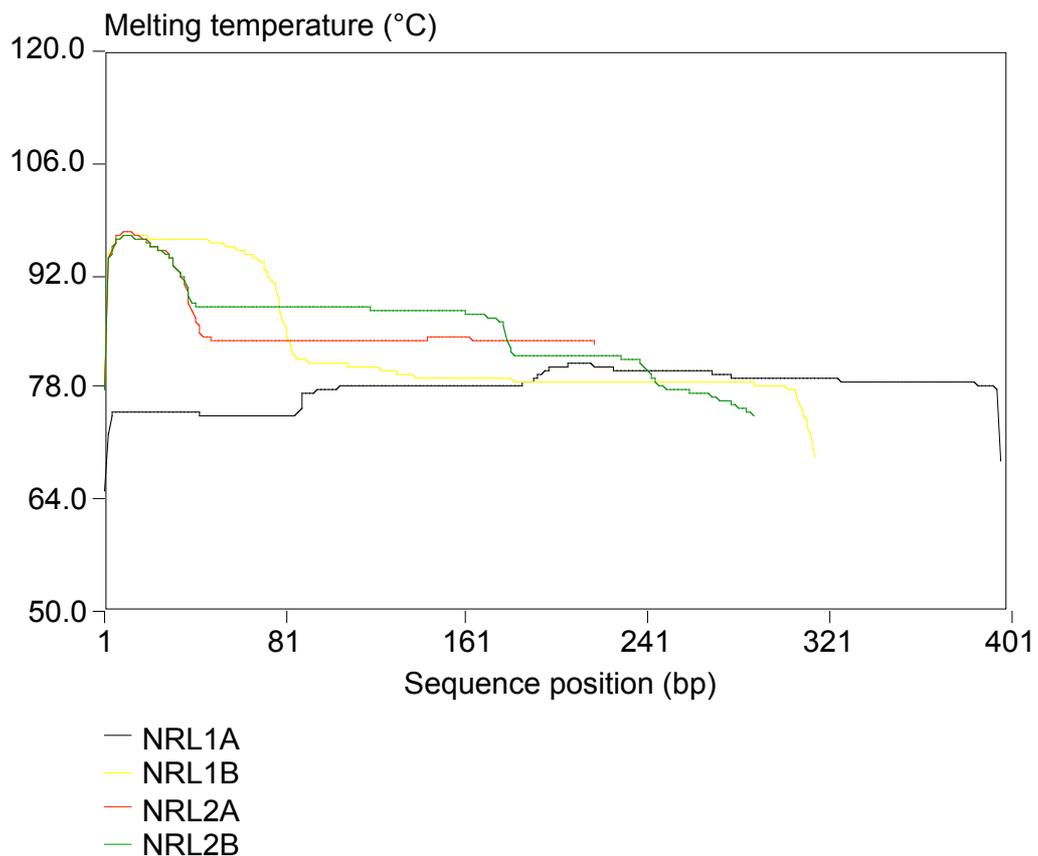


IV. 1.6. Gen NRL

Se amplificaron mediante PCR las regiones codificantes del gen y se analizaron mediante DGGE los fragmentos 2B, 3A y 3B. Se utilizó la técnica de SSCP para el estudio del fragmento 2A del exón 2. La búsqueda se realizó en 150 pacientes afectados de RPAD y en 100 de SRP.

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 desnaturizante necesario en cada caso para el cribado de mutaciones mediante la técnica de DGGE (aptdo. III.4.3.1.).



IV.1.6.1. Caracterización de mutaciones

La siguiente tabla resume las mutaciones y polimorfismos encontrados:

Mutación	Cambio de base	Fenotipo RP	Década Inicio	Evolución a ceguera legal
Pro51Leu	C <u>C</u> C→C <u>T</u> C	Difuso	1 ^a -2 ^a	3 ^a -4 ^a década
Gly122Glu	G <u>G</u> A→G <u>A</u> A	---	---	---

Mutación Silenciosa	Cambio de base
Leu155Leu	C <u>T</u> G→ <u>I</u> TG
Val245Val	C <u>T</u> C→C <u>T</u> G

Se han observado cuatro mutaciones en heterocigosis de las cuales dos son de tipo “missense”, y las otras dos son sinónimas.

La mutación Pro51Leu co-segrega con la enfermedad en el resto de miembros de la familia sobre los que se extendió el estudio.

La mutación Gly122Glu se detectó en un caso aislado. Ningún otro miembro de la familia posee esta mutación ni padece RP.

IV.1.6.2. Análisis familiar

RPAD T27; Pro51Leu; CCC→CTC; NRL 2A

La mutación destruye una diana de restricción HphI pero a su vez genera otra diana de restricción, también HphI, contigua a la anterior. Esta situación provoca que, al digerir con HphI una muestra amplificada de ADN genómico que contenga la mutación (en heterocigosis), el enzima sea capaz de digerir las moléculas homodúplex (tanto mutados como salvajes) formados pero no los heterodúplex. En los casos en los que la mutación no está presente (alelo salvaje) o se presentase en homocigosis se obtendrán dos fragmentos de 178 y 73 pb. La banda de 251 pb corresponde a las moléculas de ADN en heterodúplex (M/WT). Así, la banda de 251 pb en la electroforesis señala la presencia de la mutación en heterocigosis y nos sirve para detectar los portadores.

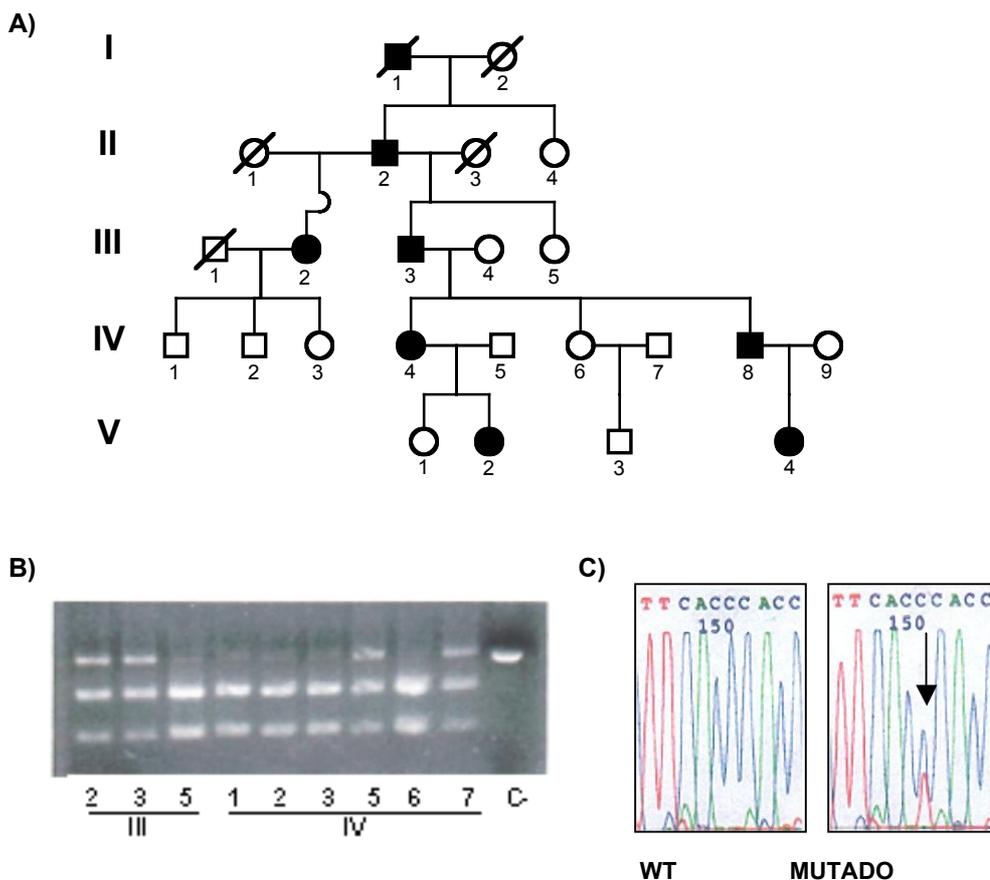


Figura 46. Familia RPAD T27; Pro51Leu; CCC→CTC; NRL 2A; **A.** Árbol genealógico; **B.** Análisis de restricción (Hph I); **C.** Secuenciación automática.

Individuo	Edad (años)	Inicio CN* (años)	Inicio ↓ CV* (años)	Inicio ↓ AV* (años)	CV* (actual)	ERG* (actual)	AV* (actual) D*/I*
III.2	60	<20	41	41	Escotoma periférico abs. /afectación central severa	Resp. escotópica y fotópica abolidas	D 0,1/ I 0,1
III.3	64	<10	Juventud	?	Escotoma periférico abs. / afectación central severa	Resp. escotópica y fotópica abolidas	D 0,3/ I 0,4
IV.1	33	--	--	--	Normal	Normal	D 1/ I 1
IV.2	30	--	--	--	Normal	--	D 1/ I 1
IV.3	27	--	--	--	Normal	Normal	D 1/ I 1
IV.5	40	<10	Juventud	?	Escotoma periférico relativo/10° centrales	Resp. escotópica y fotópica abolidas	D 0,5/ I 0,1
IV.6	38	--	--	--	--	--	D 1/ I 1
IV.7	32	<10	Juventud	?	Escotoma periférico relativo/10° centrales	Resp. escotópica y fotópica abolidas	D 0,7/ I 0,8
V.1	17	--	--	--	--	--	D 1/ I 1
V.2	11	<3	--	--	--	--	-/-
V.3	16	--	--	--	normal	--	D 1/ I 1
V.4	7	<10	--	--	Reducción concéntrica / 5° centrales	Resp.escotópica abolida Fotópica anormal	D 0,9/ I 0,9

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

SRP V874; Gly122Glu; GGA→GAA; NRL 2B

Aunque débilmente, se aprecia un patrón electroforético diferente en el análisis por DGGE del fragmento de PCR amplificado del exón 2B del individuo afectado que, posteriormente, se ha comprobado e identificado como mutación puntual mediante secuenciación automática.

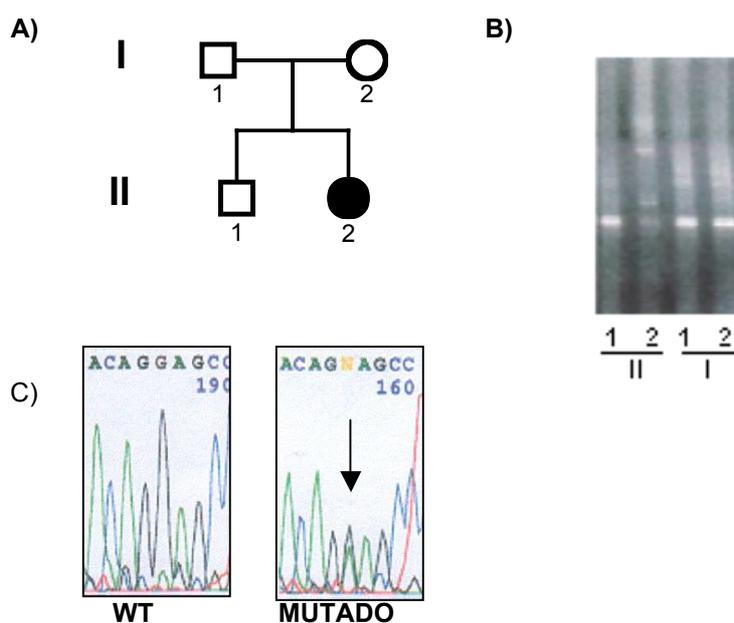
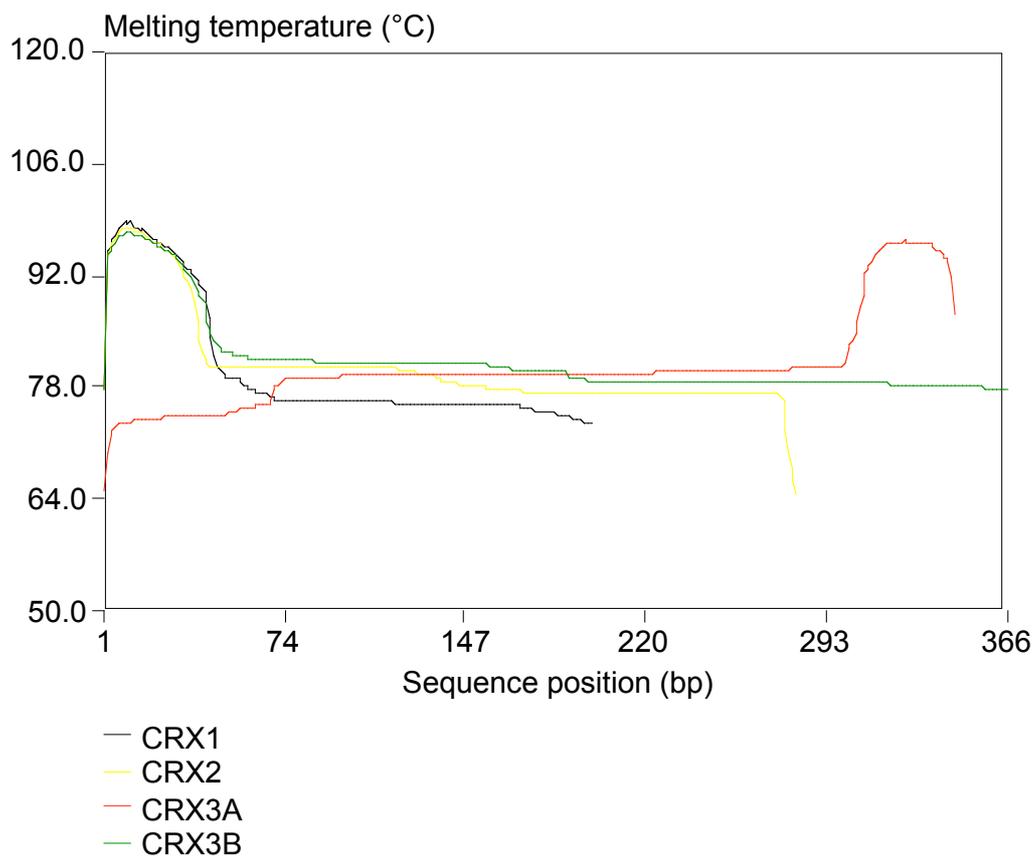


Figura 47. Familia SRP V874; Gly122Glu; GGA→GAA; NRL 2B; **A.** Árbol genealógico; **B.** DGGE; **C.** Secuenciación automática.

