

## **5. DISCUSSIÓ**

### 5.1. ESTUDI DEL GEN RLBP1 (*retinaldehyde-binding protein 1*)

El gen RLBP1 humà es localitza en la regió cromosòmica 15q26 (Sparkes i col., 1992). S'ha determinat una única còpia del gen humà RLBP1 que codifica per la proteïna CRALBP caracteritzada per expressar-se en l'EPR i en cèl·lules de Müller participant en el cicle visual necessari per la regeneració de la rodopsina. El gen RLBP1, amb un tamany de 29 Kb, està dividit en 8 exons i 7 introns. El rang de tamany dels exons varia entre 111pb i 555pb, i pel què fa als introns està comprès entre 255pb a 3152pb. El primer exó i part del segon i del vuitè no són traduïts a proteïna.

L'anàlisi mutacional del gen RLBP1 en famílies amb diferents distròfies de la retina, ha permès identificar mutacions associades a RPAR i a diverses variants fenotípiques considerades entitats clíniques diferenciades de la RP com són la retinosi punctata albescens (RPA), fundus albipunctata (FA), distròfia de Bothnia (DB) que es defineix com un tipus de retinosi punctata albescens procedent d'una àrea geogràfica del nord de Suècia amb una alta freqüència de distròfies retinals, i distròfia de bastons-cons de l'illa de Newfoundland (NFRCD) (Taula 10).

Taula 10. Mutacions descrites en el gen RLBP1 i els fenotips associats descrits.

Mutació 1	Mutació 2	Fenotip	Referència
R150Q	R150Q	RPAR, FA, RPA	Maw i col., 1997; Katsanis i col., 2001b
R233W	R233W	DB, RPA	Burststedt i col., 1999 i 2001; Morimura i col., 1999a
9483delC	9483delC	RPA	Morimura i col., 1999a
M225K	IVS3+2 T>C	RPA	Morimura i col., 1999a
IVS3+2 T>C	IVS3+2 T>C	NFRCD	Eichers i col., 2002
IVS3+2 T>C	324 G>A	NFRCD	Eichers i col., 2002
324 G>A	324 G>A	NFRCD	Eichers i col., 2002
R151W	91delGA	RPA	Fishman i col., 2004

Els diferents fenotips associats al gen RLBP1 difereixen per l'edat d'aparició, la progressió i el grau de severitat de la malaltia, però tots ells es caracteritzen per una

mala adaptació a les condicions de foscor i presenten una degeneració dels fotoreceptors que condueix a la pèrdua de visió.

S'han descrit sis mutacions causants de la patologia retinal en el gen que codifica per la proteïna CRALBP (Taula 10), de les quals tres són mutacions que impliquen un canvi d'aminoàcid i per aquest motiu és difícil determinar com afecten a l'estructura i a la funcionalitat de la proteïna. Maw i col. (1997) van identificar en el gen RLBP1 la mutació de canvi de sentit R150Q en homozigosi en una família amb RPAR. L'anàlisi molecular *in vitro* de la proteïna CRALBP amb presència de la mutació R150Q va permetre determinar l'efecte d'aquesta mutació sobre la funcionalitat de la proteïna CRALBP en el cicle visual. Els resultats van revelar que la proteïna CRALBP mutada presentava una solubilitat cinc vegades menor que la proteïna normal i que la proteïna amb la mutació no s'unia a l'11-cis-retinal, confirmant que aquesta mutació afectaria al domini d'unió als retinoids alterant la funció de la proteïna CRALBP, i causant en els pacients amb RP una deficiència en el cicle visual i per tant en la regeneració de la rodopsina.

A partir de l'estudi a nivell estructural de la proteïna, de les propietats d'unió al lligand i de l'anàlisi de paràmetres cinètics per avaluar la funcionalitat de la proteïna CRALBP que contenia les mutacions R233W i M225K, es va concloure que la mutació M225K aboleix la unió de la proteïna amb el retinoid, mentre que la mutació R233W potencia aquesta unió de la proteïna CRALBP pel lligand. Tot i que els efectes produïts són diferents, ambdues mutacions alteren la funcionalitat de CRALBP en el cicle visual afectant la cinètica d'associació i dissociació del lligand amb la proteïna, quedant alterades les reaccions enzimàtiques acoplades i afectant al flux global dels retinoids que va dirigit a la regeneració de la rodopsina (Golovleva i col., 2003).

Burstedt i col. (1999) van determinar l'existència d'un fort desequilibri de lligament entre els dos haplotips trobats en la població afectada de distròfia de Bothnia, indicant un origen fundador per la mutació identificada R233W. En un treball posterior amb un número més elevat de casos amb distròfia de Bothnia, procedents de la mateixa àrea geogràfica, mostraven que la prevalença de la mutació R233W era de 1:4500 (Burstedt i col., 2001).

En l'estudi de pacients amb distròfia de bastons-cons de la illa de Newfoundland (NFRCD) van trobar dos haplotips diferents per cadascuna de les dues mutacions,

suggerint que les dues eren introduïdes en la població de forma independent i que la mutació 324 G>C era l'adquirida inicialment per tenir una prevalença més gran en la població control d'aquesta àrea geogràfica aïllada genèticament.

