

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. ESTUDIO GENETICO DIRECTO EN FAMILIAS RPAD

Se exponen los resultados que se han obtenido tras el análisis molecular de seis de los genes asociados a RPAD: RHO (ADNc y región promotora), RDS-periferina, ROM1, RP1, NRL y CRX en 150 casos índice RPAD y 100 casos SRP.

En el caso del gen RDS-periferina se añadieron en el estudio siete casos índices afectados de DMAD.

El cribado y la determinación de mutaciones en estos genes se realizaron mediante las técnicas de PCR (aptdo.III.4.2.), DGGE (aptdo.III.4.3.1.), SSCP (aptdo.III.4.3.2.), secuenciación automática (aptdo.III.4.4.) y análisis con enzimas de restricción, cuando ha sido posible (aptdo. III.4.5.).

En caso de encontrar mutación en un caso índice se extendió el estudio a la familia entera.

La simbología empleada para realizar el árbol genealógico de cada familia estudiada es común para todas ellas: las mujeres son representadas con un círculo y los varones con un cuadrado, los individuos afectados se sombreamos en negro, los asintomáticos portadores y no portadores se representan con un punto en su interior y en blanco respectivamente.

Las bandas que se observan en las fotografías de DGGE, en el caso de detectarse mutación, corresponden a las moléculas de ADN homodúplex (M/M; WT/WT) y heterodúplex (M/WT) que se han formado tras la desnaturalización y el reanillamiento de éstas moléculas en los últimos ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los apareamientos incorrectos de los heterodúplex reducen significativamente su temperatura de fusión y por tanto su migración en el gel desnaturalizante es menor que la de los homodúplex, lo que permite una mejor separación y una fácil detección visual de las mutaciones.

La secuenciación de los fragmentos de PCR, una vez detectado un patrón electroforético anormal, se ha realizado sobre ambos sentidos de la cadena de ADN lo que nos permitió estar seguros de los resultados obtenidos (en este apartado sólo se presenta un pequeño fragmento de la secuencia, en un solo sentido, que abarca la mutación detectada).

Se presentan análisis de restricción familiares en los casos en los que se ha aprovechado que la mutación crea o destruye una diana de restricción, para comprobar la co-segregación de la mutación con la enfermedad dentro de la familia.

Todas las mutaciones se han encontrado en heterocigosis excepto la mutación Gly188Arg (RHO), que aparece en homocigosis y en heterocigosis dentro de la misma familia. En este caso la simbología del árbol genealógico varía, los sujetos afectados por la enfermedad se representan con fondo enteramente negro en el caso homocigoto, y parcialmente negro para los casos heterocigotos.

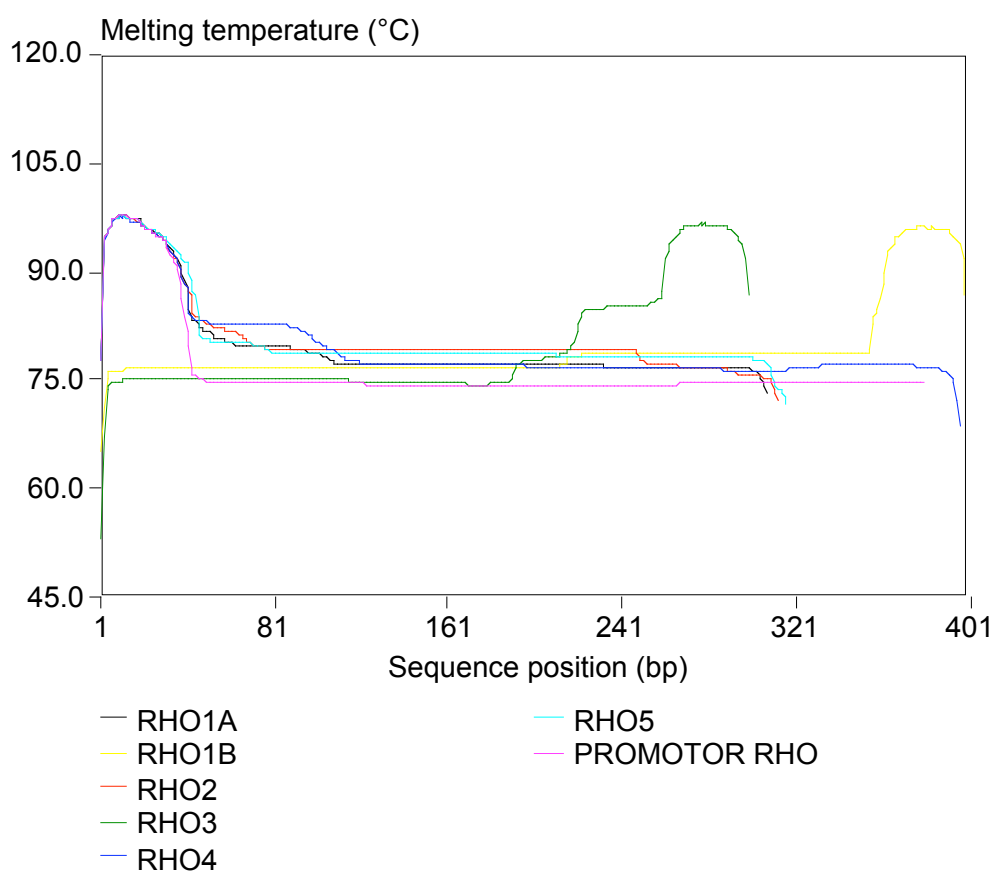
Se describen los casos en los que se ha detectado la mutación causante de la enfermedad. En estos casos se extendió el análisis a la familia y se correlacionó la presencia de mutación con la manifestación de la enfermedad (co-segregación).