IV.1.7. Gen CRX

Se amplificaron mediante PCR las regiones codificantes del gen y se analizaron mediante DGGE los fragmentos 1, 2, 3A y 3B. La búsqueda se realizó en 150 pacientes afectados de RPAD y en 100 de SRP.

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 desnaturizante necesario en cada caso para el cribado de mutaciones mediante la técnica de DGGE (aptdo. III.4.3.1.).



IV.1.7.1. Caracterización de mutaciones

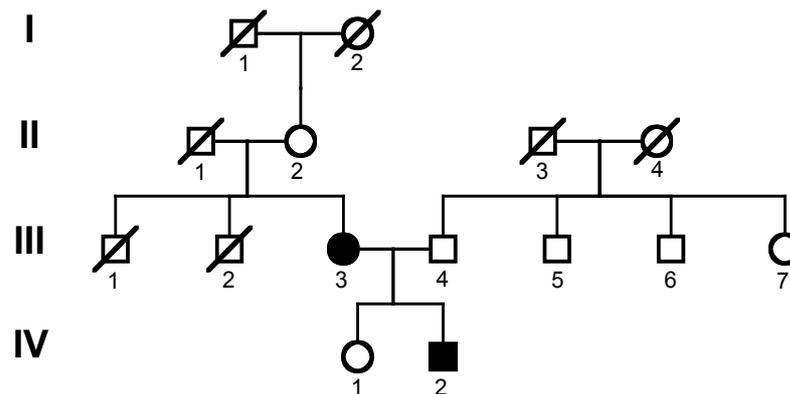
Sólo una mutación, G4862A, ha sido identificada en este gen en la región intrónica que separa el segundo del tercer exón, región no codificante y por ello ha sido descartada su relación con la enfermedad.

IV.1.7.2. Análisis familiar

RPAD 272; G4862A (Intrónica / a 13 nucleótidos del cebador)

No todos los individuos integrantes de esta familia han podido incluirse en el estudio, la mutación co-segrega con los individuos afectados de RPAD analizados.

A)



B)

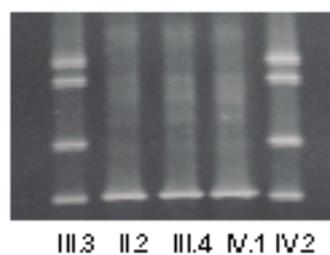


Figura 48. Familia RPAD 272; G4862A; **A.** Árbol genealógico; **B.** DGGE.

IV.2. ESTUDIOS DE EXPRESION GENICA

IV.2.1. Efecto sinérgico de los factores Nrl y Crx en la transactivación del promotor del gen RHO

Los factores de transcripción Nrl y Crx interaccionan físicamente *in vivo* (Mitton KP, y cols., 2000) y actúan sinérgicamente en los ensayos de actividad transcripcional en el promotor del gen RHO (Chen y cols., 1997).

Se co-transfectaron diferentes concentraciones (2-0,1 μg) del vector recombinante del gen CRX (pCI-CRX) junto a concentraciones fijas de los plásmidos, pCI-NRL (0,3 μg), pGL3-P130 (2 μg) y pRL-CMV (10 ng) que se ha utilizado en todos los casos como control interno de transfección.

Los resultados obtenidos confirman que el factor de transcripción Crx ejerce un efecto potenciador de la actividad transcripcional del factor Nrl.

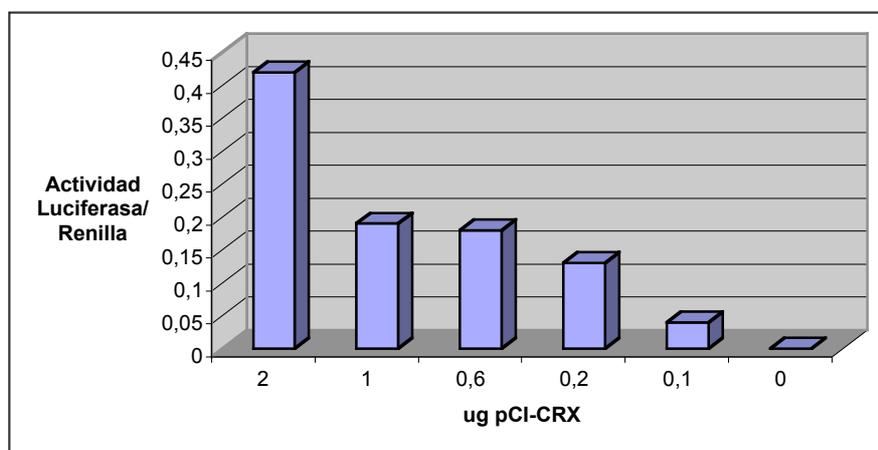


Figura 49. Actividad Luciferasa/Renilla obtenida en los ensayos de transfección sobre células COS 7 al co-transfectar los plásmidos pCI-NRL, pCI-CRX, pGL3-P130 y pRL-CMV.

IV.2.2. Efecto diferencial en la activación del promotor del gen RHO inducido por el factor de transcripción Nrl y los mutantes de éste P51L y G122E

Para determinar *in vitro* el efecto producido por las dos mutaciones detectadas en el gen NRL, sobre la transactivación del promotor del gen RHO, se han realizado ensayos de transfección transitoria mediante lípidos catiónicos (LyoVec™ / *InvivoGen*) sobre células COS 7 en una confluencia aproximada del 70%.

Diferentes concentraciones (0,005-0,020 µg) de los vectores recombinantes del gen NRL WT (pCI-NRL) y los mutantes P51L (pCI-NRL51) y G122E (pCI-NRL122) han sido co-transfectadas, en cada caso, junto con:

- 2 µg de vector de expresión que contiene el factor de transcripción Crx (pCI-CRX). Este factor ejerce un efecto potenciador de la transactivación del promotor de la rodopsina mediada por el factor de transcripción Nrl (Bessant DA. y cols., 1999).
- 2,5 µg de vector pGL3-P130, que abarca una región del promotor del gen RHO que contiene dos regiones de unión al factor de transcripción Crx (BAT-1 y Ret-4) y la región NRE, reconocida por el factor de transcripción Nrl. Este vector presenta una secuencia modificada del ADNc del gen de la luciferasa de *Photinus pyralis* (luc^+) que nos ha permitido monitorizar la actividad transcripcional del promotor en las células eucariotas transfectadas (“gen reporter”).
- 10 ng de vector pRL-CMV que contiene la región promotora del CMV dando una expresión constitutiva de la luciferasa de Renilla, se ha utilizado en todos los casos como control interno de transfección.

Cada punto se ha realizado por triplicado. La lectura de los resultados se ha realizado, en todo los casos, 24h después de la transfección.

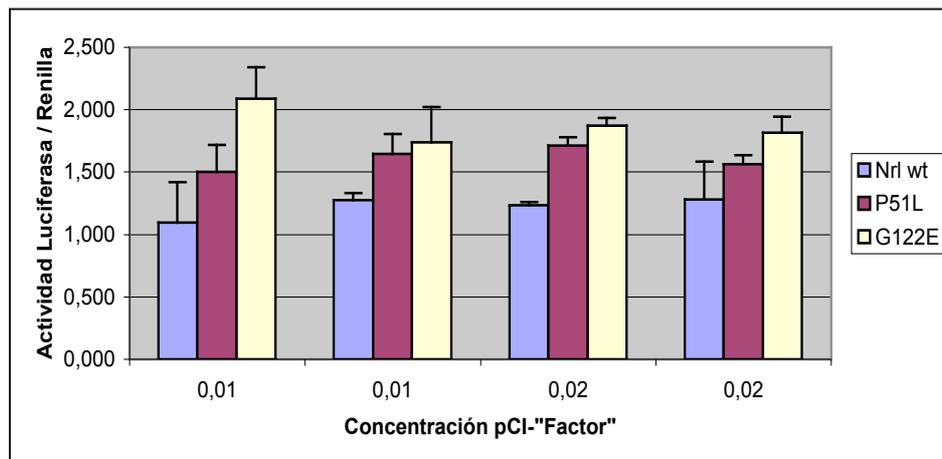


Figura 50. Actividad Luciferasa/Renilla obtenida en los ensayos de transfección sobre células COS 7 al co-transfectar los plásmidos pGL3-P130, pCI-CRX y pRL-CMV junto a cada una de las variantes del factor de transcripción Nrl estudiadas (WT; P51L; G122E); ($P < 0,05$).

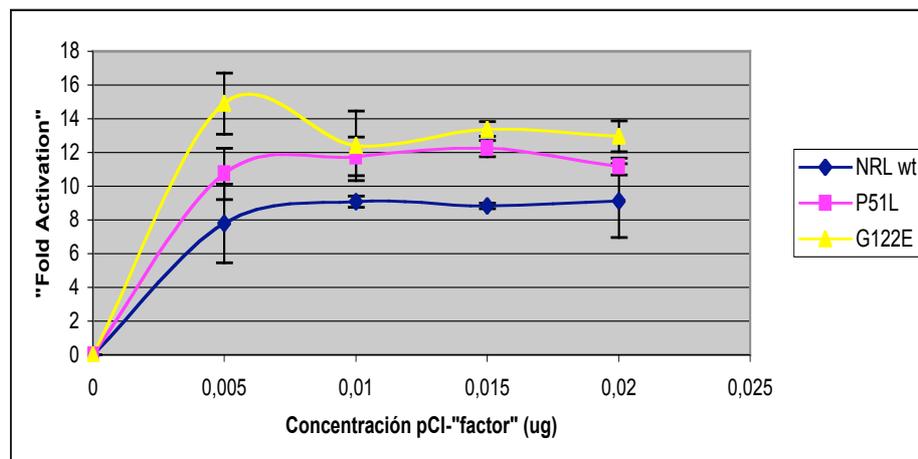


Figura 51. Incremento transcripcional ("Fold Activation") del factor Nrl (wt) y de los mutantes P51L y G122E. El valor de actividad Luciferasa/Renilla obtenido en la transfección del plásmido pGL3-P130 (2,5 μ g) junto con el vector pRL-CMV, se ha asignado con el valor de transcripción=1; ($P < 0,05$).

Estos resultados demuestran que los mutantes P51L y G122E ejercen un efecto de transactivación del promotor de la rodopsina superior al ejercido por el factor Nrl en estado salvaje (WT).

V. DISCUSSION

V. DISCUSION

La retinosis pigmentaria autosómica dominante (RPAD) tiene su origen en una alteración en el genoma de los pacientes.

Los genes asociados a RPAD se expresan en retina. Recientemente se ha demostrado que genes de expresión ubicua, es decir no específica de retina, se asocian a RPAD (Chakarova C. y cols., 2002; Makarova O. y cols., 2002; McKie A. y cols., 2001; vanLith-Verhoeven y cols., 2002). En este trabajo se han analizado sólo los genes de expresión específica en retina, conocidos o candidatos, asociados a RPAD. Los genes de expresión ubicua asociados a RPAD son objeto de otra tesis doctoral en el grupo.

Se han analizado los genes RHO (junto con su región promotora), RDS-periferina, ROM1, NRL, CRX y RP1.

Los pacientes que han sido objeto de este estudio son, 150 pacientes que se han clasificado clínica y genéticamente como afectados de RPAD.

En el análisis del gen RDS-periferina, se han incluido 7 pacientes clasificados de la misma forma como afectados de distrofia macular autosómica dominante (DMAD).

Se han incluido también, 100 pacientes afectados de SRP y 50 muestras correspondientes a población control.

La clasificación genética de los pacientes según el patrón de herencia que describe su enfermedad se ha realizado en base a los siguientes criterios (Ayuso y cols, 1995), que fueron modificados de Haim:

Herencia Autosómica Dominante:

- Transmisión de varón a varón (no explicada por consanguinidad).
- Transmisión vertical, en al menos 2 generaciones sucesivas con mujeres afectadas con la misma severidad que los hombres.

- En caso de existir consanguinidad, la pseudo-dominancia se descartará si existen pacientes afectados fuera de la rama consanguínea.

Herencia Autosómica Recesiva:

- Más de un hijo afectado de sexo femenino o de ambos sexos con padres sanos.
- En caso de familias en las que sólo los varones son afectados, es necesario excluir herencia ligada al X, mediante un cuidadoso examen oftalmológico de mujeres posibles portadoras (madre, hijas y hermanas de los afectados).
- Casos esporádicos, hijos de padres sanos y consanguíneos.

Herencia Ligada al Cromosoma X:

- Afectación severa de varones, emparentados entre sí a través de mujeres sanas o con signos de portadoras.
- Afectación severa de un varón con madre, hija o hermana con signos de ser portadora.

Cabe destacar que se han realizado aproximaciones en la clasificación de pacientes como afectados de RPAD. Así, también se han introducido en el cribado, familias en las que no existe transmisión de varón a varón pero en las que las mujeres afectadas presentan un fenotipo severo o similar al de los varones afectados (en las familias afectadas de XLRP, las mujeres portadoras en general no presentan o presentan síntomas leves de la enfermedad). También se han clasificado como familias RPAD, aquellas familias con herencia de varón a varón en las que sólo se ha dispuesto de información clínica y genética fiable de dos generaciones.

Es importante tener en cuenta estas aproximaciones en casos en los que, por ejemplo, se han observado mutaciones con penetrancia incompleta, como se discute más adelante.

Se han analizado los genes asociados a RPAD en 100 pacientes clasificados como casos esporádicos (SRP), al existir la posibilidad de que la mutación de *novo* generada se transmita en las próximas generaciones con un patrón de herencia dominante. Sin embargo, de los 100 casos analizados sólo se han detectado dos mutaciones en los genes analizados. Este resultado no se ajusta al porcentaje de casos RPAD resueltos para los genes analizados.

Así, se plantean varias posibilidades: la existencia de un gen asociado a RPAD, todavía no descrito, que presente un porcentaje muy alto de mutaciones como, por ejemplo, el gen RHO; la posibilidad de que estos pacientes afectados de SRP pertenezcan a familias pequeñas con un patrón de herencia recesivo; que la mutación de *novo* se produzca en un gen recesivo en el que el paciente afectado ya portaba una mutación; por último, en el caso de pacientes SRP varones, puede tratarse de una mutación que siga un patrón de herencia ligado al cromosoma X en una familia con un porcentaje muy bajo de varones.