Un treball recent ha portat a la identificació de dues noves mutacions (R151W i 91delGA) en un pacient amb RPA en forma de doble heterozigot. L'estudi clínic a nivell familiar ha revelat la presència de dipòsits blancs en la retina en aquells membres familiars que eren portadors de les mutacions en estat heterozigot. D'aquest estudi es dedueix que, malgrat no manifestar la patologia, els individus portadors d'una mutació en heterozigosi poden presentar alteracions característiques en el fons d'ull (Fishman i col., 2004)

En el present treball (apartat 4.1.1.) s'ha analitzat el compromís del gen RLBP1 en el procés de la degeneració retiniana en 50 famílies espanyoles amb criteris de RPAR i en 4 famílies addicionals amb un diagnòstic clínic de retinosi punctata albescens (RPA).

Mitjançant una estratègia d'estudi indirecte del gen RLBP1, es van estudiar marcadors polimòrfics extragènics (D15S116, D15S127 i D15S130) i un marcador intragènic (polimorfisme de restricció Pvull). L'anàlisi d'homozigositat en famílies consanguínies i l'estudi de cosegregació en les famílies no consanguínies van permetre excloure la implicació del gen RLBP1 en 24 famílies, representant el 44% de les famílies amb RPAR incloses en el present treball. En les altres 30 famílies (9 RPAR consanguínies, 17 RPAR no consanguínies i les 4 amb diagnòstic de RPA) es va seleccionar un individu afectat de cadascuna d'aquestes i es va efectuar un estudi mutacional de tots els exons incloent les seqüències que delimiten les regions exó/intró del gen RLBP1. Els resultats obtinguts van evidenciar la presència de:

1. la substitució d'una G>A en el lloc acceptor de l'*splicing* en l'intró 1, que correspon a l'extrem 5' del gen que no es tradueix a proteïna (5' UTR -101 G>A). Aquest canvi que es va detectar únicament en una família, no segregava amb la malaltia. Tampoc es va identificar en l'estudi de 100 cromosomes control. Al no complir els criteris que determinen quan un canvi és patològic, s'ha considerat com una variant genètica poc freqüent.
2. la substitució d'una A>C en el nucleòtid localitzat a la posició 654, afecta a la tercera base del codó 218 i no comporta canvi en l'aminoàcid corresponent (S218S), considerant-la com una variant silenciosa. Aquesta alteració es va

identificar en una sola família mentre que no va ser detectada en la mostra control (100 cromosomes).

3. dos polimorfismes freqüents no descrits localitzats en la part no codificant de l'intró 6 i en la part 3' no traduïda del gen, IVS6 +20 T>C i 3'UTR +167 G>T, respectivament.

Aquest treball evidencia que les mutacions en el gen RLBP1 no són les responsables del procés de degeneració retiniana que pateixen les famílies espanyoles incloses en aquest estudi. Per altra banda, els diferents treballs publicats que s'han esquematitzat a la Taula 10 i que inclouen un nombre important de pacients, indiquen que les alteracions en el gen RLBP1 són molt poc freqüents en malalts amb la forma autosòmica recessiva de la RP. La majoria de les mutacions identificades s'han descrit en altres entitats clíniques diferenciades, manifestant una clara heterogeneïtat genètica al·lèlica associada al gen RLBP1.

Pel què fa a la relació d'aquest gen amb el fenotip denominat retinosi punctata albescens, s'hi ha descrit diferents mutacions associades detallades en la Taula 10, però sempre en un percentatge molt baix de pacients. En el treball de Morimura i col., (1999a) només tres de 28 afectats de RPA presentaven alteracions del gen RLBP1. En els quatre malalts espanyols estudiats, el resultat de l'anàlisi va ser negatiu. Malgrat també s'han descrit mutacions en el gen de la periferina (Kajiwara i col. 1993) i de la rodopsina (Souied i col. 1996) associades al mateix fenotip, s'ha postulat que el terme retinosi punctata albescens, més que descriure una patró clínic homogeni, correspon a un grup d'anomalies de la retina que resulten de les alteracions genètiques heterogènies.

## 5.2. ESTUDI DEL GEN CRBP1 (*retinol-binding protein 1*)

El gen CRBP1 s'ha localitzat en la regió cromosòmica 3q21-q22 (Colantuoni i col., 1985; Colantuoni i col., 1986; De Baere i col., 1998). La regió codificant del gen CRBP1 està constituïda per 4 exons (de 24, 59, 33 i 16 aminoàcids respectivament) i ocupa una extensió genòmica de 21 Kb, de les quals 19Kb corresponen a l'intró 2.