IV.1.1. Gen RHO

Se amplificaron los seis fragmentos de ADN que contienen las secuencias codificantes y contiguas del gen (1A, 1B, 2, 3, 4 y 5). Se analizaron un total de 90 pacientes índices, afectados de RPAD y 100 casos SRP.

Se extendió el análisis a la región 5' del gen, desde el nucleótido 5092 al 5406 (Nº acceso: U16824).

A continuación se presenta el resultado del análisis, mediante el programa informático WinMelt (*BioRad*), de los distintos dominios de fusión de los fragmentos del gen RHO analizados. Este análisis ha sido necesario para aproximar el gradiente desnaturalizante necesario en cada caso para el cribado de mutaciones mediante la técnica de DGGE (aptdo. III.4.3.1.).



IV.1.1.1. Caracterización de mutaciones y polimorfismos

Las mutaciones y polimorfismos detectados junto con algunos datos clínicos se detallan en la siguiente tabla:

| Mutación | Cambio de base | Dominio (proteína) | Fenotipo RP | Década Inicio | Evolución a ceguera legal |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| Asn15Ser | A <u>A</u> T→A <u>G</u> T | Intradiscal | Regional | Variable | Lenta, variable |
| Thr17Met | A <u>C</u> G→A <u>T</u> G | Intradiscal | Regional | Variable | Lenta, variable |
| Leu40Pro | C <u>I</u> G→C <u>C</u> G | Transmembrana | | 1 ^a | 4 ^a década |
| Arg135Trp | <u>C</u> GG→ <u>I</u> GG | Citoplasmático | Difuso | 2 ^a | 4 ^a década |
| Ala164Glu | G <u>C</u> G→G <u>A</u> G | Transmembrana | Difuso | 2 ^a | 4 ^a década |
| Splicing 2ºIntr | A-G3811-2nt | --- | No clasificada | 2 ^a -7 ^a | Variable |
| Gly188Arg | <u>G</u> GA→ <u>A</u> GA | Intradiscal | Difuso/atípico | 1 ^a | 6 ^a -7 ^a década |
| Asp190Tyr | <u>G</u> AC→ <u>T</u> AC | Intradiscal | Regional | Variable | Variable |
| Pro215Leu | C <u>C</u> G→C <u>I</u> G | Transmembrana | Difuso | 1 ^a | 4 ^a década |
| Thr289Pro | <u>A</u> CC→ <u>I</u> CC | Transmembrana | Difuso | 2 ^a | 5 ^a década |
| Val345Gly | G <u>I</u> G→G <u>G</u> G | Citoplasmático | Difuso | 2 ^a | 5 ^a década |
| Pro347Leu | C <u>C</u> G→C <u>I</u> G | Citoplasmático | Difuso | 1 ^a | 3 ^a década |

| Mutación Silenciosa | Cambio de base |
|----------------------------|---------------------------|
| Gly120Gly | G <u>G</u> C→G <u>G</u> I |
| Thr160Thr | A <u>C</u> C→A <u>C</u> A |
| Cys323Cys | T <u>G</u> C→T <u>G</u> I |

| Polimorfismo | Localización | Frecuencia Alélica |
|---------------------|---------------------|---------------------------|
| C3982T (Rsal-RFLP) | Intrón 3 | 0.12 |
| C5321A (Fok 1) | 3'UTR | 0.12 |

La mutación Pro347Leu se ha encontrado en otras cuatro familias RPAD independientes, mientras que el resto de mutaciones se han detectado una única vez en familias RPAD españolas.

Doce de las mutaciones observadas son del tipo “missense”, es decir generadoras de cambio de aminoácido, y una de ellas se localiza en la región de empalme (“splicing”) del intrón 2 del gen.

Todas las mutaciones han sido detectadas en heterocigosis salvo la mutación Gly188Arg que se encuentra en homocigosis y en heterocigosis dentro de la misma familia.

Además de las mutaciones en la secuencia codificante del gen que provocan cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína y son responsables de la enfermedad retiniana, se han encontrado otros cambios en el gen que no comportan la enfermedad asociada. Estos cambios son mutaciones sinónimas o silenciosas (no generan cambio de aminoácido) que no co-segregan con la enfermedad, Gly120Gly, Thr160Thr y Cys323Cys, y polimorfismos frecuentes tanto en pacientes como en población general sana, C3982T (RsaI-RFLP), C5321A (FokI), que se detectaron en este estudio mediante la técnica de DGGE.

No se han detectado polimorfismos ni mutaciones causantes de RPAD en la región 5'UTR del gen, descrita anteriormente, en ninguno de los casos analizados. Tampoco se ha detectado el polimorfismo A269G (SacII-RFLP) asociado a esta región y que se observa con una frecuencia de 0.17 entre la población. La técnica utilizada para el cribado de mutaciones, DGGE, no detecta este polimorfismo.

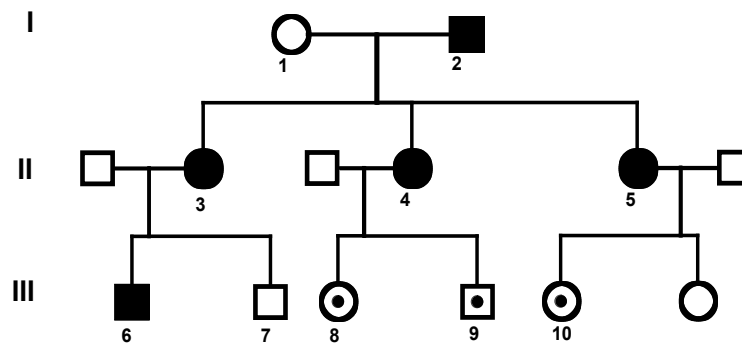
IV.1.1.2. Análisis familiar

Una vez localizada la mutación en el caso índice se procede a comprobar la co-segregación de la mutación con la enfermedad en el resto de la familia.

