biologia. Universidad de Barcelona. Barcelona.

Corresponding author:

Montserrat Baiget

Unitat de Genètica Molecular

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Pare Claret 167

08025 Barcelona. Spain.

Telf: 34.3.2919194/ 2919361

Fax: 34.3.2919192

Aceptado para su publicación en Human Mutation

In this report, we describe an homozygous G to A transition in exon 13 of the PDEB in two sibs of an autosomal recessive retinitis pigmentosa family. This is the third mutation in this gene associated with the disease in consanguineous Spanish families (Bayés et al., 1995; Valverde et al., 1995).

Polymorphic markers at the PDEB locus were analyzed. The alleles showed cosegregation and homozygosity in the two patients. For SSCP analyses, 22 exons and 196 bp of the 5' region of the PDEB gene were screened. Primers were derived from Riess et al (1992). The samples corresponding to the two affected RP patients had an altered migration band in exon 13 compared with controls while the SSCP pattern in both parents suggest that they are heterozygous carriers of the mutation. Sequence analysis was performed on the PCR product of exon 13 and a G to A transition in codon 552 was detected. This change results in the substitution of a hydrophilic arginine aminoacid by a neutral glutamine residue.

Rod photoreceptor cell cGMP-specific PDE is a key enzyme in phototransduction: inactivation of PDE by mutations in PDEB would led to accumulation of rod cGMP and it has been suggested that this is deleterious for the photoreceptor cells (Lolley et al., 1977). The catalytic site of the cGMP hydrolysis has been assigned to the peptide region between residues 555-790 in the human protein. Therefore, the G to A change close to this catalytic core would involve a modification in the structural conformation of the protein that would disturb the physiological hydrolysis of cGMP.

## REFERENCES

Bayés M, Giordano M, Balcells S, Grinberg D, Vilageliu Ll, Martinez I, Ayuso C, Benitez J, Ramos MA, Chivelet P, Solans T, Valverde D, Anselem S, Goossens M, Baiget M, González-Duarte R, Besmond C. (1995) Homozygous tandem duplication within the gene encoding the  $\beta$  subunit of rod phosphodiesterase as a cause for autosomal recessive retinitis pigmentosa. Hum Mutat 5:228-234.

Lolley RN, Farber DB, Rayborn ME, Hollyfield JG. (1977). Cyclic GMP accumulation causes degeneration of photoreceptor cells: Simulation of an inherited disease. Science 196:664-666

Riess O, Noerremoelle A, Weber B, Musarella MA, Hayden MR (1992). The search for mutations in the gene for the beta subunit of the cGMP phosphodiesterase (PDEB) in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. Am J Hum Genet 51:755-762.

Valverde D, Solans T, Grinberg D, Balcells S, Vilageliu Ll, Bayés M, Chivelet P, Besmond C, Goossens M, González-Duarte R, Baiget M. (1995). A novel mutation in exon 17 of the  $\beta$  subunit of rod phosphodiesterase in two RP sisters of a consanguineous family. Hum Genet (in press).

## Acknowledgements

This work was supported by FIS (95/1953) and FAARPE (Federación de Asociaciones de Afectados por Retinosis Pigmentaria del Estado Español).



UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
Servicio de Bibliotecas



1700759637