La estrategia que se ha utilizado para la búsqueda de mutaciones en los genes analizados se ha descrito en el apartado de Material y métodos (III.4.).

El método empleado mayoritariamente para realizar el cribado de los genes asociados a RPAD es el de DGGE.

Esta técnica de cribaje de mutaciones ha sido seleccionada para este trabajo debido a que la T_m de un fragmento de ADN es dependiente de su secuencia nucleotídica. Así, fragmentos de ADN que sólo se diferencian en un nucleótido de su secuencia se pueden resolver mediante esta técnica.

La DGGE es extremadamente eficaz cuando se usa para el análisis de variantes nucleotídicas en heterocigosis. La desnaturalización y el reanillamiento de cadenas de ADN durante los últimos ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la formación de moléculas de ADN tanto homodúplex como heterodúplex.

Los apareamientos incorrectos de los heterodúplex reducen significativamente su temperatura de fusión lo que permite una separación electroforética diferencial y una fácil detección visual de las mutaciones.

La introducción de la cola GC (Myers y col, 85), incrementa el porcentaje de mutación detectable por DGGE hasta casi el 95% (Sheffield VC. y cols., 1991).

Esta técnica posee una fiabilidad del 95% y permite analizar fragmentos de ADN de un tamaño promedio entre 350-400 pb. Sin embargo, los fragmentos de ADN con un punto de fusión muy alto (debido a un elevado contenido en GC en su secuencia, que aportan una gran estabilidad a la doble hélice) o fragmentos de tamaño reducido, no han sido analizados por esta técnica ya que su sensibilidad en estos casos disminuye. En nuestro caso, el exón 2 del gen NRL, con una secuencia rica en CG, fue analizado por la técnica de SSCP.

La fiabilidad de detección de mutaciones por SSCP es >80% para fragmentos de tamaño <300 pb (Hayashi and Yandell, 1993), la sensibilidad de la técnica para fragmentos de tamaño superior disminuye considerablemente.

La SSCP, no detecta aquellas mutaciones puntuales que no alteran de forma drástica la conformación secundaria adquirida por la cadena de ADN. Para aumentar la sensibilidad la hemos realizado bajo dos condiciones distintas de concentración y composición del gel (ver apartado III.4.3.2.).

Gen RHO

La proteína rodopsina desempeña una importante función en el proceso visual de la fototransducción: la fotoisomerización del 11 *cis*-retinal, fotopigmento unido a la opsina, a todo *trans*-retinal constituye el primer paso de este proceso. Además, esta proteína constituye del 80-90% del contenido proteico de los discos de los fotorreceptores bastones, desempeñando por tanto una importante función estructural en su morfología.

La rodopsina es una proteína altamente conservada en vertebrados, esta característica sugiere que cualquier cambio en la secuencia de esta proteína podría afectar a cualquiera de estas dos funciones.

Se han descrito más de un centenar de mutaciones dispersas en el gen RHO.

El número total de mutaciones identificadas en este gen y asociadas a RPAD en España es de 29 en 150 familias afectadas de RPAD (19,5%).

La mutación Met44Thr, (Reig C. y cols., 1994) se detectó en un caso esporádico.

La mutación más observada, **Pro347Leu** (causante de RPAD en cuatro familias no relacionadas), aparece en la población española con la misma frecuencia (2%) que en el resto del mundo. El resto de mutaciones sólo se han detectado una vez en las familias RPAD españolas

No se ha detectado una región determinada en el gen que presente una alta frecuencia de mutaciones (“hotspot”). La mutación Pro23His, detectada en un 12% de la población norteamericana afectada de RPAD (Dryja y cols., 1990) y ausente en la población europea (Farrar GJ. y cols., 1990), constituye una excepción causada por un origen ancestral común o “efecto fundador” de la mutación (Dryja T. y cols., 1990).

Con respecto a otras poblaciones, nuestro país presenta una de las frecuencias más bajas de mutación del gen RHO entre familias RPAD, aunque es similar a la de otros países cercanos como Francia (Souied y cols., 1995; Bareil C. y cols., 1999).

Casi todas las mutaciones detectadas en este gen presentan un fenotipo de RP autosómico dominante. Sin embargo, se han descrito tres alelos que se manifiestan con una herencia de tipo recesivo, es decir, sólo los portadores de estas mutaciones en homocigosis desarrollan la enfermedad. De estas tres mutaciones, dos de ellas producen un alelo nulo (proteína con terminación prematura) y otra se localiza en una señal de empalme (“splicing”) (Rosenfeld PJ. y cols., 1992; Kumaranickavel y cols., 1994). Sin embargo, se han descrito también otras mutaciones del mismo tipo en el gen de la rodopsina con un patrón de herencia dominante (Macke JP. y cols., 1993; Bell y cols., 1994; Reig y cols., 1996; Martínez-Gimeno y cols., 2000).

La mutación Glu249X, origina un alelo nulo y se asocia a un patrón de herencia autosómico recesivo (Rosenfeld PJ. y cols., 1992). Los estudios de los modelos de ratón “knockout” del gen de la rodopsina se pueden correlacionar con esta mutación (Humphries y cols., 1997). El paciente portador de esta mutación en homocigosis, muestra una clínica severa con una pérdida completa de la función de los bastones en su infancia. Este fenotipo es comparable al del ratón rho -/-. Los familiares portadores de la mutación en heterocigosis no manifiestan ningún síntoma de la enfermedad. Sin embargo, cortes histológicos subretinales de los ratones rho +/- muestran un desestructuración de los fotorreceptores.

Se ha observado que la incidencia de RP entre portadores heterocigotos de la mutación detectada en la señal de empalme, mencionada anteriormente, localizada en el extremo 5' del intrón 4 es muy baja (4% de 25 individuos heterocigotos estudiados) (Rosenfeld PJ. y cols., 1995). Así, esta mutación no ejerce un efecto dominante, siendo probablemente otra mutación, en el mismo o en otro gen, la causante de la enfermedad. También podría suponerse un efecto similar a la mutación recesiva comentada anteriormente, aunque esta mutación no ha sido detectada en homocigosis por el momento.

La mutación Ala292Glu detectada en heterocigosis en un paciente afectado de Ceguera Nocturna Congénita (CNB), es el único fenotipo distinto de RP asociado a una mutación en este gen (Dryja EJ, y cols., 1993).

El mecanismo patogénico que producen estas mutaciones está por descubrir. Todas ellas producen la muerte de la célula fotorreceptora posiblemente siguiendo una ruta común de apoptosis.

La imposibilidad de obtener biopsias de los pacientes afectados de RP durante el transcurso de la enfermedad y, por tanto, de realizar estudios comparativos *in vivo* de la expresión génica celular o tisular entre los pacientes afectados y los individuos sanos ha conducido la investigación hacia otro tipo de estudios *in vitro*.

El estudio *in vitro* de transfección en células de mamífero de mutantes de rodopsina, obtenidos mediante mutagénesis dirigida, ha sido una de las estrategias más utilizadas en los últimos años con el fin de comprender los mecanismos moleculares (Manyosa J. y cols., 2003). La estructura y función de estas proteínas mutadas, tras ser aisladas y purificadas, pueden ser estudiadas en el laboratorio mediante diversas técnicas espectroscópicas y bioquímicas (Garriga P. y cols 1996; Hwa J. y cols., 1997). Estos estudios comparan la estructura y estabilidad (p.ej., midiendo su capacidad de regeneración con 11-*cis* retinal), localización celular y su funcionalidad (p.ej. midiendo su capacidad de activación de la proteína Gt), de los mutantes con la proteína salvaje.

Los estudios *in vitro* de expresión de mutantes de la rodopsina demuestran heterogeneidad de comportamiento (Sung y cols., 1991, 1993). Los resultados de estos experimentos permiten establecer dos tipos de mutantes:

- Mutantes tipo I, en los que la rodopsina mutante expresada *in vitro* muestra un nivel de síntesis, regeneración con 11-*cis*-retinal y localización en la membrana plasmática similar a la salvaje.
- Mutantes tipo II, que muestran bajos niveles de acumulación de rodopsina mutante, poca o nula capacidad de regeneración con el 11-*cis*-retinal y que se transporta con dificultad a la membrana plasmática. Dentro de este grupo se observan dos subgrupos.
 - Subtipo II.A: acumulación de rodopsina preferentemente intracelular.
 - Subtipo II.B: acumulación mayoritaria de rodopsina en la superficie celular (Sung y cols., 1993).

Ambos tipos de mutantes (I y II) de la rodopsina presentes *in vivo*, producen un fenotipo de RP.

El comportamiento de los mutantes de tipo II parece sugerir un mecanismo patogénico derivado de la acumulación citoplasmática de la proteína. Esto, junto con una posible incapacidad de metabolizar los agregados de proteína, podría ocasionar un efecto tóxico para la célula fotorreceptora (Colley y cols., 1995). Además, algunas de estas mutaciones distorsionan la formación del enlace disulfuro entre los aminoácidos conservados Cys-110 y Cys-187, alterando el plegamiento natural de la proteína, impidiendo su correcto transporte y, por extensión, la realización de su función (Liu X. y cols., 1996).

Es difícil atribuir un mecanismo celular similar a los mutantes de tipo I.

Sin embargo, aunque estudios *in vitro* detectan comportamientos semejantes entre algunas proteínas mutantes de rodopsina, los fenotipos expresados por los pacientes portadores de dichos mutantes son muy heterogéneos. Así, los pacientes portadores de mutaciones con un comportamiento *in vitro* similar al de los mutantes de tipo I muestran, en algunos casos, una expresión de la enfermedad indistinguible a la de los portadores de mutaciones cuyo comportamiento *in vitro* se engloba dentro de los mutantes de tipo II.

La relación fenotipo-genotipo no siempre está clara en las enfermedades hereditarias y en las retinopatías se complica aún más. En los casos en los que se han localizado las mutaciones causantes de la enfermedad, también se ha procurado establecer una relación fenotipo-genotipo. Esto ha sido posible especialmente en aquellos genes en los que el número de mutaciones encontradas ha sido elevado, como es el caso del gen de la rodopsina.

Se ha comparado la clínica de los distintos afectados con el fin de establecer parámetros comunes. Se trata de correlacionar la posición y naturaleza del residuo aminoácido sustituido, con la severidad de la enfermedad resultante (Sandberg M., y cols, 1994).

La siguiente tabla muestra las mutaciones encontradas en el gen de la rodopsina, causantes de RPAD en la población española (se remarcan en negrita y cursiva las mutaciones cuyos estudios familiares se describen en esta

tesis doctoral), junto con la posición que ocupan en la proteína, el fenotipo que producen, la década de inicio de la enfermedad y la evolución y década en la que el paciente alcanza la ceguera legal:

Mutación	Cambio de base	Dominio (proteína)	Fenotipo RP	Década de inicio	Evolución a ceguera legal	Referencia
Asn15Ser	AAT→AGT	Intradiscal	Regional	Variable	Lenta,variable	En estudio
Thr17Met	ACG→ATG	Intradiscal	Regional	Variable	Lenta,variable	En estudio
Pro23Leu	CCC→CTC	Intradiscal	Regional	Variable	Lenta,variable	Alvarez y cols.,1999
Leu40Pro	CTG_CCG	Transmembrana	--	1 ^a	4 ^a década	En estudio
Met44Thr*°	ATG→ACG	Transmembrana	Difuso	2 ^a	5 ^a década	Reig y cols., 1994
Gly106Arg	GGG→AGG	Intradiscal	Regional	2-3 ^a	6 ^a década	Ayuso y cols.1996 a
Gly114Asp	GGC→GAC	Transmembrana	Difuso	1 ^a	5 ^a década	Millan y cols., 1995
Arg135Trp	CGG→TGG	Citoplasmático	Difuso	2 ^a	4 ^a década	En estudio
Arg135Leu°	CGG→CTG	Citoplasmático	Difuso	2 ^a	6 ^a década	Reig y cols., 1996
Tyr136X*	TAC→TAA	Citoplasmático	Difuso	>4 ^a	8 ^a década	Sanchez y cols1996
Val137Met*	GTG→ATG	Citoplasmático	Noclasificada	1-4 ^a	4-7 ^a década	Ayuso y cols.,1996b
Ala164Glu	GCG→GAG	Transmembrana	Difuso	2 ^a	4 ^a década	En estudio
Pro171Gln	CCA→CAA	Transmembrana	Difuso	2 ^a	4 ^a década	Antiñolo y cols.1994
Splic 2°intr*	A3811G	-	Noclasificada	2-7 ^a	4-8 ^a década	Martínez-Gimeno y cols., 2000
Ser186Pro	ICG→CCG	Transmembrana	Difuso	2 ^a	5 ^a década	Trujillo y cols., 2000
Gly188Arg	GGA_AGA	Intradiscal	Difuso/Atípico	1 ^a	6 ^a -7 ^a década	Reig y cols., 2000a
Asp190Tyr	GAC→IAC	Intradiscal	Regional	Variable	Variable	Martínez-Gimeno y cols., 2000
His211Arg°	CAC→CGC	Transmembrana	Difuso	1-2 ^a	4-5 ^a década	Reig y cols., 1994
Pro215Leu*	CCG→CTG	Transmembrana	Difuso	1 ^a	4 ^a década	Martínez-Gimeno y cols., 2000
Splic 4°intr*°	A5167T	-	Difuso	2-3 ^a	Variable	Reig y cols., 1996
Thr289Pro*	ACC→ICC	Transmembrana	Difuso	2 ^a	5 ^a década	Martínez-Gimeno y cols., 2000
Val345Gly	GIG→GGG	Citoplasmático	Difuso	2 ^a	5 ^a década	En estudio
Ala346Pro	GCC→CCC	Citoplasmático	Difuso	1 ^a	5 ^a década	Borrego y cols,1996
Pro347Leu**	CCG→CTG	Citoplasmático	Difuso	1 ^a	3 ^a década	Trujillo y cols.,1998

* Mutación descrita sólo en población española.

** Mutación detectada en cuatro familias no relacionadas.

° Mutación descrita en el grupo de investigación del Hospital de Terrassa.