Aquest gen codifica per la proteïna CRBP1 (*cellular retinol-binding protein 1*) que pertany a una família de proteïnes citosòliques amb capacitat d'unir-se a lligands hidrofòbics. La proteïna CRBP1 s'uneix de forma específica al derivat tot-trans-retinol i és responsable del seu transport intracel·lular en l'EPR. La relació d'aquest gen en el procés visual i la manca d'estudis mutacionals en pacients afectats de RP justifiquen l'anàlisi del gen CRBP1 en els casos inclosos en el present treball.

L'anàlisi mutacional dels quatre exons i de les seqüències adjacents s'ha efectuat en 88 pacients amb RPAR i 4 pacients amb un diagnòstic de retinosi punctata albescens no relacionats (apartat 4.2.1.). Únicament s'ha detectat en l'anàlisi del gen CRBP1 dues transicions C>T en la regió 5'UTR (ocupant les posicions -37 i -134 respecte a l'inici de la traducció). Es tracta de dos polimorfismes no descrits prèviament. La freqüència dels al·lels menys freqüents és de 6% i 10%, respectivament.

El canvi C>T en la posició -37 afecta a una de les seqüències CCGCCC (la més propera a l'inici de traducció) que s'ha postulat com a lloc d'unió a la proteïna SP1 (Nilsson i col., 1988). L'alteració que pot comportar el polimorfisme 5'UTR-37 C>T en la possible unió del factor de transcripció SP1 seria poc transcendent considerant que, s'ha descrit vuit seqüències d'hexanucleòtids (CCGCCC) en la regió 5' del gen CRBP1, i que a nivell familiar aquest canvi no cosegrega amb la patologia i és freqüent en la població estudiada. El canvi C>T en la posició -134 (5'UTR-134 C>T) no implica cap d'aquestes seqüències d'hexanucleòtids riques en G-C caracteritzades per presentar homologia als llocs d'unió a factors de transcripció.

L'anàlisi mutacional del gen CRBP1 en les famílies incloses en aquest treball és l'únic estudi que s'ha efectuat per tal d'avaluar la possible implicació d'aquest gen en la RP amb un patró d'herència autosòmica recessiva. Els resultats obtinguts permeten descartar les anomalies d'aquest gen com la causa directa de la patologia retiniana en l'ampli grup de pacients analitzats.

### 5.3. ESTUDI DEL GEN RGR (*RPE-G protein-coupled-Receptor*)

El gen RGR humà s'ha mapat en la regió cromosòmica 10q23 (Chen i col., 1996). Aquest gen ocupa una extensió genòmica de 14.8Kb i la regió codificant que el forma està dividida en set exons, existint una bona correlació dels exons amb els set dominis transmembrana que constitueixen la proteïna (apartat 1.5.1.3., Figura 14). El primer exó codifica per l'extrem N-terminal i part del primer segment hidrofòbic de la proteïna; el segon exó codifica la resta del primer i tot el segon domini transmembrana del receptor RGR, els exons 3, 4, 5 i 6 codifiquen pels segments transmembrana III, IV, V i VI respectivament i finalment el setè exó codifica pel VIIè segment hidrofòbic i la part C-terminal de la proteïna (Shen i col., 1994). El gen RGR codifica per l'opsina RGR expressada en l'EPR i en les cèl·lules de Müller.

Morimura i col. (1999b) van efectuar l'anàlisi mutacional del gen RGR en un número elevat de pacients amb diferents distròfies de la retina, distribuïts en: 182 casos no relacionats de RP amb herència autosòmica dominant, 182 amb RP autosòmica recessiva, 383 casos esporàdics, 45 pacients amb amaurosi congènita de Leber, 28 pacients amb retinosi punctata albescens, 22 casos amb un diagnòstic d'esclerosi coroïdal i 95 controls. En aquest estudi, els quatre germans afectats d'una família no consanguínia amb RP autosòmica recessiva, eren homozigots per la mutació de canvi de sentit S66R. Tot i que la família no coneixia lligams de consanguinitat, els estudis amb diferents marcadors de la regió del gen RGR indicaven que els al·lells mutats dels progenitors tenien un origen comú. En un segon pacient que tenia un diagnòstic inicial d'esclerosi coroïdal, es va identificar la inserció d'una guanina (G275insG) molt a prop del extrem 3' de la regió codificant. No es va detectar el segon al·lel mutat i l'estudi clínic posterior va permetre rectificar el diagnòstic inicial, determinant que es tractava d'una família no consanguínia afectada de RP amb un patró d'herència autosòmic dominant.

En aquest treball es van descriure també, altres alteracions en la seqüència del gen RGR que comporten substitucions d'aminoàcids o canvis localitzats en les regions implicades en el mecanisme de l'*splicing* (Taula 11). Els autors les van considerar com canvis poc probable de tenir caràcter patològic. La resta de canvis identificats es consideren polimorfismes per la seva elevada freqüència (Taula 12).

Taula 11. Canvis en el gen RGR descrits per Morimura i col. (1999b) considerats poc probables de ser patològics en la RP. Aquests canvis van ser detectats en una mostra de pacients formada a partir de 182 afectats amb RPAR (364 al·lels) i 383 amb RPS (RP simplex) (766 al·lels), i també van ser avaluats en 95 controls. No es van fer estudis de cosegregació familiar amb tots aquests canvis detectats.