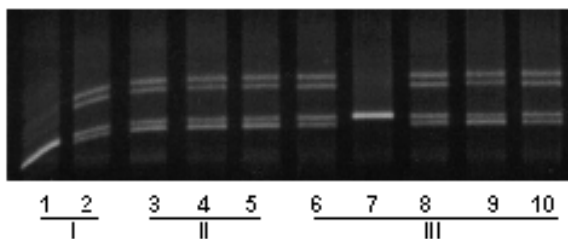
RPAD V873; Asn15Ser; AAT→AGT; RHO 1A

Los individuos III.8, III.9 y III.10, son portadores asintomáticos.

A)



B)



C)

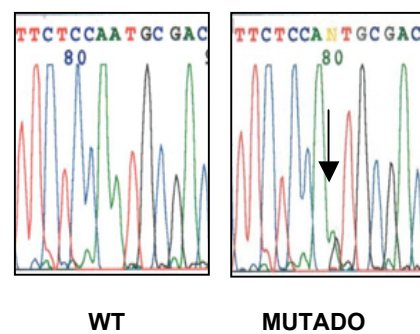


Figura 21. Familia RPAD V873; Asn15Ser; AAT→AGT; RHO 1A; **A.** Árbol genealógico; **B.** DGGE; **C.** Secuenciación automática.

RPAD V9; Thr17Met; $\text{ACG} \rightarrow \text{ATG}$; RHO1A

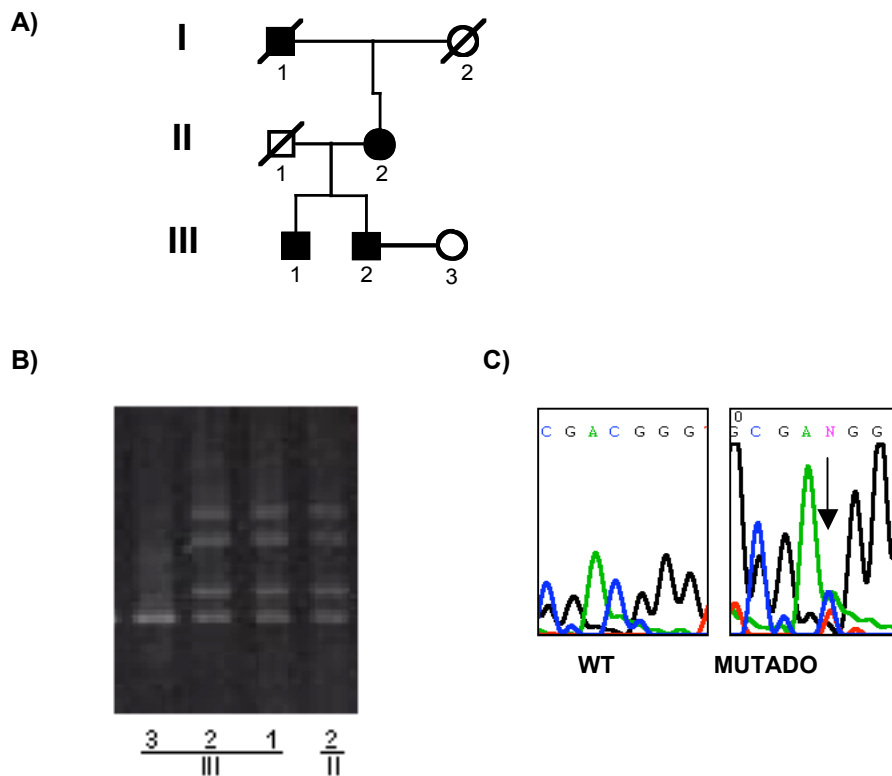


Figura 22. Familia RPAD V9; Thr17Met; $\text{ACG} \rightarrow \text{ATG}$; RHO1A; **A.** Árbol genealógico; **B.** DGGGE; **C.** Secuenciación automática.

RPAD 279; Leu40Pro; $\text{CTG} \rightarrow \text{CCG}$; RHO 1A

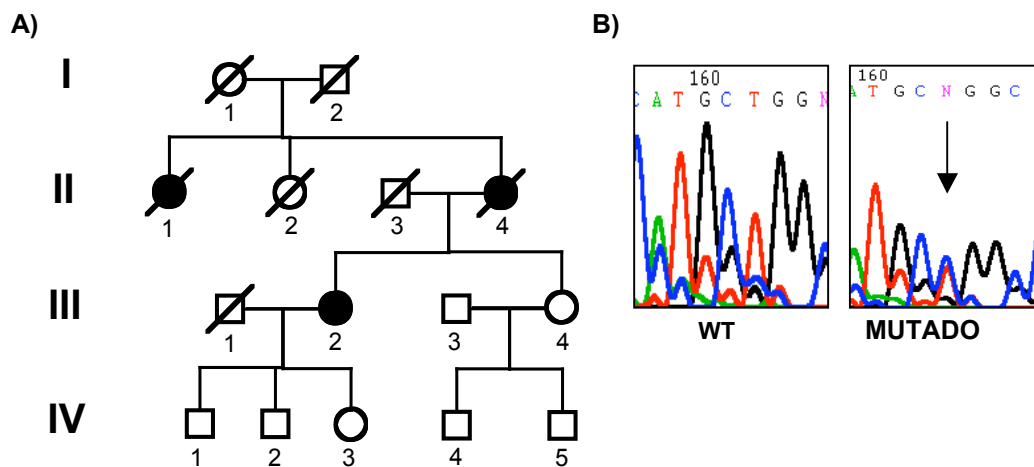
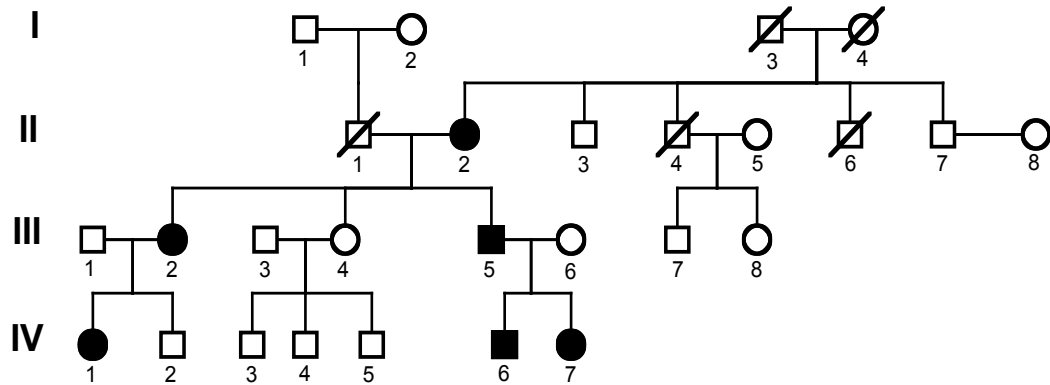