Se ha observado que la mayoría de las mutaciones descritas situadas en las hélices transmembrana, y en el extremo COOH de la proteína se asocian a un fenotipo clínico difuso, de inicio precoz y evolución más rápida. Mientras que aquellas situadas en los lazos intradiscales o intracitoplasmáticos se asociaron frecuentemente a un fenotipo regional o no clasificable en el que la expresión clínica muestra en ocasiones variabilidad intrafamiliar y el curso de la enfermedad es menos severo (McInnes R. y cols., 1992).

En el caso de que los distintos comportamientos observados *in vitro* entre los mutantes de este gen, pudieran relacionarse con la severidad del fenotipo estaríamos más cercanos a dilucidar el mecanismo patogénico que generan estas mutaciones. Sin embargo, estas aproximaciones o generalizaciones realizadas, no pueden emplearse como norma general.

Así, gran parte de los mutantes “transmembrana” se han clasificado, según los criterios de Sung y cols. 1991, como mutantes de tipo II. Sin embargo se observan excepciones, sobre todo en algunas mutaciones localizadas en la hélice 1 de la proteína, que se aproximan más al comportamiento de los mutantes de tipo I. Así, estudios realizados sobre el mutante M44T (“mutante transmembrana”), demuestran que éste procesa y une cromóforo igual que la proteína salvaje y no presenta problemas de plegamiento o estabilidad en estado basal (oscuridad). Aparentemente las mutaciones con esta característica presentan una manifestación de los síntomas más tardía y evolución más lenta (Andrés A. -tesis doctoral- UAB 2002), fenotipo más frecuente entre los pacientes con mutaciones intradiscales. Recientemente se ha observado que este mutante y algunos otros presentan una velocidad inicial de activación de la proteína G superior a la proteína salvaje (Andrés A. y cols., 2003). Así, se ha sugerido la posibilidad de que este hecho modifique el balance estequiométrico de las diferentes proteínas implicadas en la fototransducción, provocando la síntesis de sustancias tóxicas que provocarían la muerte de las células fotorreceptoras (Manyosa J. y cols., 2003).

Tampoco se pueden asociar por regla general los mutantes “intradiscales” como mutantes de tipo I. Así, por ejemplo, los codones 15 y 17 de la proteína forman parte de la secuencia aminoácida requerida para la N-glicosilación de la opsina en el retículo endoplasmático (Asn-Xaa-Thr/Ser). Esto sugiere que las

mutaciones intradiscales **Asn15Ser** y **Thr17Met** podrían alterar la glicosilación. Así, estudios de expresión *in vitro* para el mutante Thr17Met en rodopsina demuestran que la proteína, en este caso, es parcialmente glicosilada y retenida en el retículo endoplasmático en lugar de ser transportada a la membrana plasmática (Sung CH. y cols., 1991). Este mutante debe clasificarse como de tipo IIA.

Las mutaciones **Asp190Tyr** y **Gly188Arg** se sitúan ambas en el segundo dominio intradiscal de la rodopsina. Los estudios estructurales de éste tipo de mutantes muestran una alteración de la estructura terciaria de la proteína (Liu X. y cols., 1996). Esta alteración estructural está posiblemente relacionada con las anomalías de transporte de la molécula y con su acumulación en el interior de la célula. Así, su comportamiento es similar al de los mutantes de tipo IIA.

La mutación Gly188Arg, presenta un fenotipo difuso atípico. Esto puede deberse a su localización, contigua a un residuo cisteína en la posición 187 que forma un puente disulfuro con el residuo Cys 110, el cambio en este caso sustituye un aminoácido polar no cargado (glicina) por otro también polar aunque básico (arginina). Es decir, al no provocar cambios en la polaridad de la región, la interferencia en la formación del puente disulfuro será menor y originará así una menor alteración estructural con menor repercusión clínica y por ello no se asocia a un fenotipo muy severo. Además, uno de los pacientes estudiados presenta la mutación en homocigosis y su fenotipo no es más severo que pacientes con la misma mutación en heterocigosis. Observando los distintos fenotipos se plantea la hipótesis de que el mecanismo patogénico, en éste caso, está más cercano a los problemas estructurales y/o funcionales que pueda causar esta mutación en la proteína que a un catabolismo insuficiente de la rodopsina que conduce a su acumulación en el citoplasma. De ser así, en un paciente homocigoto se esperaría un efecto aditivo en la acumulación y por lo mismo un fenotipo más severo.

En el análisis familiar de la mutación Val137Met, se detectó la mutación en homocigosis en alguno de los pacientes afectados de RPAD. El fenotipo tampoco fue más severo en los homocigotos que en los heterocigotos (Ayuso y cols., 1996b). Estudios estructurales y funcionales de este mutante revelan que

presenta una activación de la transducina superior a la de la proteína salvaje. Esto puede ser debido a que el cambio estructural producido genere un cambio estérico en el citoplasma que favorezca la interacción de los residuos 134-135 del triplete DRY con la proteína G (Andrés A., y cols., 2003).

El hecho de que mutaciones detectadas en homocigosis no presenten un fenotipo más severo, dentro de la misma familia, que la misma mutación en heterocigosis apoya el carácter dominante de estas mutaciones y sugiere que la proteína mutante induce un efecto negativo o citotóxico independiente de la cantidad o dosis génica existente.

Se ha descrito, en modelos animales, que alteraciones en la expresión del gen RHO tanto por exceso como por defecto producen muerte celular del fotorreceptor (Olson JE. y cols., 1992; Humphries M. y cols., 1997). Un ejemplo de esto es la transferencia génica del alelo mutado (Pro23His) que produce retinosis pigmentaria en ratón. Un dato significativo en este estudio es la manifestación de RP en una línea transgénica que presenta una expresión del transgen salvaje seis veces mayor de lo normal (Olsson JE. y cols., 1992).

Estudios de expresión celular in vitro de los mutantes Ser50Thr (Bessant D. y cols., 1999), Pro51Leu y Gly122Glu (presente Tesis), del gen regulador de la expresión del gen de la rodopsina, NRL, demuestran que dichas mutaciones inducen una sobre expresión del gen RHO provocando la enfermedad.

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis del efecto dominante negativo del alelo mutado y del efecto deletéreo que produce la sobreexpresión de la opsina sobre las células fotorreceptoras.

Genes RDS/periferina y ROM1

A diferencia de la rodopsina, las proteínas RDS-periferina y ROM1 se localizan en conos y en bastones (Arikawa K. y cols., 1992). Estas dos proteínas interactúan *in vivo* y tienen una función estructural (Goldberg y cols., 1995; Kedzierski y cols., 1999).

Se observan diferencias sustanciales de fenotipo entre los pacientes portadores de mutaciones en el gen RDS-periferina. Algunas mutaciones inducen una degeneración temprana de la mácula frente a la periferia de la retina con degeneración más rápida de los conos que de los bastones. Esta diferencia entre fenotipos podría atribuirse a la expresión de la molécula de periferina tanto en conos como en bastones, formando complejos distintos en cada tipo de fotorreceptor. Así, dependiendo de la mutación, ésta podría afectar de una forma específica a las estructuras que forma en conos y/o bastones. Sin embargo, los estudios de correlación fenotipo-genotipo no han permitido establecer una regla general.

Así, distintas mutaciones en este gen producen distintos tipos de degeneraciones retinianas, retinosis pigmentaria (RP) (afectación principal de bastones), distrofia macular (DM) (afectación principal de conos) y distrofia de conos y bastones (CORD) (Wells J. y cols., 1993).

En nuestro país la frecuencia de mutaciones en el gen RDS es muy alta entre las familias afectadas de DMAD por lo que es importante el estudio de este gen en estas familias. En nuestro estudio de familias afectadas de RPAD hemos añadido siete familias afectadas de DMAD.

La frecuencia de mutaciones totales observada en este gen en la población española es comparable a la de otros países del sur de Europa.

Se han descrito tres polimorfismos, Glu304Gln, Lys310Arg, Gly338Asp, localizados en el dominio C-terminal de la proteína, que aparecen con la misma frecuencia en pacientes que en población control (Trujillo MJ. y cols., 1995).

La mutación más observada en nuestro país, Arg172Trp, coincide con la observada con mayor frecuencia entre la población británica. Se ha observado

un origen ancestral común (efecto fundador) de esta mutación en todas las familias inglesas afectadas (Payne AM. y cols., 1998).

En general, casi todas las mutaciones descritas en este gen afectan al segundo lazo intradiscal (lazo D2) de la proteína. Ésto indica la gran importancia funcional de esta región, implicada en la formación de homodímeros (en bastones) y de homotetrámeros (en conos) (Goldberg y cols., 1995; Kedzierski y cols., 1999).

La siguiente tabla muestra las mutaciones descritas en el gen RDS-periferina, causantes de RPAD y DMAD en la población española (se remarcan en negrita y cursiva las mutaciones cuyos estudios familiares se describen en esta tesis doctoral), junto con la posición que ocupan en la proteína, la década de inicio de la enfermedad y la evolución y década en la que el paciente alcanza la ceguera legal:

Mutación	Cambio de base	Dominio (proteína)	Fenotipo	Década de inicio	Evolución a ceguera legal	Referencia
Asp173Val	G <u>A</u> C→G <u>I</u> C	Segundo Intradiscal	RP No clasificada	Variable 1 ^a	>4 ^a década Cataratas tempranas	Grüning y cols., 1994
Gly208Asp	G <u>G</u> C→G <u>A</u> C	Segundo Intradiscal	RP No clasificada	Variable 2-4 ^a	6 ^a década	Ayuso y cols., en preparación
<i>Tyr141His</i>	C <u>I</u> A→C <u>C</u> A	Segundo Intradiscal	DM Viteliforme Adulto	5 ^a	Lenta, 6 ^a década	Trujillo y cols., 2001
<i>Arg142Trp</i>	<u>C</u> GG→ <u>I</u> GG	Segundo Intradiscal	DM Coroidal Areolar Central	4 ^a	6 ^a década	Trujillo y cols., 2001
Arg172Trp* ^o	<u>C</u> GG→ <u>I</u> GG	Segundo Intradiscal	DM Coroidal Areolar Central	5 ^a	7 ^a década	Reig y cols., 1995.
689delT FS	CC <u>I</u> →CC-	Segundo Intradiscal	DM Coroidal Areolar Central	5 ^a	6 ^a década	Trujillo y cols., 1997
857del17bpFS	Del 17 bp	Segundo Intradiscal	DM patrón	Variable 4-6 ^a	Lenta, 7-8 ^a década	Trujillo y cols., 1997
<i>Cys214Tyr</i>	T <u>G</u> C→T <u>A</u> C	Segundo Intradiscal	DM patrón	4 ^a	Lenta	Trujillo y cols., 2001

* Mutación detectada en dos familias no relacionadas.

^o Mutación descrita en el grupo de investigación del Hospital de Terrassa.

Sólo se han encontrado dos mutaciones causantes de RP en este gen, Asp173Val y Gly208Asp, entre la población española que representan un 1.5% (2 de 150) de los casos de RPAD resueltos.

Las tres mutaciones descritas en este trabajo se asocian a distrofias centrales. También se aprecian diferencias entre los tres fenotipos. Así, se han observado distintos tipos de DM, como DM patrón, DM coroidal areolar central y DM viteliforme, todas con un patrón de herencia autosómico dominante.

Se han detectado mutaciones en el gen ROM1 que producen un fenotipo de RP, aunque sólo en presencia de otra mutación en el gen RDS-periferina. Este tipo de mecanismo se ha denominado digénico. Sólo los dobles heterocigotos de RDS-periferina y ROM1 presentan un fenotipo de RP, mientras que pacientes portadores de mutación sólo en uno de los dos genes no desarrollan la enfermedad (Kajiwara y cols., 1994; Dryja TP. y cols., 1997).

La mutación detectada en el gen ROM1 por nuestro grupo, **Cys253Tyr**, se presenta en dos hermanos varones afectados de RP (Reig C. y cols., 2000), sin embargo, otros miembros sanos de la misma familia (tres varones y una mujer) son también portadores de la mutación. Esta mutación se localiza en el dominio intradiscal y afecta a una de las siete cisteínas conservadas y que parecen implicadas en la interacción intra-intermolecular de la proteína Rom-1.

La detección de esta mutación en sujetos no afectados de RP, plantea la posibilidad de ser una mutación con penetrancia incompleta. Otra posibilidad es que la mutación interviniera con un mecanismo digénico en la expresión de RP.

Podría suponerse que la mutación interviniera en un mecanismo digénico junto con el gen RDS-periferina, sin embargo, el análisis de este gen en la familia no revela ninguna mutación así como tampoco se encontraron mutaciones adicionales en el gen ROM-1 tras ser secuenciado en todos los miembros de la familia.

No puede demostrarse un mecanismo digénico de Rom-1 con otra proteína desconocida hasta el momento.

Cabe, por tanto, la posibilidad de que dicha mutación no sea la causa de RP en la familia.

Otros autores han encontrado mutaciones en heterocigosis en casos esporádicos (Arg242Lys) o sin co-segregar con la enfermedad ya que aparecen en pacientes afectados e individuos asintomáticos (Gly75Asp, 345insG) (Bascom RA. y cols. 1993b), son casos similares al de la mutación que se describe en este trabajo.

La frecuencia de mutaciones en este gen como causa de RP parece, tanto en España como en otros países, muy baja y su papel quedaría relegado al de mutaciones secundarias (Bascom RA. y cols., 1995).

Recientes estudios estructurales y de animales transgénicos, parecen indicar que la proteína Rom1 desempeña un papel secundario en el desarrollo de RP y que el gen ROM1 podría relacionarse con formas RP recesivas (Clarke G. y cols., 2000).

Gen RP1.

La mayor parte de las mutaciones descritas en este gen se localizan en una región de unas 1000 pb que son abarcadas por el exón 4 de este gen. Muchas de ellas dan lugar a proteínas truncadas (Payne A. y cols., 2000).

En la población americana e inglesa ha sido descrita una mutación mayoritaria **Arg677X** en este gen (Payne A. y cols., 2000; Schwartz SB. y cols., 2003). Análisis de los haplotipos de portadores de esta mutación demuestran que éstos no comparten un origen ancestral común (Pierce E. y cols., 1999; Payne A. y cols., 2000). Estudios adicionales aportan una explicación de la alta frecuencia observada para esta mutación más cercana a la existencia de una región de alta frecuencia de mutaciones (“hotspot”) que a un “efecto fundador” en los individuos portadores (Sullivan LS. y cols., 1999; Bowne SJ. y cols., 1999). Se ha descrito esta misma mutación como mutación de *novo* en un caso esporádico, lo cual ratifica esta hipótesis (Schwartz SB. y cols., 2003).