Canvis considerats no patològics		RPAR+RPS (n=565) (nº al·lels=1130)		Control (n=95) (nº al·lels=190)	
nucleòtid afectat	aminoàcid alterat	nº heterozigots	nº homozigots	nº heterozigots	nº homozigots
394 G>T	Val132Leu	1	0	0	0
454 C>A	His152Asn	1	0	0	0
IVS5-12 A>G	-	1	0	0	0
700 G>A	Ala234Thr	1	0	0	0
IVS6+3 A>G	-	1	0	0	0
722 C>T	Ser241Phe	4	1	1	0
IVS6+5 A>G	-	4	0	1	0

Taula 12. Polimorfismes identificats en el gen RGR i les freqüències al·lèliques corresponents detectades en diferents poblacions estudiades.

Polimorfismes del gen RGR			
nucleòtid alterat	aminoàcid	freqüència al·lèlica (%) <sup>1</sup>	freqüència al·lèlica (%) <sup>2</sup>
19 C>T	Leu 7 Leu	7	8
27 C>T	Thr 9 Thr	47	49
459 C>T	Tyr 153 Tyr	37	38
IVS5+16 C>T	-	7	0

<sup>1</sup> en població americana segons Morimura i col. (1999b)

<sup>2</sup> detectades en aquest treball a partir de població espanyola

En el present treball s'han estudiat un total de 92 famílies, de les quals 88 famílies presentaven RPAR i les 4 famílies restants un diagnòstic de retinosi punctata albescens (apartat 4.2.1). L'estudi mutacional del gen RGR s'ha realitzat seguint una estratègia d'anàlisi directe mitjançant les tècniques moleculars de PCR-SSCP dels set exons del gen amb la posterior seqüenciació dels fragments que presentaven un patró de mobilitat anormal.



En aquest grup de famílies s'han identificat 6 substitucions. Dos d'aquests canvis eren transicions G>A constituent, una nova variant silenciosa (Lys205Lys) detectada en estat heterozigot en els membres afectats d'una única família, i un canvi en l'intró 6 (IVS6+5 A>G) detectat en un pacient amb retinosi punctata albescens, ja descrit prèviament per Morimura i col. (1999b) en 4 casos amb RP simplex i un control, sempre en estat heterozigot. L'estudi familiar d'aquest darrer canvi no mostrava cosegregació amb la malaltia. Aquestes substitucions no van ser detectades en 190 cromosomes controls.

Els quatre canvis restants eren transicions C>T, dels quals tres corresponien a polimorfismes descrits i el darrer comportava la substitució Ser241Phe. Aquest darrer canvi s'ha identificat en 9 pacients amb RPAR de diferents famílies (8 heterozigots i un homozigot). Els subsegüents estudis familiars indicaren que, en les quatre famílies no consanguínies, tots els membres afectats eren portadors del canvi Ser241Phe, mentre que en les cinc famílies consanguínies no existia cosegregació d'aquest canvi amb la malaltia. En el grup control, es van identificar 5 al·lells amb la substitució Ser241Phe. Morimura i col. (1999b) van identificar aquest canvi en dos casos de RPAR (2/364 al·lells), tres casos de RPS sense antecedents familiars dels quals només un presentava el canvi en homozigosi (4/766 al·lells) i en un dels 95 controls (1/190 al·lells) (Taula 11). D'aquest estudi es dedueix que la freqüència al·lèlica del canvi Ser241Phe és similar entre els pacients i la població control analitzada. Amb les dades obtingudes en el present treball realitzat a partir de població espanyola, constatem que la freqüència d'aquesta variant en pacients amb RPAR (10/184 al·lells) és significativament més alta que la trobada en població control (5/190) ( $p=0.0005$ ). També podem concloure que la substitució Ser241Phe es presenta en població espanyola amb una freqüència superior a la detectada en la població analitzada per Morimura i col. (1999b). Considerant les dades disponibles actualment, el significat patològic de la substitució Ser241Phe és difícil d'interpretar de forma categòrica.

Els polimorfismes detectats en aquest treball en famílies espanyoles presentaven freqüències al·lèliques similars a les descrites en l'estudi realitzat per Morimura i col. (1999b), no existint diferències significatives entre poblacions d'origens diferents (Taula 12). Els resultats obtinguts permeten concloure que el gen RGR no és la causa de la patologia en el grup de famílies espanyoles estudiades en aquest treball.

#### 5.4. ESTUDI DEL GEN CRB1 (*crumbs homologue 1*)

El gen CRB1, localitzat en la regió cromosòmica 1q31-q32.1, correspon al locus associat al fenotip RP12. Aquest gen codifica per una proteïna designada *Crumbs homologue 1* (CRB1) per la seva homologia amb la proteïna *crumbs* de *Drosophila melanogaster* (gen *crb*). La regió codificant del gen CRB1 humà està dividida en 12 exons i ocupa una extensió genòmica de 40Kb.