Figura 23. Familia RPAD 279; Leu40Pro; $\text{CTG} \rightarrow \text{CCG}$; RHO 1A; **A.** Árbol genealógico; **B.** Secuenciación automática.

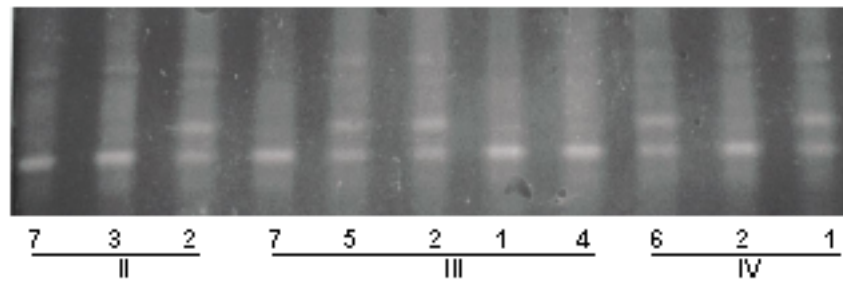
RPAD 314; Arg135Trp; CGG→TGG; RHO 2

La DGGE resuelve los homodúplex de los individuos que presentan la mutación, los heterodúplex no llegan a resolverse bien en la electroforesis.

A)



B)



C)

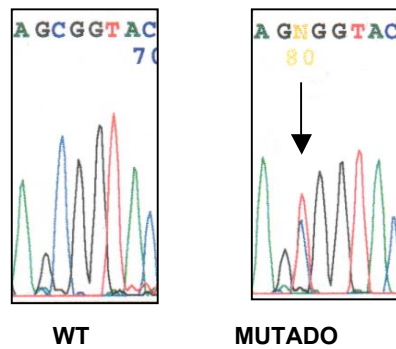


Figura 24. Familia RPAD 314; Arg135Trp; CGG→TGG; RHO 2; **A.** Árbol genealógico; **B.** DGGE; **C.** Secuenciación automática.

RPAD 262; Ala164Glu; GCG→GAG; RHO 2

Se aprecia en la DGGE, aunque con baja resolución en este caso, un patrón electroforético distinto en las muestras correspondientes a los individuos afectados respecto al de los sanos.

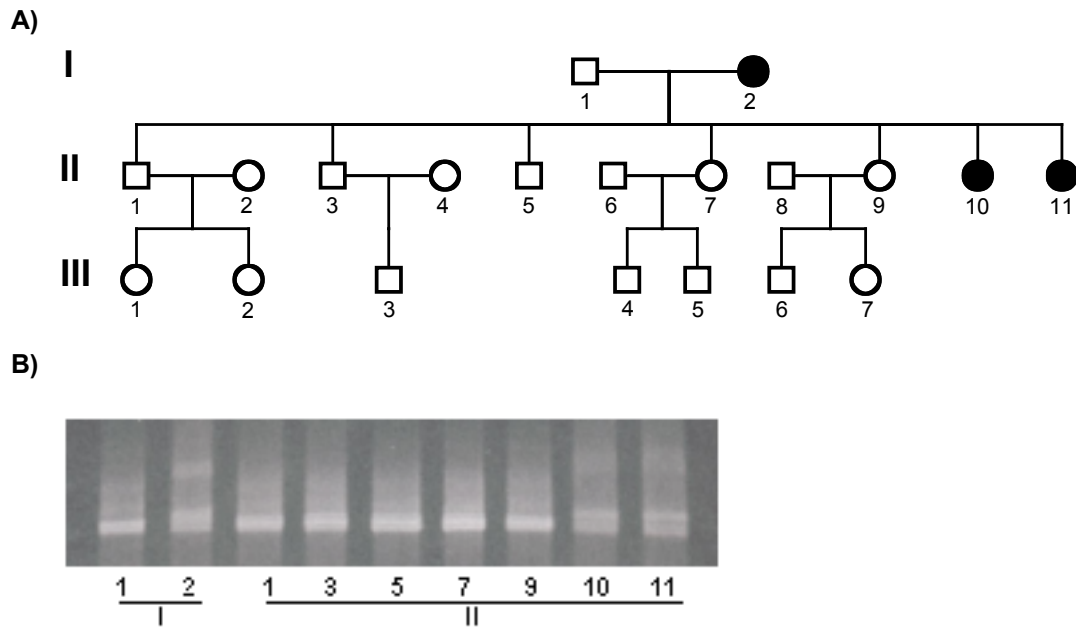


Figura 25. Familia RPAD 262; Ala164Glu; GCG→GAG; RHO 2; **A.** Árbol genealógico; **B.** DGGE.