Se ha realizado un cribado de la mutación Arg677X en nuestros pacientes y se ha detectado en dos familias no relacionadas, por lo que esta mutación también

está representada en la población española. Estudios de haplotipos realizados posteriormente, demuestran que estas dos familias españolas son independientes entre sí.

Se han detectado otras tres mutaciones, **Gln686X**, **K705fsX737** y **K722fsX712**, que también generan proteínas truncadas. Se ha comprobado la co-segregación de las tres mutaciones con la enfermedad en sus familias respectivas y se han observado, en las tres familias, individuos que presentan la mutación y sin embargo son asintomáticos. El hecho de que la mayoría de ellos pertenezcan a las últimas generaciones de sus respectivas familias sugiere que todavía no hayan manifestado los síntomas clínicos de la enfermedad pero puedan hacerlo en un futuro. Sin embargo, las familias en las que se han detectado las mutaciones Gln686X, K705fsX737, Arg677X, presentan individuos con mutación, asintomáticos y con edades superiores a otros individuos con mutación y afectados de RP de la misma familia.

La penetrancia incompleta de estas mutaciones en las respectivas familias, conduce a establecer una hipótesis de mecanismo patogénico de haploinsuficiencia antes que de efecto dominante negativo.

Así mismo, se han descrito dos pacientes con una mutación en este gen en homocigosis (Sullivan L, y cols., 1999), éstos presentan un inicio de la enfermedad más temprano y unos síntomas mucho más severos que otros pacientes heterocigotos para la misma mutación, lo que también apoya la teoría de un mecanismo patogénico relacionado con la dosis génica.

Sin embargo, el fenotipo que generan las mutaciones descritas en este gen es, en general, mucho más leve que el observado en pacientes portadores de mutaciones en otros genes, como por ejemplo el gen RHO.

La mayoría de las mutaciones detectadas en el gen RP1 originan proteínas truncadas con un tamaño de aproximadamente un tercio de la proteína total. Se ha detectado una mutación en la región C-terminal que ocasiona una proteína truncada con un tamaño que corresponde aproximadamente a la mitad de la proteína completa. Sin embargo, esta mutación no causa RP. Además, no se detectan mutaciones causantes de RP en la región C-terminal de la proteína. Así, las mutaciones causantes de RP se encuentran en el último exón del gen

RP1, lo que permite que la proteína truncada sea expresada. Teniendo en cuenta estos factores no podemos descartar, frente a la hipótesis de haploinsuficiencia, que los mutantes truncados de RP1 no sean causantes de algún efecto deletéreo en las células fotorreceptoras que conduzca a la manifestación de RP. Se requieren experimentos de expresión de estos mutantes en modelos animales, que permitirán plantear hipótesis fundadas sobre el mecanismo patogénico que inducen estos mutantes.

En una familia se detectó la mutación **Thr752Met**, pero no se observó co-segregación de la mutación con la enfermedad por lo que ésta quedó excluida como causa de RP en esta familia.

Las mutaciones detectadas en este gen suponen un 3,5% (5 de 150), de las mutaciones causantes de RPAD en España.

Genes NRL y CRX.

Los genes NRL y CRX codifican factores de transcripción que intervienen en la regulación de la expresión del gen de la rodopsina (Kummart y cols., 1996; Chen y cols., 1997). Mutaciones detectadas en ambos genes se han asociado a RPAD (Bessant DA. y cols., 1999; Martínez-Gimeno. y cols., 2001)

La frecuencia de mutaciones detectadas en el gen CRX como causantes de RP es baja y dudosa.

Se ha detectado la mutación **G4862A** en el intrón 2 del gen CRX en una familia RPAD y en un caso esporádico. Al ser una mutación localizada en una región no codificante del gen no es candidata a ser la mutación causante de RP. Sin embargo, la mutación se ha detectado únicamente en los dos pacientes afectados de la familia, estando ausente en los otros tres miembros sanos de la familia analizados. Esta co-segregación de la mutación con la enfermedad en la familia, junto con la detección de la misma mutación en un caso esporádico, establece dudas sobre la verdadera implicación de la mutación como causa de la enfermedad. La posición de la mutación, próxima a la región 5' del tercer exón, sugiere una posible contribución del nucleótido substituido en secuencias

consenso de procesamiento o empalme (“splicing”) del ARN transcrito primario. Futuros estudios en esta línea esclarecerán la relación de esta mutación con la enfermedad en esta familia.

Además, debe tenerse en cuenta el hecho de que no ha sido posible el análisis de todos los miembros integrantes de la familia. El análisis de la totalidad de los miembros de la familia podría eliminar cualquier relación causal de la mutación con RPAD.

En el análisis del gen NRL, se han detectado dos mutaciones sin sentido, **Pro51Leu** y **Gly122Glu** (Martínez-Gimeno y cols., 2001). Son las únicas mutaciones detectadas en este gen, asociado a RP, en la población española. Así, la frecuencia de mutaciones detectadas en el gen NRL como causantes de RP, suponen un porcentaje inferior al 1% de las mutaciones causantes de RPAD en España. El gen NRL presenta una secuencia codificante altamente conservada (Farjo Q. y cols., 1997).

La mutación Pro51Leu se ha detectado en una familia RPAD, mientras que la mutación Gly122Glu se ha detectado en un caso esporádico y por ello serán necesarios estudios adicionales para poder afirmar que esta mutación es la causante de RP en este caso.

Se han detectado también dos mutaciones silenciosas, **Leu155Leu** y **Val245Val**, en la secuencia codificante del gen que no co-segregan con la enfermedad en las familias en las que fueron detectadas por lo que se excluyen como causantes de RP.

El residuo Pro51 está localizado en una de las dos regiones altamente conservadas del dominio de transactivación (TA), que abarcan los residuos 3-27 y 41-54 respectivamente, de la proteína y también se encuentra en otros miembros de la familia Maf de proteínas que contienen este dominio (Swaroop A. y cols., 1992; Bessant DA. y cols., 1999).

Cambios aminoacídicos en el dominio TA deben alterar la actividad, especificidad o capacidad de interacción de la proteína Nrl con otros factores de transcripción (Bessant DA. y cols., 1999).

La mutación encontrada en la posición 122, produce un cambio de un aminoácido no polar (glicina) a otro de naturaleza ácida (glutámico). A pesar de lo conservado de este residuo y de no haber detectado esta mutación en 50 controles analizados, queda todavía por demostrar de forma inequívoca que esta mutación sea la causa de la RP en este caso esporádico.

La mutación **Pro51Leu** se encuentra contigua a la mutación Ser50Thr, que ha sido detectada en cuatro familias inglesas en las que se ha observado un origen ancestral común “efecto fundador” (Bessant DA. y cols., 2000).

Recientemente se han descrito tres mutaciones más en la población americana afectada de RPAD: Ser50Pro, Ser50Leu (descrita en dos familias no relacionadas) y Pro51Thr (De Angelis MM. y cols., 2002); los tres cambios se producen en los mismos residuos que las mutaciones descritas por nuestro grupo y el grupo inglés lo cual confirma la elevada conservación de la secuencia codificante de este gen.

Los dos residuos aminoácidos 50 y 51 del gen NRL se localizan en el dominio de transactivación del factor de transcripción Nrl (TA), y por ello, establecimos la hipótesis de que mutaciones que afecten a estos dos residuos contiguos compartan el mismo mecanismo patogénico que conduce al fenotipo de RP.

Así, experimentos de transfección génica en cultivos celulares realizados con el mutante Ser50Thr del gen NRL, con y sin el gen CRX, sugieren un aumento en la transcripción del gen RHO en presencia del mutante (Bessant DA. y cols., 1999). Si esta alteración en la transcripción de este gen produce el mecanismo patogénico que conduce a la enfermedad RP, no está demostrado. Sin embargo, sí se ha descrito en modelos animales que, alteraciones en la expresión de RHO tanto por exceso como por defecto producen muerte celular del fotorreceptor (Olsson JE. y cols., 1992; Humphries M. y cols., 1997), como se ha comentado anteriormente.

Para comprobar el efecto producido en la transactivación del promotor del gen RHO por los mutantes P51L y G122E del gen NRL, detectados en la población española, se han realizado experimentos de transfección génica similares a los realizados por el grupo inglés mencionado anteriormente.

La región del promotor del gen RHO empleada para realizar este estudio está comprendida entre los residuos (-130 / +66). Esta región promotora contiene dos secuencias que ejercen una modulación positiva de la transcripción, la primera se extiende desde el nucleótido -40 hasta el -84pb y la segunda abarca desde el nucleótido -84 hasta el -130 (Kumar R., y cols., 1996). La primera secuencia constituye la región NRE de unión del factor Nrl y la segunda región actúa sinérgicamente con la primera al contener las regiones, BAT-1 y Ret-4, de unión del factor de transcripción Crx al promotor del gen RHO.

Estudios *in vitro* de transfección génica han demostrado que esta región promotora permite la máxima expresión del gen RHO en presencia de los dos factores de transcripción Nrl y Crx (Kumar R. y cols., 1996; Chen S. y cols., 2002).

Los resultados obtenidos demuestran que ambos mutantes producen un aumento significativo de la transcripción del gen RHO, con respecto a la proteína en estado salvaje. Así, se establece la hipótesis de un mecanismo patogénico relacionado con la alteración en la expresión del gen RHO, en concreto con la sobreexpresión de este gen.

Así mismo, se ha realizado un cribado de mutaciones sobre nuestros pacientes en la región 5' del gen RHO, que contiene las secuencias promotoras con las regiones de unión a los factores de transcripción específicos Nrl y Crx, en la que no se ha detectado ninguna mutación.

El único cambio frecuente descrito en la región 5'UTR del gen de la rodopsina es el polimorfismo A269G, que se observa con una frecuencia de 0.17 en la población española y que no presenta relación alguna con RP.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. La aplicación sistemática de los protocolos internacionales diseñados para el estudio de las retinopatías hereditarias en el estudio de los pacientes, ha permitido en la mayoría de los casos su clasificación clínica y genética.
2. Los estudios actuales sitúan el porcentaje de pacientes afectados de retinosis pigmentaria autosómica dominante, cerca del 30 % (14 % de las familias) en la población española afectada de RP. Ha sido posible determinar el origen molecular de la enfermedad en, aproximadamente, el 20% de las familias RPAD. Este resultado indica que en el 80% de dichas familias no se ha podido establecer todavía su origen molecular. Se estima que se han estudiado hasta el momento un 30% de todas las familias afectadas de RPAD en España.
3. El origen molecular más frecuente (17%) de la RPAD, determinado en la población estudiada, se debe a mutaciones en el gen de la rodopsina. Las mutaciones detectadas en este gen se presentan de forma dispersa a en su secuencia. Solamente la mutación Pro347Leu se detectó en cuatro familias independientes. La mutación mayoritaria (12%) en la población afectada de RPAD norteamericana, no se observa en la población española.
4. Los estudios de correlación genotipo-fenotipo en pacientes portadores de mutaciones en el gen de la rodopsina, muestran la heterogeneidad de la enfermedad. Sin embargo, puede establecerse una cierta correlación entre las mutaciones que afectan a la región intradiscal de la rodopsina, en general, con un tipo de RP regional; las mutaciones que afectan a la región transmembrana con un tipo de RP difuso y, las mutaciones que afectan al dominio citoplasmático, con una clínica de aparición precoz y en general más severa.

5. La frecuencia de mutaciones en el gen RDS-periferina, causante de RPAD, es baja en la población española. No se detectó ninguna mutación asociada a RPAD. Sin embargo, se detectaron tres mutaciones en siete familias afectadas de distrofia macular autosómica dominante (DMAD), lo que puede sugerir una alta incidencia de mutaciones en el gen RDS-periferina en familias afectadas de DMAD.
6. La frecuencia de mutación en la región 5' del cuarto exón del gen RP1, asociado a RPAD, es de aproximadamente el 3% en la población estudiada. Todas las mutaciones detectadas en el gen RP1 que se asocian con RP generan proteínas truncadas. La mutación en el codón 677 del gen RP1, observada en familias RPAD independientes de diversas poblaciones, se detecta en la población española, por lo que apoya la hipótesis de que el codón 677 es un punto frecuente de mutación ("hot spot") en RPAD.
7. La clínica de RP que presentan los portadores de mutaciones en el gen RP1 es, en general, más leve que la observada en pacientes con mutaciones en otros genes asociados a RPAD. Se observan portadores de la mutación sin clínica de RP, lo que muestra un efecto de penetrancia incompleta de la enfermedad para algunas de las mutaciones en el gen RP1.
8. Los genes de los factores de transcripción Crx y Nrl muestran una baja variabilidad en sus secuencias. Hasta el momento se han detectado sólo dos mutaciones en el gen NRL asociadas a RPAD y una a un caso esporádico. Dos de estas tres mutaciones en NRL se detectaron en la población estudiada.
9. Estudios *in vitro* de los mutantes de NRL detectados en la población española, muestran una regulación diferencial del promotor del gen de la rodopsina produciendo una sobre expresión del gen regulado. Se postula que una sobre alteración de la dosis génica puede ser un mecanismo patológico que desencadene la enfermedad.

10. Solo se detectó el origen molecular, en genes asociados a RPAD, en el 2% de los casos esporádicos o aislados de RP, que constituyen más del 19% de los pacientes de RP. Esta baja frecuencia sugiere que este grupo de pacientes puede estar constituido por casos recesivos, varones con RP asociada al cromosoma X, o bien, su origen puede estar en mutaciones en algun(os) genes dominantes actualmente desconocidos.