Es coneixen 50 mutacions diferents identificades en diferents distròfies retinals severes i d'aparició precoç, quedant incloses la RPAR, la RP amb PPRPE (o RP12), el LCA, i la RP amb presència d'una complicació associada caracteritzada per anormalitats vasculares, dipòsits de lipids extravasculars i desprendiment de retina (*coats-like exudative vasculopathy*) (Taula 13). Aquestes mutacions expliquen aproximadament el 59% de la RP amb PPRPE, entre el 10-13% dels casos amb LCA i el 56% de la RP amb la complicació vascular associada (den Hollander i col., 1999; den Hollander i col., 2001a; Lotery i col., 2001a; Lotery i col., 2001b; Gerber i col. 2002; Khaliq i col., 2003; Hanein i col., 2004).

De l'estudi realitzat en un total de 92 famílies espanyoles, 88 caracteritzades per presentar RPAR i 4 famílies diagnosticades de retinosi punctata albescens, s'ha identificat (apartat 4.2.1) un total de 19 variants en la seqüència del gen CRB1 que es classifiquen en:

- 7 mutacions que compleixen els criteris de cosegregació amb la malaltia i de no existir en població control. Sis d'aquestes mutacions no havien estat prèviament descrites. En la figura 25 es mostra la localització d'aquestes mutacions en la proteïna codificada pel gen CRB1.
- 8 variants poc freqüents que tot i que no s'han detectat en població control, no cosegreguen amb la patologia. Una d'aquestes variants no havia estat descrita en la literatura.
- 4 polimorfismes intrònics, dels quals tres no havien estat prèviament descrits (IVS2+42 T/A, IVS4-53 T/G, IVS4-64 T/G).

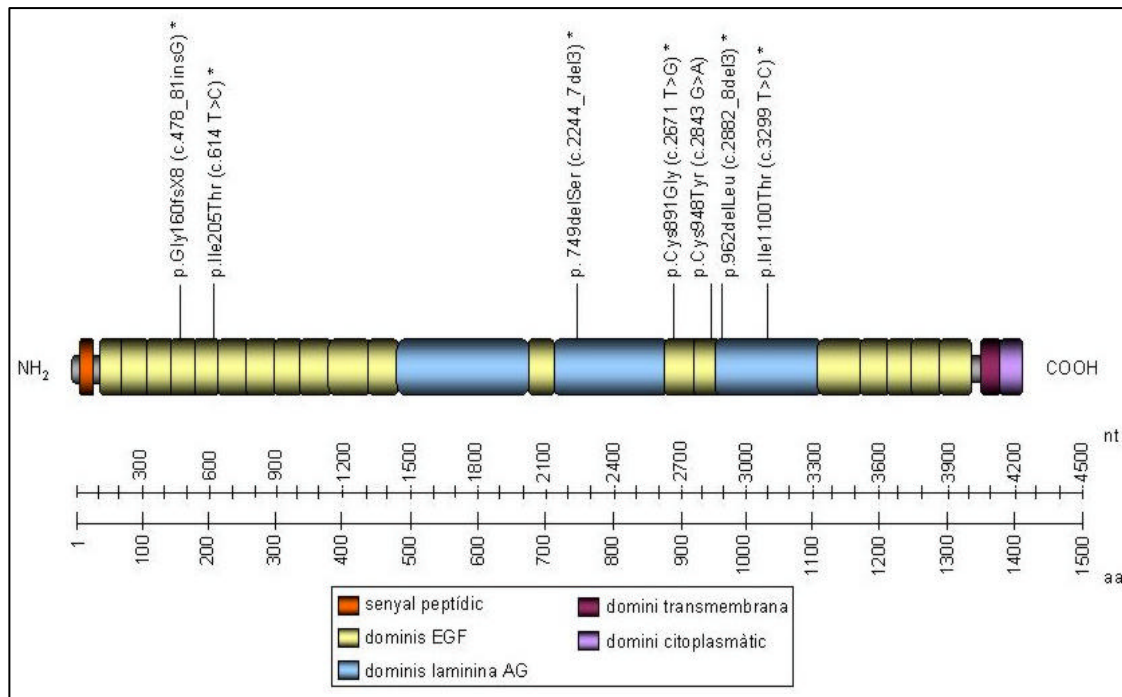


Figura 25. Localització de les mutacions identificades en les famílies estudiades en aquest treball a nivell dels diferents dominis de la proteïna CRB1. (\*) Mutacions descrites per primera vegada.

En el gen CRB1, la mutació p.Cys948Tyr és la més freqüent i s'ha descrit en malalts que presentaven diferents fenotips: LCA, RP amb preservació para-arteriolar de l'EPR (PPRPE) i RP amb presència d'una vasculopatia exudativa tipus coats (*coats-like exudative vasculopathy*). Els quatre pacients homozigots descrits en la literatura tenen un diagnòstic d'amaurosi congènita de Leber (LCA) (Lotery i col., 2001a; den Hollander i col., 2001a, Hanein i col., 2004). Aquest fenotip s'ha descrit també associat a la presència de p.Cys948Tyr en combinació amb altres mutacions de canvi de sentit, mutacions que alteren la pauta de lectura i en casos en que no s'ha pogut identificar l'altre al·lel mutat. El fet que en el present treball s'ha identificat aquesta mutació en estat homozigot en dos germanes amb un fenotip sever de LCA (M-69) avala el fet que la mutació p.Cys948Tyr comporta una expressió fenotípica greu de la malaltia com a resultat d'una pèrdua de funció de la proteïna CRB1.