RPAD Z111; A-G3811-2nt; (Splicing 2º Intrón)

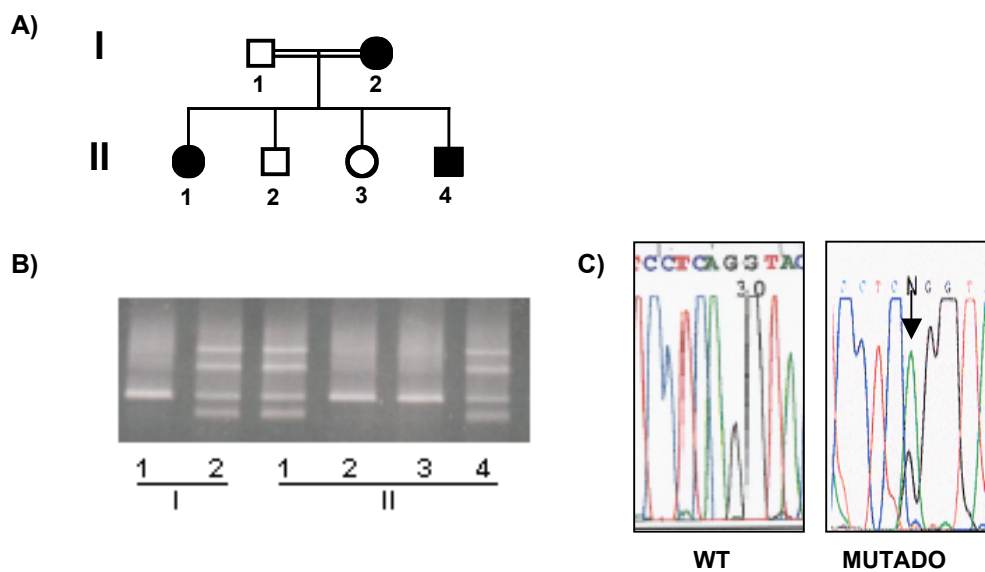


Figura 26. Familia RPAD Z111; A-G3811-2nt; (Splicing 2º Intrón); AGG→GGG; RHO 3; **A.** Árbol genealógico; **B.** DGGE; **C.** Secuenciación automática.

RPAD Z68; Gly188Arg; GGA→AGA; RHO 3

La DGGE permite, comparando los distintos patrones electroforéticos, distinguir entre un paciente control sin mutación, los pacientes que son portadores de la mutación en heterocigosis (cuyo patrón electroforético muestra las cuatro bandas correspondientes a los dos homodúplex y heterodúplex respectivamente formados en los últimos ciclos de la PCR) y el paciente que presenta la mutación en homocigosis (IV.1), en el que la única banda que se enfoca se encuentra al mismo nivel que la banda del homodúplex mutado.

La primera secuencia, siguiendo un orden descendente, corresponde a un individuo control sin mutación, la segunda corresponde al individuo V.2 y muestra la mutación en heterocigosis y la última secuencia corresponde al individuo IV.1 donde se puede apreciar la transición de una G por una A en homocigosis.