VII. BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, Pearce-Kelling SE, Anand V, Zeng Y, Maguire AM, Jacobson SG, Hauswirth WW, Bennett J. Gene therapy restores vision in canine model of childhood blindness. *Nature Genetics* 2001; May 28(1):92-5.
- Aherne A, Kennan A, Bowne SJ, Daiger SP, Engel PC, Farrar GJ, Kenna PF, Humphries P. Functional analysis in IMPDH1 gene implicated in RP10 form of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:E-Abstract 3564.
- Ahmad J. Mash-I is expressed during ROD photoreceptor differentiation and binds an F-box , F(opsin)-1 in the rat opsin gene. *Brain Res Devl* 1995; 90:184-189.
- Ali R, Sarra M, Stephens C, de Alwis M. et al. Restoration of photoreceptor ultraestructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nature Genet.* 2000; 25:306-314.
- Alvarez A, Arostegui E, Martin R, Molina M, Durna M, Tejada I. Role of Pro23Leu mutation in familiy affected by retinitis pigmentosa in the Basque Contry. *Clin Genet* 1999; 56 : 407-408.
- Allikmets R, Singh N, Sun H, Shroyer NF, Hutchinson A, Chidambaram A, Gerrard B, Baird L, Stauffer D, Peiffer A, Rattner A, Smallwood P, Li Y, Lewis RA, Arikawa K, Molday L, Molday R, Williams D. Localization of peripherin/rds in the disc membranes of cone and rod photoreceptors: relationship to disc membrane morphogenesis and retinal degeneration. *J Cell Biol.* 1992; 116: 659-667.
- Andrés A. Caracterización estructural y funcional de mutantes de rodopsina asociados a retinosis pigmentaria (tesis doctoral). Barcelona: UAB. 2002.
- Andrés A, Garriga P, Manyosa J. Altered functionality in rhodopsin point mutants associated with retinitis pigmentosa. *Biochem Biophys Res Común* 2003; 303:294-301.
- Antiñolo G, Sanchez B, Borrego S, Rueda T, Chaparro P. and Cabeza J.C. Identification of a new mutation at codon 171 of rhodopsin gene causing autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum.Mol.Genet.* 1994; 3: 1421-1421.
- Arikawa K, Molday L, Molday R, Williams D. Localization of peripherin/rds in the disc membranes of cone and rod photoreceptors: relationship to disc membrane morphogenesis and retinal degeneration. *J Cell Biol.* 1992; 116:659-667.
- Ayuso C, García-Sandoval B, Nájera C, Valverde D, Carballo M, Antiñolo G. Retinitis pigmentosa in Spain. *Clin. Genet.* 1995; 48:120-122.

- Ayuso C, Reig C, García-Sandoval B, Trujillo MJ, Antiñolo G, Borrego S, Carballo M. G106R Rhodopsin mutation is also present in Spanish ADRP patients. *Ophthalmic Genetics* 1996, 17:95-101.
- Ayuso C, Trujillo MJ, Robledo et al. Novel rhodopsin mutation in an autosomal dominant retinitis pigmentosa family: phenotypic variation in both heterozygote and homozygote Val137Met mutant patients *Hum Genet* 1996; 98:51-54.
- Ayuso C, Trujillo MJ, Sanz R, García-Sandoval B. Genetic epidemiology of retinitis pigmentosa in Spain. *Med Genetik* 1997; 9:33 (suplemento).
- Ayuso C, Trujillo MJ, Sanz R, Sandoval B, Ramos C, Serrano JM & García-Sandoval B. Intrafamilial phenotypic variation in an autosomal dominant retinal dystrophy caused by a new RDS/peripherin Gly208Asp mutation.(En preparación).
- Bardiem-Kurger S, Greenberg J, Tubb B. et al. Refinement of the RP17 locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa, construction of a YAC contig and investigation of the candidate gene retinal fascin. *Eur J Hum Genet* 1999; 7:332-338.
- Bareil C, Hamel C, Pallarés-Ruiz N, Arnaud B, Demaille J, Claustres M. Molecular analysis of the rhodopsin gene in southern France: identification of the first duplication responsible for retinitis pigmentosa, c.998^999ins4. *Optal Genet* 1999; 20(3):173-182.
- Bascom RA, Liu L, Heckenlively JR, Stone EM, McInnes RR. Mutation analysis of the ROM1 gene in retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet.* 1995; 4: 1895-1902.
- Bascom RA, Liu L, Humphries P, Fishman GA, Murray JC, McInnes RR. Polymorphisms and rare sequence variants at the ROM1 locus. *Hum Mol Genet.* 1993b; 2: 1975-1977.
- Bascom RA, Manara S, Colliná L, Molday RS, Kalnins VI, McInnes RR. Cloning of the cDNA for a novel photoreceptor membrane protein (rom-1) identifies a disk rim protein family implicated in human retinopathies. *Neuron* 1992; 8:1171-1184.
- Bascom RA, Schappert K, McInnes RR. Cloning of the human and murine ROM1 genes: genomic organization and sequence conservation. *Hum Mol Genet* 1993a; 2:385-391.
- Bascom RA, Liu L, Humphries P, Fishman GA, Murray JC, McInnes RR. Polymorphisms and rare sequence variants at the ROM1 locus. *Hum Mol Genet.* 1993b; 2: 1975-1977.
- Bascom RA, Liu L, Heckenlively JR, Stone EM, McInnes RR. Mutation analysis of the ROM1 gene in retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet.* 1995; 4:1895-1902.

- Baum L, Chan WM, Yeung KY, Lam DS, Kwok AK, Pang CP. RP1 in Chinese: Eighth novel variants and evidence that truncation of the extrema C-terminal does not cause retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* 2001; 17:435.
- Berson EL. Retinitis Pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993; 34:1659-1676.
- Berson E, Grimsby JL, Adams SM et al. Clinical features and mutations in patients with dominant retinitis pigmentosa-1 (RP1). *Inves Ophthalmic & Visual Scie* 2001; 2217-2224.
- Berzal-Herranz A y Barroso del Jesus A. Ribozymes, a new therapeutic strategy? *Ars Pharmaceutica* 1997; 38:2-3,177-190.
- Bessant DA, Payne M, Mitton K, Wang QL, Swain P, Plant C, Bird A, Zack D, Swaroop A, Bhattacharya SS. A mutation in NRL is associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 1999;21:355-356.
- Bessant DA, Payne AM, Plant C, Bird AC, Swaroop A. and Bhattacharya S. NRL S50T mutation and the importance of "founder effects" in inherited retinal dystrophies. *Eur J Hum Genet.* 2000; 8:783-787.
- Bessant DA, Ali RR, Bhattacharya SS. Molecular genetics and prospects for therapy of the inherited retinal dystrophies. *Curr Opin Genet Dev* 2001 Jun;11:307-316
- Bibb LC, Holt JKL, Tarttelin EE et al. Temporal and spatial expression patterns of the CRX transcription factor and its downstream targets: critical differences during human and mouse eye development. *Hum Mol Genet.* 2001; 10:1571-1579.
- Blanton SH, Heckenlively JR, Cottingham AW et al. Linkage mapping of autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP1) to the pericentric region of human chromosome 8. *Genomics* 1991; 11:857-869.
- Borrego S., Sanchez B., Ruiz A., and Antinolo G. Missense Mutation A346P In The Rhodopsin Gene In One Family With Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa; *Hum.Mutat* 1996; 7: 180-181.
- Bowne SJ, Daiger S, Hims M et al. Mutations in the RP1 gene causing autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum.Mol Genet* 1999; 8:2121-2128.
- Bowne SJ, Sullivan LS, Blanton SH, Cepko CL, Blackshaw S, Birch DG, Hughbanks-Wheaton D, Heckenlively and Daiger SP. Mutations in the inosine monophosphate dehydrogenase 1 gene (IMPDH1) cause the RP1 form of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Human Mol Genet* 2002; 11, 5:559-568.
- Bridges CD. Vitamin A and the role of the pigment epithelium during bleaching and regeneration of rhodopsin in the frog eye. *Exp Eye Res.* 22: 435-455,1976.
- Brown J ,Beggs J. Roles of PRP8 protein in the assembly of splicing complex, *EMBO J* 1992; 11: 3721-3729.

- Cartegni L, Chew SL, y Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature Rev Genet* 2002; 3:285-289.
- Cartegni L, Krainer AR. Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nature Struct Biol* 2003; 10:120-125.
- Chabre M., Deterre Ph. Molecular mechanisms of visual transduction. *Eur J Biochem* 1989; 179: 255-266.
- Chakarova C, Hims M, Bolz H. et al. Mutations in HPRP3, a third member of pre-mRNA splicing factor genes, implicated in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 2002; 11:87-92.
- Chen S. and Zack DJ. Ret 4, a positive acting rhodopsin regulatory element identified using a bovine retina in vitro transcription system. *J Biol Chem* 1996; 271:28549-28557.
- Chen S, Wang QL, Nie Z, Sun H, Lennon G, Copeland N, Gilbert D. y cols. Crx, a novel Otx-like paired homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* 1997; 19:1017-1030.
- Chen S, Wang QL, Xu S, Liu I, Li LY, Wang Y and Zack DJ. Functional analysis of cone-rod homeobox (CRX) mutations associated with retinal dystrophy. *Hum Mol Genet* 2002; 11(8):873-884).
- Chow AY, Pardue MT, Perlman JI, Ball SL, Chow VY, Hetling JR, et al. Subretinal implantation of semiconductor-based photodiodes: durability of novel implant designs. *J Rehabil Res Dev* 2002; 39:313-21.
- Clarke G, Goldbeg AF, Vidgen D, Collins L, Ploder L, Schwarz L, Molday LL, Rossant J, Szel A, Molday RS, Birch Dg, McInnes RR. Rom-1 is required for rod photoreceptor viability and the regulation of disk morphogenesis. *Nat Genet* 2000; 25(1):67-73.
- Coffey PJ, Girman S, Wang SM, Hetherington L, Keegan DJ, Adamson P, et al. Long-term preservation of cortically dependent visual function in RCS rats by transplantation. *Nat Neurosci* 2002; 5:53-56.
- Colley NJ, Cassill JA, Baker EK, Zuker CS. Defective intracellular transport is the molecular basis of rhodopsin-dependent dominant retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:3070-3074.
- Connel GJ, Molday RS. Molecular cloning. Primary structure and orientation of the vertebrate photoreceptor cell protein peripherin in the rod outer segment disk membrane. *Biochemistry* 1990; 29:4691-4698.
- Curtis H. *Biología* 4^a Ed. Editorial Médica Panamericana, Mexico DF, 1985.
- De Angelis MM, Grimsby JL, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP. Novel mutations in the NRL gene and associated clinical findings in patients with dominant retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 2002; 120:369-375.

- Deamen FJM. Vertebrate rod outer segment membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 1973; 300: 255-288.
- DesJardin LF and Hauswirth WW. Developmentally important DNA elements within the bovine opsin upstream region. *Invest Ophthal Visual Sci* 1996; 37:154-165.
- Dryja T, McGee TL, Hahn LB. et al. Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *N Engl J Med* 1990; 323:1302-1507.
- Dryja T, McGee T, Reichel E. y cols. A point mutation of the rodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 1990; 343:364-366.
- Dryja T, Berson E, Vikram R, Oprian D. Heterozygous missense mutation in the rhodopsin gene as a cause of congenital stationary night blindness. *Nature Genet* 1993; 4:280-283.
- Dryja T, Berson EL. Retinitis pigmentosa and allied diseases: implications of genetic heterogeneity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:197-200.
- Dryja T, Li T. Molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 1995; 4:1739-1743.
- Dryja T, Hahn L, Kajiwara K, Berson E. Dominant and digenic mutations in the periferin/RDS and ROM1 genes in retinitis pigmentosa. *Inves Ophtal Visual Scie* 1997; 38:1972-1982.
- Farjo Q, Jackson A, Pieke-Dahl S, Scott K, Kimberling W, Sieving P, Richards J, et al. Human bZIP transcription factor gene NRL: structure, genomic sequence and fine linkage mapping at 14q11.2 and negative mutation analysis in patients with retinal degeneration. *Genomics* 1997; 45: 395-401
- Farrar GJ, Kenna P, Jordan SA, Kumar SR, Humphries P. A sequence polymorphism in the human peripherin/RDS gene. *Nucl Ac Res* 1991; 19:6982.
- Farrar G, Kenna P, Jordan S, et al. A three-base-pair deletion in the periferin-RDS gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 1991; 354:478-480
- Farrar GJ, Kenna P, Humphries P. On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation independent approaches to therapeutic intervention. *EMBO Journal* 2002; 21:857-864.
- Fischer SG, Lerman LS. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* 1979; 16:191-200-
- Fishman GA, Alexander KR, Anderson RJ. Autosomal dominant retinitis pigmentosa: A method of classification. *Arch Ophthalmol* 1985; 103:366-374.
- Floch et al. Cationic phospholipids as non viral vectors for DNA transfection in hematopoietic cell lines and CD34+ cells. *Blood Cells, Molec.& Diseases* 1997; 23:69-87.

- Freund C, Gregory-Evans C, Furukawa T, Papaioannou M et al. Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor Cell 1997; 91:543-553.
- Furukawa T, Morrow EM, And Cepko CL. Crx, a novel *otx*-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. Cell 1997; 91:531-541.
- Furukawa T, Morrow EM, Li T, Davis FC, and Cepko CL. Retinopathy and attenuated circadian entrainment in *Crx*-deficient mice. Nat Genet 1999. 23:466-470.
- Gao J, Cheon K, Nusinowitz S, Liu Q, Bei D, Atkins K, Azimi A, Daiger SP, Farber DB, Heckenlively JR, Pierce EA, Sullivan L. Progressive photoreceptor degeneration, outer segment dysplasia, and rhodopsin mislocalization in mice with targeted disruption of the retinitis pigmentosa-1 (Rp1) gene. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:5698-5703.
- Garriga P, Liu X, Khorana HG. Structure and function of rhodopsin: correct folding and misfolding in point mutants and in proximity to the site of the retinitis pigmentosa mutation Leu-125-Arg in the transmembrane helix C. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:4560-4.
- Gleeson JC, Allen KM, Fox JW et al. Doublecortin, a brain specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. Cell 1998;92:63-72.
- Gleeson JC, Liu PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. Neuron 1999;23:257-271.
- Goldberg AFX, Moritz OL, Molday RS. Heterologous expression of photoreceptor peripherin/rds and rom-1 in COS-1 cells: assembly, interactions and localization of multisubunit complexes. Biochemistry 1995; 34: 14213-142219.
- Grover S, Fishman GA and Stone EM. Clinical features of a severe form of autosomal dominant retinitis pigmentosa in a large family with a novel IMPDH1 mutation (Arg321Pro). Invest Ophthalmol Vis Sci 2003; 44:E-Abstract 540.
- Grüning G, Millán JM, Meins M, Beneyto M, Caballero M, Apfelstedt-Sylla E, Bosch R, Zrenner E, Prieto F, Gal A. Mutations in the human peripherin/RDS gene associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. Hum Mut 1994, 3: 321-323.
- Guillonneau X, Piriev NL, Danciger M et al. A nonsense mutation in a novel gene is associated with retinitis pigmentosa in a family linked to the RP1 locus. Hum Mol Genet 1999;8:1541-1546.