En una branca diferent d'aquesta mateixa família, un afectat amb una RP d'inici precoç sense signes de PPRPE, presentava el canvi p.Cys948Tyr en forma de doble heterozigot amb una altra mutació de canvi de sentit (p.Ile1100Thr). En una altre família (M-641) la mutació p.Cys948Tyr va ser identificada en forma de doble heterozigot amb una nova mutació, caracteritzada per la pèrdua de tres nucleòtids en

Taula 13. Mutacions identificades en el gen CRB1.

Tipus Mutació	Localització	Canvi de nucleòtid	Efecte en proteïna	Fenotip associat
<b>Canvi de sentit</b>				
1	cd. 144	TTC > GTC	Phe144Val	a
2	cd. 161	GCC > GTC	Ala161Val	b
3	cd. 250	TGT > TGG	Cys250Trp	b
4	cd. 383	TGT > TAT	Cys383Tyr	a
5	cd. 433	TAT >TGT	Tyr433Cys	d
6	cd. 480	TGT > CGT	Cys480Arg	a
7	cd. 480	TGT > GGT	Cys480Gly	a
8	cd. 584	GAC > TAC	Asp584Tyr	a
9	cd. 681	TGT > TAT	Cys681Tyr	a
10	cd. 745	ACG >ATG	Thr745Met	b
11	cd. 764	CGT > TGT	Arg764Cys	a, b, d
12	cd. 837	GAC > CAC	Asn837His	d
13	cd. 846	GGA > AGA	Gly846Arg	b
14	cd. 894	AAC > AGC	Asn894Ser	d
15	cd. 948	TGT > TAT	Cys948Tyr	a, b, d
16	cd. 989	ATA > ACA	Ile989Thr	a
17	cd. 1041	ATG > ACG	Met1041Thr	b
18	cd. 1071	CTC > CCC	Leu1071Pro	b
19	cd. 1100	ATA > AGA	Ile1100Arg	a
20	cd. 1103	-	Gly1103Arg	a
21	cd. 1181	TGC > CGC	Cys1181Arg	d
22	cd. 1205	GGA > AGA	Gly1205Arg	a
23	cd. 1317	AAC > CAC	Asn1317His	a
24	cd. 1321	TGC > TCC	Cys1321Ser	c
25	cd. 1321	TGC > GGC	Cys1321Gly	a
26	cd. 1354	GCC > ACC	Ala1354Thr	d
<b>Sense sentit</b>				
1	cd. 403	TCA > TGA	Ser403Stop	b, d
2	cd. 801	AAG > TAG	Lys801Stop	a
3	cd. 827	GGA > TGA	Gly827Stop	a
4	cd. 995	GAG > TAG	Glu995Stop	a
5	cd. 1111	GAA > TAA	Glu1111Stop	a
6	cd. 1293	-	Trp1293Stop	a
7	cd. 1332	TGC > TGA	Cys1332Stop	a
8	cd. 1333	GAG > TAG	Glu1333Stop	a
<b>Canvi de pauta de lectura</b>				
1	cd. 37	del T	-	a
2	cd. 86-87	ins GT	-	a
3	cd. 143-144	del GATTC	-	a
4	cd. 204-206	del AAATAGG	-	a
5	cd. 205-207	del TAGGAAG	-	a
6	cd. 774	ins Alu	-	b
7	cd. 812-813	ins polyA	-	a
8	cd. 850-851	del GGCT	-	a
9	cd. 871	ins T	-	a
10	cd. 952	ins T	-	a
11	cd. 1115	del GGTTTCATTA	-	a
12	cd. 1115	del T	-	a
13	cd. 1330	del G	-	a
<b>splicing</b>				
1	nt. 2978+5	G > A	-	b, d
2	nt. 4005+1	G > A	-	a
3	nt. 4013+1	G > T	-	a

**a** (amaurosi congènita de Leber), **b** (RP amb PPEPR), **c** (RP), i **d** (RP associada a una complicació coneguda com *coats-like exudative vasculopathy*).

la seqüència del gen que implica una deleció d'una serina en el 2<sup>on</sup> domini laminina AG de la proteïna CRB1 (p.749delSer). La cosegregació d'aquestes mutacions amb la patologia retinal va permetre rectificar el diagnòstic clínic inicial, determinant que es tractava d'un fenotip RP12 amb la típica PPRPE associada. Les dades obtingudes en aquest treball confirmen que la mutació p.Cys948Tyr en combinació amb diferents mutacions de canvi de sentit presenta una expressió fenotípica variable associada que podria estar relacionada amb el nivell de proteïna funcional residual existent en cada cas. Les dues mutacions de canvi de sentit identificades en aquest treball en forma de doble heterozigot amb la mutació p.Cys948Tyr coincideixen en alterar el mateix tipus de domini laminina AG a nivell de la proteïna CRB1, malgrat els fenotips presentats pels pacients i els dominis laminina AG afectats són diferents.