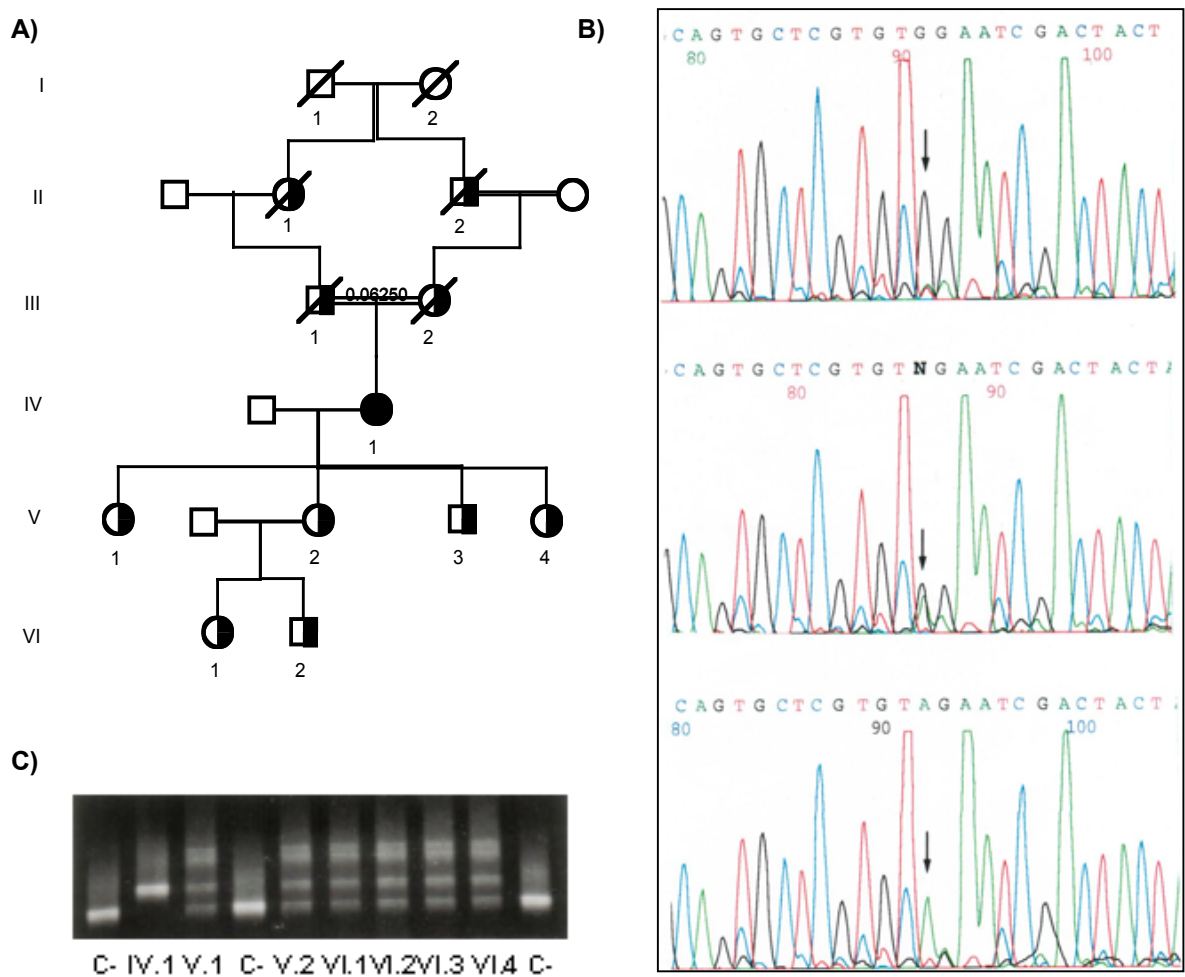


Figura 27. Familia RPAD Z68; Gly188Arg; GGA→AGA; RHO 3; **A.** Árbol genealógico; **B.** Secuenciación automática; **C.** DGGE.

La siguiente tabla muestra algunos datos clínicos, oftalmológicos (CV, AV) y electrofisiológicos (ERG) de todos los miembros de la familia analizados:

| Individuo | Edad (años) | Inicio CN* (años) | Inicio ↓CV* (años) | Pérdida visión (años) | CV* (actual) | ERG* (actual) Bastones/Conos | AV* (actual) D*/I* |
|-----------|-------------|-------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------|
| IV.1 | 60 | 27 | 32 | 33 | Escot. Abs. Bilateral | A / A | D p.l./I p.l. |
| V.1 | 36 | 5 | 32 | 36 | Tubular | A / D | D 1/I 0.2 |
| V.2 | 34 | 10 | 15 | no | 30° centrales | A / MD | D 0.7/I 0.3 |
| V.3 | 29 | 5 | 25 | 29 | Constricción periférica | A / N | D 0.3/I 0.8 |
| V.4 | 27 | 7 | 23 | 23 | Constricción periférica | A / N | D 0.15/I 0.7 |
| VI.1 | 3,5 | 3 | -- | no | -- | -- | D 0.2/I 0.2 |
| VI.2 | 2,5 | -- | -- | no | -- | -- | -- |

* CN, ceguera nocturna; CV, campo visual; ERG, electroretinograma; AV, agudeza visual (D, ojo derecho; I, ojo izquierdo)
 ERG: A: Abolido; D: Disminuido; MD: Muy Disminuido; N: Normal.
 Esc.: Escotoma; Abs.: Absoluto.

RPAD 188; Asp190Tyr; GAC→TAC; RHO 3

La siguiente tabla muestra algunos datos clínicos, oftalmológicos (CV, AV) y electrofisiológicos (ERG) de todos los miembros de la familia analizados.

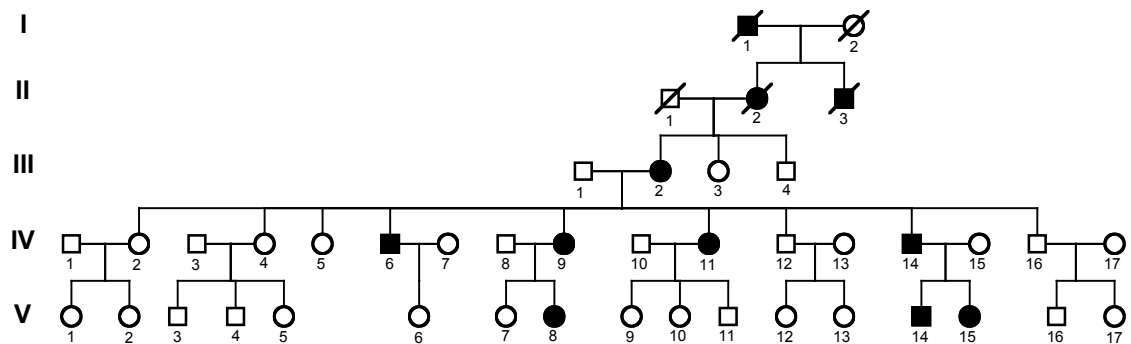
| Individuo | Edad (años) | Inicio CN* (años) | Inicio ↓CV* (años) | Inicio ↓AV* (años) | CV* (actual) | ERG* (actual) | AV* (actual) D*/I* |
|-----------|-------------|-------------------|--------------------|--------------------|------------------------------------|---------------|--------------------|
| III.2 | 80 | 20 | 18 | 45 | No colabora | Abolido | D < 0,1 / I < 0,1 |
| IV.1 | 54 | -- | -- | -- | Normal | Normal | D 0,8 / I 0,8 |
| IV.2 | 52 | -- | -- | -- | Normal | Normal | D 0,8 / I 0,8 |
| IV.3 | 50 | -- | -- | -- | D normal / I escotomas periféricos | Normal | D 0,1 / I 0,1 |
| IV.4 | 48 | 12 | -- | -- | Central tubular | Abolido | D 0,4 / I 0,5 |
| IV.7 | 46 | -- | 36 | -- | Central (+ afección superior) | Abolido | D 0,3 / I 0,6 |
| IV.9 | 47 | 18 | 18 | 42 | Escotoma temporal superior | Abolido | D < 0,1 / I 0,5 |
| IV.10 | 45 | -- | -- | -- | Normal | Normal | D 0,1 / I 0,1 |
| IV.11 | 43 | 7 | 14 | -- | Constricción periférica + escotoma | Abolido | D 0,8 / I 0,6 |
| IV.13 | 39 | -- | -- | -- | Normal | Normal | D 0,7 / I 0,7 |
| V.6 | 14 | -- | -- | -- | Normal | Normal | D 0,1 / I 0,1 |
| V.7 | 20 | -- | -- | -- | Normal | Normal | D 0,6 / I 0,6 |
| V.8 | 16 | 15 | -- | -- | Escotoma superior | -- | D 0,5 / I 0,6 |
| V.9 | 21 | -- | -- | -- | Normal | Normal | D 0,1 / I 0,1 |
| V.10 | 19 | -- | -- | -- | Normal | Normal | D 0,1 / I 0,1 |
| V.11 | 20 | -- | -- | -- | Normal | Normal | D 0,1 / I 0,1 |
| V.14 | 17 | 4 | 10 | 14 | Escotoma temporal | Abolido | D 0,5 / I 0,4 |
| V.15 | 4 | -- | -- | -- | No colabora | No colabora | D 0,2 / I 0,2 |