- Guyton AC. Tratado de Fisiología Médica 8ª Ed. Interamericana McGraw-Hill; Madrid 1992.
- Haim M. Retinitis Pigmentosa: problems associated with genetic classification. Clin Genet 1993; 44:62-70.
- Hayakawa M, Hoha Y, Imai Y. et al. Clinical features of autosomal dominant retinitis pigmentosa with rhodopsin gene codon 17 mutation and retinal neovascularization in a Japanese patient. Am J Ophthalmol 1993; 115:168-173.
- Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP?. Hum Mutat 1993; 2:338-346.
- Heng H, Wang A, Hu J. Mapping of the human HPRP3 and HPRP4 genes encoding U4/U6 associated splicing factor to chromosomes 1q21.1 and 9q31-q33. Genomics 1998; 48:273-275.
- Horesh D, Sapir T, Francis F, Wolf SG, Caspi M. et al. Hum Mol Genet 1999; 8:1599-1610.
- Humphries P, Kenna P, Farrar GJ. On the molecular genetics of retinitis pigmentosa. Science 1992;256:804-808.
- Humphries M, Rancourt D, Farrar GJ, Kenna P, Hazel M, Bush R Sieving P et al. Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene. Nature Genetics 1997; 15:216-219.
- Hwa J, Garriga P, Liu X, Khorana HG. Structure and function in rhodopsin: packing of the helices in the transmembrane domain and folding to a tertiary structure in the intradiscal domain are coupled. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:10571-6.
- Inglehearn CF, Bashir R, Lester DH, Jay M, Bird AC and Battacharya SS. A 3-bp deletion in the rhodopsin gene in a family with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. Am J Hum Genet 1991; 48:26-30.
- Inglehearn CF, Tarttelin EE, Plant C, Peacock RE, al-Maghteh M, Vithana E, Bird AC, Bhattacharya SS. A linkage survey of 20 dominant retinitis pigmentosa families: frequencies of the nine known loci and evidence for further heterogeneity. J Med Genet 1998 Jan;35(1):1-5.
- John SWM, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. Nucleic Acids Res 1991;2:408.
- Kajiwara K, Hahn L, Mukai S, Travis G Bersom E, Dryja T. Mutations in the human retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. Nature 1991;354: 480-483.
- Kajiwara K, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP. A null mutation in the human peripherin/RDS gene in a family with autosomal dominant retinitis punctata albescens. Nature Genet 1993; 3:208-212.

- Kajiwara K, Berson E, Dryja T. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and Rom-1 loci. *Science* 1994; 264:1604-1607.
- Kedzierski W, Bok D, Travis GH. Transgenic analysis of rds/peripherin N-glycosylated effect on dimerization, interaction with rom1 and rescue of the rds null phenotype. *J Neurochem* 1999; 72:430-438.
- Keen TJ, Inglehearn CF. Mutations and polymorphisms in the human peripherin-RDS gene and their involvement in inherited retinal degenerations. *Hum Mut* 1996; 8:297-303.
- Kennan A, Aherne A, Palfi A, et al. Identification of an IMPDH1 mutation in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP10) revealed following comparative microarray analysis of transcripts derived from retinas of wildtype and Rho-/- mice. *Hum Mol Genet* 2002; 11:547-558.
- Kohl S, Christ Adler M, Apfelstedt-Sylla E, Kellner U, Eckstein A, Zrenner E, Wissinger B. RDS/Peripherin gene mutations are frequent causes of central retinal dystrophies. *J Med Genet* 1997; 34:620-626.
- Kolb H, Nelson R, Mariani A. Amacrine cells; bipolar cells and ganglion cells of the cat retina: a golgi study. *Vision Res* 1981; 21:1081-1114.
- Kolb H, West RW. Synaptic connections of the interplexiform cell in the retina of cat. *J Neurocytol* 1977; 6:155-170.
- Kolb H. The architecture of functional neural circuits in the vertebrate retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:2385-2404.
- Kumaranickavel G, Maw M, Denton MJ, John S, Srisailapathy CR, Orth U, Oehlman R, Gal A. Missense rhodopsin mutation in a family with recessive RP. *Nature Genet* 1994;8:10-11.
- Kumar R, and Zack DJ. Regulation of visual pigment gene expression. In Wiggs JL. (ed.), *Molecular Genetics of Ocular Diseases* 1994. Wiley-Liss, New York, pp.139-160.
- Kumar R, Chen S, Scheurer D, Wang QL, Duh E, Sung CH, Rehentulla A. and cols. The bZIP transcription factor Nrl stimulates rhodopsin promoter activity in primary retinal cell cultures. *J. Biol. Chem.* 1996; 271:29612-29618.
- Lao H, Mureau G, Lwin N Moore M. The human PRP8 protein in a component of both U2 and U12-dependant spliceosome complex *EMBO J* 1992;11:3721-3729.
- LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Lau-Villacorta C, Unoki K, Sung CH et al. Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:592-602.
- Lem J, Applebury ML, Falk JD, Flannery JG, and Simon MI. Tissue-specific and developmental regulations of rod opsin chimeric genes in transgenic mice. *Neuron* 1991; 6:201-210.

- Lindsay S, Inglehearn CF, Curtis A, Batacharya SS. Molecular genetics of inherited retinal degenerations. *Current Opinion in Genetics and Development* 1992; 2:459-466.
- Liu O, Daiger SP, Farber DB, Heckenlively JR, Sullivan LS, Zuo J, Milam AH and Pierce FA. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2002; 43:22-32.
- Liu X, Garriga P, Khorana HG. Structure and function in rhodopsin: correct folding and misfolding in two point mutations in the intradiscal domain of rhodopsin identified in retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:4554-4559.
- Livesey FJ, Furukawa T, Steffen MA, Church GM, and Cepko CL. Microarray analysis of the transcriptional network controlled by the photoreceptor homeobox gene *Crx*. *Curr Biol* 2000; 10:301-310.
- Macke JP, Davenport CM, Jacobson SG, Hennessey JC, Gonzalez-Fernandez F, Conway BP, Heckenlively J, Palmer R, Maumenee IH, Sieving P, et al. Identification of novel rhodopsin mutations responsible for retinitis pigmentosa: implications for the structure and function of rhodopsin. *Am J Hum Genet* Jul 1993; 53(1):80-9.
- Makarova O, Makarov E, Liu S, Vornlocher HP, Lührmann R. Protein 61, encoded by a gene (*PRPF31*) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6-U5 tr-snRNP formation and pre-mRNA splicing *EMBO J* 2002; 27:1148-1147.
- Maniatis T, Tasic B. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* 2002; 418:236-243.
- Manyosa J, Andrés A, Buzón V y Garriga P. Estructura de la rodopsina: luz en las sombras de las degeneraciones retinianas. *Med Clin* 2003; 121(4):153-7.
- Marmor MF, Holder GE, Porciatti V, Trick GL, Zrenner E. Guidelines for Basic pattern Electroretinography. Recommendations by the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. *Doc. Ophthalmol.* 1995-96, 91:
- Martínez-Gimeno M, Trujillo MJ, García-Sandoval B et al. Mutación Asp190Tyr en el gen de la rodopsina presente en una familia española afectada de retinosis pigmentaria autosómica dominante. *Med Clin* 2000; 115: 699-703.
- Martínez-Gimeno M, Trujillo MJ, Lorda I, Gimenez C, Calvo MT, Ayuso C, Carballo M. Three novel mutations P215L, T289P and A-G3811-2nt acceptor Splice site in the rhodopsin gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa in Spanish families. *Hum Mut* 2000; 16 (3) 278.
- Martínez-Gimeno M, Maseras M, Baiget M, Beneito M, Antiñolo G, Ayuso C, Carballo M. Mutations P51L and G122E in retinal transcription factor *NRL* associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mut* 2001;17: 520.

- Martínez-Gimeno M, Gamundi MJ, Hernan I et al. Mutation in pre-mRNA splicing factor genes PRPF3, PRPF8, and PRPF31 in Spanish families with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthal & Visual, Scie.* 2003 (en prensa).
- Massey SC. Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. *Prog. Ret. Res.* 1990; 9:339-425.
- McInnes RR and Bascom RA. Retinal genetics: a nullifying effect for rhodopsin. *Nat Genet* 1992; 1:155-157.
- McKie A, MacHale J, Keen J et al. Mutations in pre-mRNA splicing factor gene PRPF8 in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP13). *Hum Mol Genet* 2001;10:1553-1562.
- Millán JM, Nájera C, Beneyto M. *Genética Molecular de la retinosis pigmentaria.* *Med Clin (Barc)* 1994; 102: 30-32.
- Millán JM, Fuchs S, Paricio N, Wiedemann H, Gal A, Nájera C & Prieto F. Gly114Asp mutation of rhodopsin in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol and Cel Probes* 1995; 9:67-70.
- Mitton KP, Swain PK, Chen S, Xu S, Zack DJ and Swaroop A. The leucine zipper of NRL interacts with the CRX homeodomain. A possible mechanism of transcriptional synergy in rhodopsin regulation. *J Biol Chem* 2000; 275, 29794-29799.
- Mitton KP, Swain PK, Khanna H, Dowd M, Apel IJ, Swaroop A. Interaction of retinal bZIP transcription factor NRL with Flt3-interacting zinc-finger protein FIZ1: possible role as a transcriptional repressor. *Human Molecular Genetics* 2003; 12; 4:365-373.
- Morabito MA, Yu X. and Barnstable CJ. Characterization of developmentally regulated and retina-specific nuclear protein binding to a site in the upstream region of the rat opsin gene. *J Biol Chem* 1991; 266:9667-9672.
- Myers R, Maniatis T, Lerman L Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 1987;155:501-527.
- Nakazawa M, Kikama-Araki E, Shiono T, Tamai M. Análisis of rhodopsin gene in patients with retinitis pigmentosa using allele-specific polymerase chain reaction. *Jpn J Ophthalmol* 1991; 35:386-393.
- Nathans J, Hogness D. Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin. *Proc Acad Natl Sci USA* 1984; 81: 4851-4855.
- Nathans J, Leppert M, Dean M, Lupski JR. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* 1997; 15:236-246.

- Nichols BE, Sheffield VC, Vandenberg K, Kimura AE, Stone EM. Butterfly-shaped pigment dystrophy of the fovea caused by a point mutation in codon 167 of the RDS gene. *Nature Genet* 1993; 3: 202-207.
- Nicoletti A, Wong DJ, Kawase K, Gibson LH, Yang-Feng T, Richards JE, Thompson DA. Molecular characterization of the human gene encoding an abundant 61 kDa protein specific to the retinal pigment epithelium. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 641-649.
- Nie Z, Chen S, Kumar R and Zack DJ. *J Biol Chem* 1996; 271:2667-2675.
- Olsson JE, Gordon JW, Pawlik BS, Roof D, Hayes A, Molday RS, Mucay S. Transgenic mice with rhodopsin mutation (Pro23His): a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Neuron* 1992; 9:815-830.
- O'Neill B, Millington-Ward S, O'Reilly M, Tuoby G, Kiang AS, Kena P, Humphries P, Farrar GJ. Ribozyme-based therapeutic approaches for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest ophthalmol vis sci* 2000; 41:2863-2869.
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms. *Genomics* 1989; 5:874-879.
- Payne AM, Evans K, Plant C, Bird AC, Bhattacharya SS. The prevalence and effect of peripherin/RDS mutations in autosomal dominant pattern dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; S107.
- Payne AM, Downes SM, Bessant DA, Bird AC, Bhattacharya SS. Founder effect, seen in the British population, of the 172 peripherin/RDS mutation and further refinement of genetic positioning of the peripherin/RDS gene. *Am J Hum Genet* 1998; 62:192-195.
- Payne A, Vithana E, Khaliq S et al. RP1 protein truncating mutations predominate at the RP1 adRP locus. *Inves Ophthalmol & Visual Scien* 2000; 41:4069-4073.
- Pierce E, Quinn T, Meehan T, McGee T, Berson E, Dryja T. Mutations in a gene encoding a new oxygen-regulated photoreceptor protein cause dominant retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 1999; 22:248-254.
- Rawn JD. *Bioquímica Interamericana*. McGraw-Hill; Madrid, 1989.
- Reig C, Antich J, Gean E et al. Identification of a novel rhodopsin mutation (Met44Thr) in a simplex case of retinitis pigmentosa. *Hum Genet* 1994; 94: 283-286.
- Reig C, Llecha N, Antich et al. A missense mutation His211Arg and a silent Thr160Thr mutation within the rhodopsin gene in a Spanish autosomal dominant retinitis pigmentosa family. *Hum Mol Genet* 1994; 3:195-196.
- Reig C, Serra A, Gean E, Vidal M, Arumi J, de la Calzada MD, Antich J et al. A point mutation in the RDS-peripherin gene in a Spanish family with central areolar choroidal dystrophy. *Ophthalmic Genetics* 1995; 40: 39-44.