La proteïna CRB1 està formada per dominis EGF, caracteritzats per la presència de residus conservats de cisteïna que, al participar en la formació dels ponts disulfur, són decisius en l'estructura secundària i en la conformació que adopta la proteïna. La mutació p.Cys948Tyr determina l'alteració d'un dels vuit residus conservats de cisteïna localitzat en el 14<sup>è</sup> domini EGF de la proteïna CRB1 i podria, per tant, interferir en la conformació correcta de la proteïna.

La mutació p.Ile1100Thr, va ser identificada en dues famílies diferents (M-69 i B-102), en forma de doble heterozigot amb un segon al·lel mutat que en els dos casos implicava el canvi d'un residu de cisteïna (p.Cys948Tyr i p.Cys891Gly respectivament). Ambdues famílies presentaven una RP d'aparició precoç i de progressió severa. En el codó 1100 també s'ha descrit un canvi del residu d'isoleucina per un aminoàcid d'arginina en un únic cas de LCA detectat en forma de doble heterozigot amb una mutació sense sentit que introdueix un codó de parada prematur, aquesta combinació s'associava a un fenotip sever de la patologia retinal (den Hollander i col., 2001a). La mutació p.Cys891Gly altera un dels residus conservats de cisteïna del 13<sup>è</sup> domini EGF de la proteïna CRB1 i, per tant, afectaria a la formació dels ponts disulfur generant una proteïna estructuralment anòmala.

La inserció d'una guanina entre els nucleòtids 478-481, identificada en estat homozigot en l'afectat d'una família consanguínia (M-717), comporta l'aparició d'un codó de parada prematur en la posició 168, generant la síntesi alterada d'una proteïna CRB1. Els estudis oftalmològics d'aquest cas evidencien una RP d'inici precoç amb una pèrdua de visió molt severa en la segona dècada de vida. L'estudi

del fons d'ull en aquest cas amb la malaltia avançada, no permet excloure l'existència prèvia d'un patró de RP amb PPRPE.

El pacient afectat de la família B-15 complia tots els criteris diagnòstics de RP (ceguesa nocturna, disminució progressiva del camp visual, ...) excepte el fons d'ull. Els dipòsits de pigment no tenien la configuració espicular característica ni la distribució per tot el fons d'ull típica de la RP. La imatge era compatible amb la que caracteritza la coroïderèmia (CHM). En l'anàlisi del gen CRB1, es va detectar, en estat heterozigot, una deleció de tres nucleòtids que comporta la pèrdua d'un residu de leucina en la posició 962 (p.962del Leu), en el 3<sup>er</sup> domini laminina AG de la proteïna. La seqüenciació de tots els exons del gen CRB1 no va evidenciar la presència de cap altra mutació, però no es pot descartar l'existència de mutacions en regions intròniques. L'estudi de marcadors intragènics tipus SNP's determina l'absència de grans reordenaments genòmics. Considerant el patró "CHM-like" observat en el fons d'ull, es va estudiar la segregació de tres marcadors intragènics del gen REP-1 en els membres de la família. Al no existir cosegregació entre els marcadors analitzats i la malaltia es va descartar el diagnòstic de coroïderèmia i la possibilitat d'una herència digènica CRB1/REP-1.

Un canvi d'aminoàcid en el codó 205 en estat heterozigot va ser identificat en els dos germans afectats de la família M-489, aquest canvi implicava el reemplaçament d'un residu apolar d'isoleucina per un aminoàcid polar de treonina (p.Ile205Thr), localitzat a nivell del 5<sup>è</sup> domini EGF de la proteïna CRB1. L'estudi familiar demostra que existeix cosegregació de la mutació amb la malaltia i l'estudi oftalmològic exhaustiu va confirmar el diagnòstic clínic de LCA. Mitjançant l'anàlisi mutacional de les regions codificants i de les seqüències corresponents al promotor del gen CRB1 no es va detectar el segon al·lel mutat. En aquesta mateixa posició, s'han identificat dues mutacions diferents, originades cadascuna per la deleció de 7 nucleòtids (den Hollander i col., 2001a; Lotery i col., 2001a; Hanein i col., 2004), aquesta situació reflecteix un augment de mutacions detectades afectant aquesta posició del gen CRB1.