* CN, ceguera nocturna; CV, campo visual; ERG, electroretinograma; AV, agudeza visual (D, ojo derecho; I, ojo izquierdo)

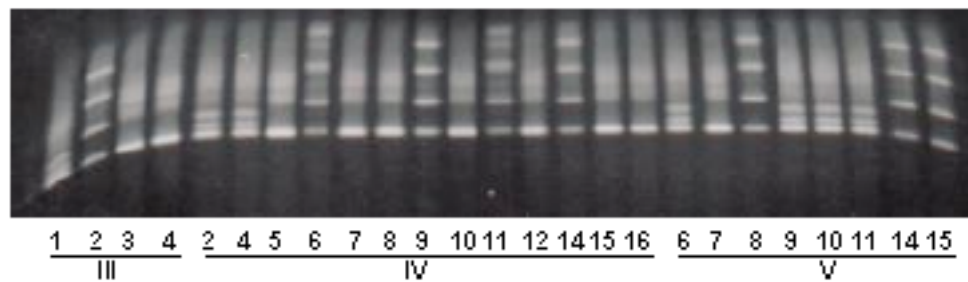
En el estudio de esta familia se puede apreciar, además de la co-segregación de la mutación con la enfermedad, que los individuos identificados en el árbol como III.1, IV.2, IV.4, V.6, V.9, V.10 y V.11 presentan un patrón electroforético característico del polimorfismo C3982T. Los individuos IV.6 y IV.11 presentan tanto la mutación como el polimorfismo y por ello también presentan un patrón electroforético distinto.

La mutación en este caso destruye una diana de restricción TaqI. Así, se generan dos fragmentos de 174 y 126 pb que corresponden a la digestión del alelo salvaje, además del fragmento no digerido de 300 pb que corresponde al alelo mutado, en las muestras analizadas de los individuos con mutación.

A)



B)



C)

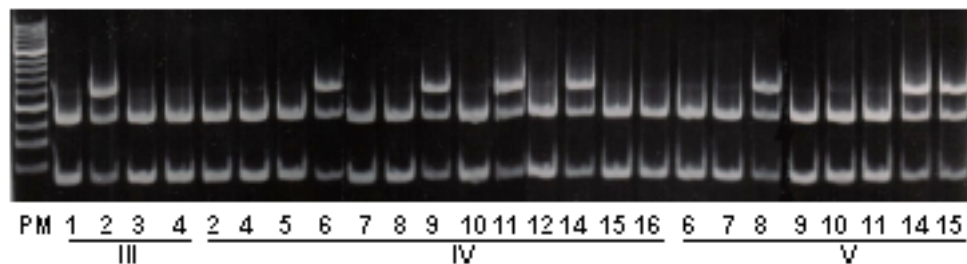


Figura 28. Familia RPAD 188; Asp190Tyr; GAC→IAC; RHO 3; A. Árbol genealógico; B. DGGE; C. Análisis de restricción (Taq I).

RPAD Z106; Pro215Leu; CCC→CTC; RHO 3

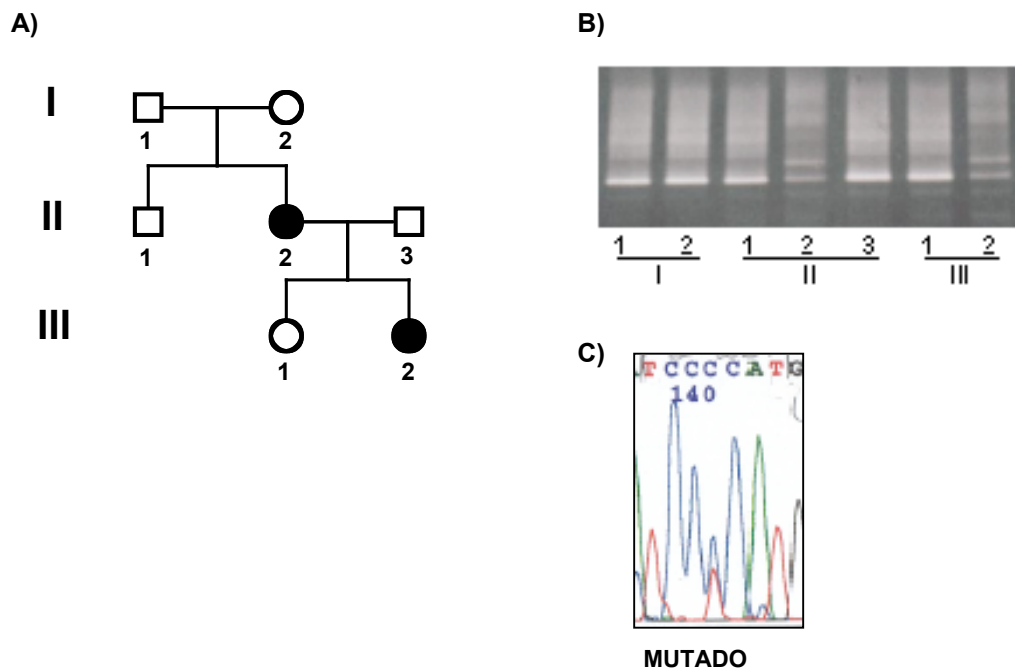


Figura 29. Familia RPAD Z106; Pro215Leu; CCG→CTG; RHO 3; **A.** Árbol genealógico; **B.** DGGE; **C.** Secuenciación automática.