- Reig C, Antich J, Gean E, Heredia CD, Valverde D, Baiget M, Carballo M. Identificación de la mutación Arg-135-Leu en el gen de la rodopsina en una familia con retinosis pigmentaria autosómica dominante. *Med Clin (Barc)* 1996; 106 : 219-221.
- Reig C, Alvarez A, Tejada I, Molina M, Arostegui E, Martin R, Antich J, Carballo M. New mutation in the 3'-acceptor splice site of intron 4 in the rhodopsin gene associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa in a Basque family. *Hum Mutat* 1996b; 8:93-94.
- Reig C, Martinez-Gimeno M, Carballo M. A heterozygous novel C253Y mutation in the highly conserved cysteine residues of ROM1 gene is causing of retinitis pigmentosa in a Spanish family. *Hum Mut* 2000; 16 (1) 95-96.
- Reig C, Trujillo MJ, Martínez-Gimeno M, García-Sandoval B, Calvo MT, Ayuso C, Carballo M. Homozygous and heterozygous Gly-188-Arg mutation of the rhodopsin gene in a family with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Genetics* 2000a; 21:79-87.
- Rehemtulla A, Warwar R, Kumar R, Ji X, Zack D, Swaroop A. The basic motif-leucine zipper transcription factor Nrl can positively regulate rhodopsin gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93:191-195.
- Rivolta C, Berson EL, Dryja TP. Dominant Leber Congenital Amaurosis, Cone-Rod Degeneration and Retinitis Pigmentosa caused by mutant versions of the transcription factor CRX. *Hum Mutat* 2001; 18:488-498.
- Rivolta C, Sharon D, DeAngelis MM, Dryja TP. Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous genes, diseases and inheritance patterns. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1219-1227.
- Rosenfeld PJ, Cowley G, McGee T, Sandberg M, Berson E, Dryja T. A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 1992; 1:209-213.
- Rosenfeld PJ, Hahn LB, Sandberg MA, Dryja TP, Berson EL. Low incidence of retinitis pigmentosa among heterozygous carriers of a specific rhodopsin splice site mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36(11):2186-92.
- Saishin Y, Shimada S, Morimura H. Et al. Isolation of a cDNA encoding a photoreceptor cell-specific actin-binding protein: retinal fascin. *FEBS Lett.* 1997; 414:381-386.
- Saishin Y, Ishikawa R, Ugawa S. et al. Retinal fascin: functional nature, subcellular distribution and chromosomal localization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000 ; 41 : 2087-2095.
- Sanchez B, Borrego S, Chaparro P, Rueda T, López F & Antiñolo G. A novel null mutation in the rhodopsin gene causing late onset autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mut* 1996; 7:180.

- Sandberg M, Weigel-DiFranco C, Dryja T, Berson E. Clinical expression correlates with location of rhodopsin mutation in dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:1934-1942.
- Sanyal S, De Ruiter A, Hawkins RK. Development and degeneration of retina in rds mutant mice: light microscopy. *J Comp Neurol* 1980; 194:193-207.
- Sarra GM, Stephens C, Schlichtenbrede FC, Bainbridge JW, Thrasher AJ, Luthert PJ, et al. Kinetics of transgene expression in mouse retina following sub-retinal injection of recombinant adeno-associated virus. *Vision Res* 2002; 42:541-9.
- Schwartz SB, Aleman TS, Cideciyan AV, Swaroop A, Jacobson SG, Stone EM. De novo mutation in the RP1 gene (Arg677Ter) associated with retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3593-3597.
- Scriver CR, Beaudett AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th Ed. New York: McGraw-Hill 1995; 259-291.
- Shastri B. Retinitis pigmentosa and related disorders: Phenotypes of rhodopsin and peripherin/RDS mutations. *Am J Med Genet* 1994; 52:467-474.
- Sheffield V, Cox D, Lerman L, Myers R. Attachment of a GC-clamp to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single base changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:232-236.
- Sheffield VC, Fishman G, Beck J, Kimura A, Stone E. Identification of novel rhodopsin mutations associated with retinitis pigmentosa by GC-clamped denaturing gradient gel electrophoresis. *Am J Hum Genet* 1991; 49:699-706.
- Souied E, Rozet JM, Gerber S, Munnich A, Kaplan J. Rapid demonstration of mutations previously identified in parents at risk of patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *J Fr Ophthalmol* 1996; 19(4):265-70.
- Sullenger BA and Cech TR. Ribozyme mediated repair of defective mRNA by targeted trans-splicing. *Nature* 1994; 371:619-622.
- Sullivan LS, Heckenlively J, Bowne S, Zuo J, Hide W, Gal A, Denton M, Inglehearn C, Blanton S, Daiger S. Mutations in a novel retina-specific gene cause autosomal retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 1999; 22:255-259.
- Sullivan JM, Pietras KM, Shin BJ, Misasi JN. Hammerhead ribozymes designed to cleave all human rod opsin mRNAs which cause autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 2002; 8:102-13.
- Sung CH, Shneider BG, Agarwal D, Papermaster DS, Nathans J. Functional heterogeneity of mutant rhodopsin responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:8840-8844.

- Sung CH, Davenport C, Nathans J. Rhodopsin mutations responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *J Biol Chem* 1993; 268:26645-26549.
- Swain P, Chen S, Wang Q-L, Affatigato L et al. Mutation in cone-rod homeobox gene are associated with the cone-rod dystrophy photoreceptor degeneration. *Neuron* 1997; 10:1329-1336.
- Swaroop A, Xu J, Pawar H, Jackson A, Skolnick C, Agarwal N. A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:266-270.
- Swaroop A, Wang Q-L, Wu W, Cook J. et al. Leber congenital amaurosis by homozygous mutation (R90W) in the homeodomain of the retinal transcription factor CRX: direct evidence for the involvement of CRX in the development of photoreceptor function. *Hum Mol Mut* 1999; 8:299-305.
- Schwartz SB, Aleman TS, Cideciyan AV, Swaroop A, Jacobson SG, Stone EM. De novo mutation in the RP1 gene (Arg677ter) associated with retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Scie* 2003;44:3593-3597.
- Tam W, Steitz J. A novel spliceosome containing U11, U12 and U5 snRNPs excises a minor class (AT-AC) intron in vitro. *Cell* 1996; 84:801-811.
- Timmers AM, Newton BR and Hauswirth WW. *Exp Eye Res* 1993; 56:257-265.
- Travis GH, Christerson L, Danielson PE, Klisak I, Sparkers RS, Hahn LB, Dryja TP, Sutcliffe JG. The human retinal degeneration slow (RDS) gene: chromosome assignment and structure of the mRNA. *Genomics* 1991a; 10(3):733-739.
- Travis GH, Sutcliffe JG, Bok D. The retinal degeneration slow (rds) gene product is a photoreceptor disc membrane-associated glycoprotein. *Neuron* 1991b; 6(1):61-70.
- Travis GH. Insights from a lost visual pigment. *Nat Genet* 1997; 15: 115-7.
- Treisman JE, Morabito MA and Barnstable CJ. *Moll Cell Biol* 1988 ; 8:1570-1579.
- Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 2000; 287:2032-6.
- Trujillo MJ, Ayuso C, Robledo M, G-Sandoval B, Ramos C & Benitez J. Polymorphic variations in peripherine/RDS gene in the Spanish population. *Ann Genet* 1995; 38(4): 225-227.
- Trujillo MJ, del Río T, Reig C, Benítez J, García-Sandoval, Carballo M, Ayuso C. Mutación Pro347Leu en una familia española afectada de Retinosis Pigmentaria Autosómica Dominante. *Med Clin (Barc)* 1998; 110; 13:501-4

- Trujillo MJ, García-Sandoval B, Lorda I, Sanz R, Rodríguez de Alba M, Ibáñez A, Ramos C. and Ayuso C. Ser186Pro mutation of RHO gene in a Spanish autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP) family. *Ophthalmic Genet* 2000 ;21:251-256.
- Trujillo MJ, Martínez-Gimeno M, Gimenez A et al. Two novel mutation (Y141H; C214Y) and the previously published mutation (R142W) in the RDS-peripherin gene in autosomal dominant macular dystrophies in Spanish families. *Hum Mut* 2001; 17 (1) 80.
- van Lith-Verhoeven J, van der Velde-Visser S, Sohocki M et al . Clinical characterization, linkage analysis, and PRPF8 mutation analysis of a family with autosomal dominant retinitis pigmentosa type 13 (RP13). *Ophthalmic Genetics* 2002; 23:1-12
- Vithana EN, Abu-Safieh L, Allen MJ et al. A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11). *Mol Cell* 2001; 3:375-381
- Wada Y, Abe T, Takesbita T, Sato H, Yanasbima K, Tamai M. Mutation of human retinal fascin gene (FSCN2) causes autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:2395-2400.
- Wada Y, Toshiaki A, Toshitaka I, Hajime S, Miyuki K, Makoto T. Autosomal Dominant Macular Degeneration associated with 208delG mutation in the FSCN2 Gene. *Arch Ophthalmol* 2003; 121:1613-1620.
- Wada Y, McGee TL, Stillberger MA, Sandberg MA, Berson EL and Dryja TP. Mutation survey of the IMPDH1 gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa and review of the clinical findings associated with IMPDH1 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: E-Abstract 2306.
- Wang F, Luo Y, Chow Y et al. Identification and characterization of human genes encoding Hprp3p and Hprp4p, interacting components of the spliceosome. *Hum Mol Genet* (1997); 6:2117-2136.
- Wang MX, Sando RS, Crandall AS, Donoso LA. Recent advances in the molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Current Opinion in Ophthalmology*. 1995; 6(III)1-7.
- Wang Q, Chen Q, Zhao K, Wang L, Wang L, Traboulsi EI. Update on the molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Genet* 2001; 22:133-154.
- Wässle H., Boycott BB. Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol. Rev.* 1991; 71: 447-480.
- Weisz PB; Keogh RN. *La ciencia de la biología*. Ediciones Omega; Barcelona, 1987.

- Weleber RG, Carr R, Murphey WH, Sheffield V, Stone EM. Phenotypic variation including retinitis pigmentosa pattern dystrophy and fundus flavimaculatus in a single family with a deletion of codon 153 or 154 of the peripherin/RDS gene. *Arch Ophthalmol* 1993; 111:1531-1542.
- Wells J, Wroblewski J, Keen J, Inglehearn et al. Mutation in the human retinal degeneration slow (RDS) gene can cause either retinitis pigmentosa or macular dystrophy. *Natur Genet* 1993; 3:213-218.
- Wilden U, Hall SW, Kuhn H. Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:1174-8.
- Will C, Lührmann R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function, *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:290-301.
- Yau KW, Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. *The Friedenwald*
- Young RW, Bok D. Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol* 1969; 42: 392-403.
- Zack DJ, Bennett J, Wang Y, Davenport C, Klaunberg B, Gearhart J and Nathans J. Unusual topography of bovine rhodopsin promoter-*lacZ* fusion gene expression in transgenic mouse retinas. *Neuron* 1991; 6:187-199.
- Zinn KM, Marmor MF. *The retinal pigment epithelium*. Pg521. Harvard University Press; Cambridge; MA; 1979.

VIII. BASES DE DATOS

VIII. BASES DE DATOS

GDB Genome Data Base:

<http://www.gdb.org/>

HGMD The Human Gene Mutation Database:

<http://www.uwcm.ac.uk/mg/ngmdo.html>

IRPA Internacional Retinitis Pigmentaria Association:

<http://www.irpa.org/sci-news/>

Overview Molecular Ophthalmology:

<http://Mol.opth.uiowa.edu/>

PubMed Nacional Library of Medicine:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>

Retina International Newsletter:

<http://www.retina-international.org>

RetNet Retinal Network:

<http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>

Webvision:

<http://webvision.med.utah.edu/>

IX. PUBLICACIONES

IX. PUBLICACIONES

- Reig C, Trujillo Mj, Martínez-Gimeno M, García-Sandoval B, Calvo T, Ayuso C, Carballo M. Homozygous and heterozygous Gly-188-Arg mutation of the rhodopsin gene in a family with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Genetics* 2000; 21: 79-87.
- Martínez-Gimeno M, Trujillo MJ, Lorda I, Gimenez C, Calvo MT, Ayuso C, Carballo M. Three novel mutations P215L, T289P and A-G3811-2nt acceptor splice site in the rhodopsin gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa in Spanish families. *Hum Mut* 2000; 16 (3): 278.
- Reig C, Martínez-Gimeno M, Carballo M. A heterozygous novel C253Y mutation in the highly conserved cysteine residues of ROM1 gene is causing of retinitis pigmentosa in a Spanish family. *Hum Mut* 2000; 16 (1):95-96.
- Martínez-Gimeno M, Trujillo MJ, García-Sandoval B, Maseras M, del Rio MT, Ayuso C, Carballo M. Mutación Asp190Tyr en el gen de la rodopsina presente en una familia española afectada de retinosis pigmentaria autosómica dominante. *Med Clin* 2000; 115:699-703.
- Trujillo MJ, Martínez-Gimeno M, Gimenez A, Lorda I, García-sandoval B, Ramos C, Carballo M, Ayuso C. Two novel mutations (Y141H; C214Y) and the previously published mutation (R142W) in the RDS-peripherin gene in autosomal dominant macular dystrophies in Spanish families. *Hum Mut* 2001; 17 (1) 80.
- Martínez-Gimeno M, Maseras M, Baiget M, Beneito M, Antiñolo G, Ayuso C, Carballo M. Mutation in retinal-specific transcription factor NRL gene in autosomal dominant and sporadic retinitis pigmentosa. *Hum Mut* 2001; 17 (6) 520.

-
- Carballo M, Martínez-Gimeno M, Reig C. La Retinosis Pigmentaria Autosómica Dominante. En: La retinosis pigmentaria en España estudio clínico y genético. Ed. ONCE 2001; 103-128.
 - Martínez-Gimeno M, Gamundi MJ, Hernan I; Maseras M, Milla E, Ayuso C, García- Sandoval B, Beneyto M, Vilela C, Baiget M, Antiñolo G, Carballo M. Mutation in pre-mRNA spicing factor genes PRPF3, PRPF8, and PRPF31 in Spanish families with autosomal dominant retinitis pigmentosa. Invest Ophthal & Visual, Scie 2003; 44:2171-2177.
 - Gamundi MJ, Martínez-Gimeno M, Hernan I, Maseras M, García-Sandoval B, Ayuso C, Antiñolo G, Carballo M. RP1 protein truncating mutations causing autosomal dominant retinitis pigmentosa in a Spanish population. Invest Ophthal & Visual, Scie 2003; (En prensa).
 - Carballo M, Roig I, Aguila F, Pol MA, Gamundi MJ, Hernan I, Martínez-Gimeno M. Novel germline mutation in the c-KIT gene associated with gastrointestinal stromal tumor with cutaneous hyperpigmentation. Am J Med Genet 2004; (En prensa).
 - Hernan I, Roig I, Martín B, Gamundi MJ, Martínez-Gimeno M, Carballo M. De novo germline mutation in the serine-threonine kinase STK11/LKB1 gene associated with Peutz-Jeghers síndrome. Med Genet 2004; (En prensa).