RPAD 206; Thr289Pro; ACC→TCC; RHO 4

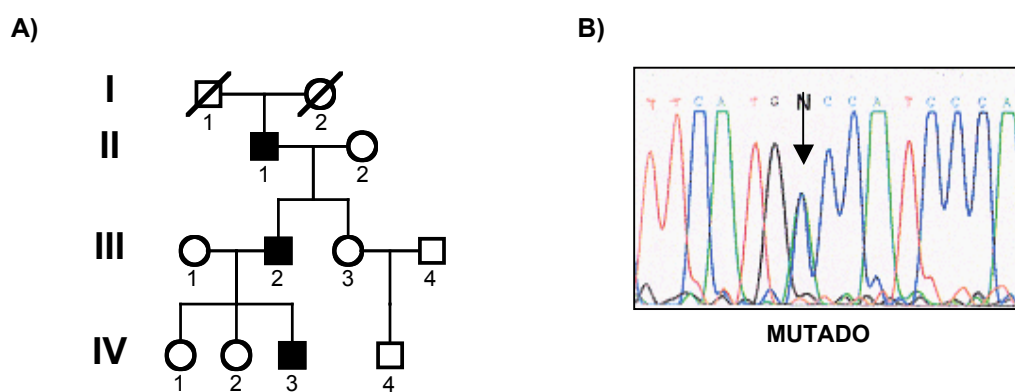
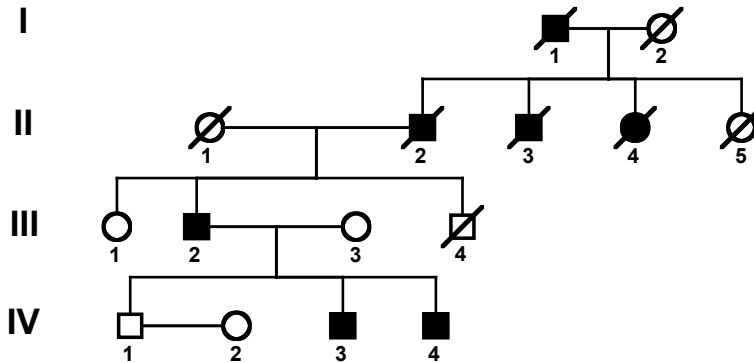


Figura 30. Familia RPAD 206; Thr289Pro; ACC→TCC; RHO 4; **A.** Árbol genealógico; **B.** Secuenciación automática.

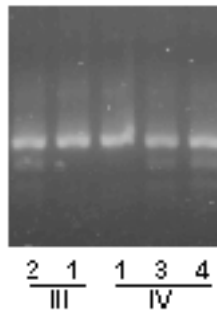
RPAD 290; Val345Gly; GTG→GGG; RHO 5

La mutación crea una diana de restricción Apal. Se generan dos fragmentos de 164 y 117 pb además del fragmento no digerido de 281 pb que corresponde al alelo salvaje en las muestras analizadas de los individuos con mutación.

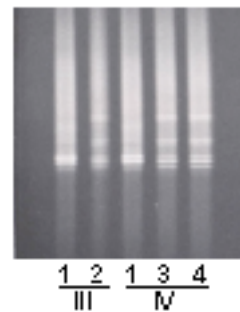
A)



B)



C)



D)

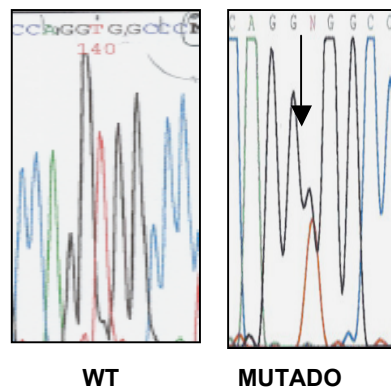
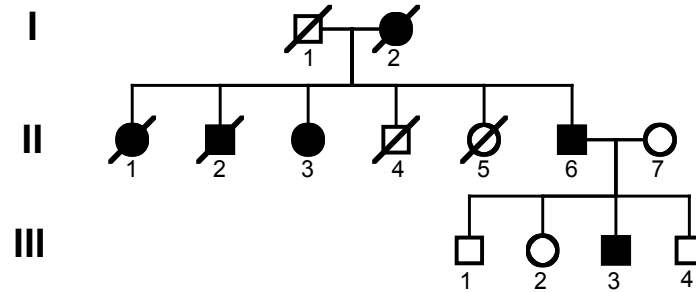


Figura 31. Familia RPAD 290; Val345Gly; GTG→GGG; RHO 5; **A.** Árbol genealógico; **B.** Análisis de restricción (Apal); **C.** DGGE; **D.** Secuenciación automática.

RPAD 542; Pro347Leu; CCG→CTG; RHO 5

A)



B)

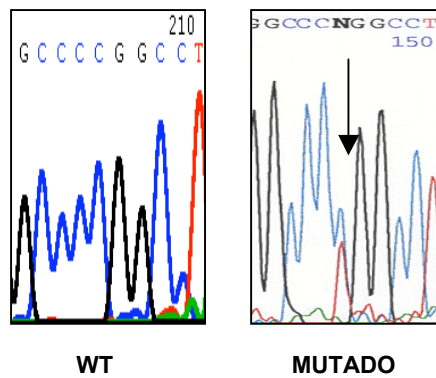


Figura 32. Familia RPAD 542; Pro347Leu; CCG→CTG; RHO 5; **A.** Árbol genealógico; **B.** Secuenciación automática.