Tenint en compte que en l'amaurosi congènita de Leber s'ha identificat, a part del gen CRB1, 6 gens diferents (GUCY2D; RPE65, CRX, TULP1, AIPL1 i RPGRIP1) (Perrault i col., 1996; Marlhens i col., 1997; Freund i col., 1998; Lewis i col., 1999; Sohocki i col., 2000; Dryja i col., 2001), i considerant, per altra banda, l'existència d'herència digènica en la patologia de la RP (Kajiwara i col., 1994), es va incloure

aquesta família en un posterior estudi molecular centrat en el gen GUCY2D. Aquest gen es caracteritza per codificar la proteïna guanilat ciclasa expressada en fotoreceptors i que participa en els mecanismes d'adaptació a la foscor després d'una prèvia fotoexcitació. En els afectats de la família M-489 s'ha detectat en el gen GUCY2D un canvi d'aminoàcid en el codó 701 (p.Pro701Ser) en heterozigosi. L'estudi familiar indica que els dos germans afectats hereten l'al·lel patern amb aquest canvi d'aminoàcid en el gen GUCY2D i la substitució d'aminoàcid p.Ile205Thr en el gen CRB1. El canvi p.Pro701Ser en el gen GUCY2D va ser descrit per primera en una única família, i només un dels membres afectats amb LCA presentava aquest canvi d'aminoàcid en el gen GUCY2D, coincidint amb la presència d'una forma més severa de la patologia. Aquest canvi no va ser detectat en els 100 controls analitzats. Tot i no existir cosegregació de p.Pro701Ser amb la malaltia van definir aquesta alteració com una rara variant, sense ser la causa determinant de la malaltia però suggerint que podria estar associada a un fenotip més sever, i especulant una possible explicació a la heterogeneïtat clínica observada dins la mateixa família (Dharmaraj i col., 2000). La similar clínica presentada pels dos germans afectats de la família (M-489) analitzada en aquest treball permet confirmar l'absència de significat patològic del canvi p.Pro701Ser amb la malaltia de LCA.

Una de les variants poc freqüents identificades en aquest estudi (p.Thr289Met) va ser inicialment considerada com una mutació causant de LCA (Lotery i col., 2001a). L'ampliació de l'estudi a nivell familiar va permetre descartar la cosegregació d'aquest canvi amb la RP i, per tant, aquest canvi d'aminoàcid s'ha de classificar com una variant no patològica (p.Thr289Met). Una situació similar és la que correspon a la substitució p.Gln679Glu, descrita per primera vegada en aquest treball.

Les dades obtingudes en l'estudi mutacional del gen CRB1 en les famílies espanyoles incloses en aquest treball permeten associar les diferents alteracions de CRB1 amb un ampli ventall de fenotips de degeneració de la retina, tots ells caracteritzats per una aparició precoç i una progressió severa de la patologia. L'heterogeneïtat fenotípica associada al gen CRB1 suggereix que l'existència d'altres factors genètics o ambientals podrien ser importants per determinar la patologia desenvolupada. Aquesta situació reflexa com la interpretació de les relacions genotip/fenotip esdevé extraordinàriament complexa en aquesta patologia.

## 5.5. ESTUDI DEL GEN USH2A

### 5.5.1. En famílies amb RP no sindròmica seguint un patró d'herència autosòmic recessiu.

Els resultats obtinguts per Rivolta i col (2000) evidenciaven que un 4,5% dels pacients amb RPAR sense pèrdua d'audició, presentaven la mutació p.C759F en el gen USH2A. Aquesta informació va promoure l'estudi de 196 pacients espanyols amb aquestes mateixes característiques clíniques (apartat 4.3.2), per tal de confirmar el compromís del gen USH2A en la Retinosi Pigmentària autosòmica recessiva no sindròmica en una població de procedència diferent. La freqüència de la mutació de canvi de sentit p.C759F en aquest grup de malalts va ser de 4,6%, mostrant una situació molt similar a la descrita en població nord-americana. En tots els 9 casos que presentaven aquesta mutació es va efectuar l'estudi mutacional complet de la restant regió codificant del gen USH2A, el què va permetre identificar : i) la presència de p.C759F en forma de doble heterozigot amb un segon al·lel mutat constituït per diferents tipus de mutacions (canvis sense sentit, de canvi en la pauta de lectura, de llocs conservats implicats en el mecanisme d'*splicing* i altres mutacions de canvi de sentit) en pacients amb RPAR no sindròmica i ii) quatre homozigots amb la mutació p.C759F que pertanyien a dues famílies consanguínies no relacionades. Dos d'aquests casos eren malalts afectats de RPAR sense afectació auditiva (família M-286) mentre que els altres dos casos homozigots p.C759F (família S-23) no presentaven cap símptoma de RP no sindròmica ni de pèrdua d'audició. L'estudi familiar dels individus portadors de la mutació p.C759F comparteixen un haplotip amb un al·lel comú associat al canvi p.C759F, aquest haplotip s'ha obtingut de l'estudi realitzat a partir de 6 marcadors intragènics tipus SNP's (Single-Nucleotide Polymorphisms) prèviament descrits per Dreyer i col. (2000).

La presència de la mutació p.C759F també s'ha descrit en la literatura en malalts amb la síndrome d'Usher tipus II i, per tant, es fa evident una heterogeneïtat fenotípica remarcable associada a mutacions en el gen USH2A (Dreyer i col.,2000; Nájera i col., 2002).

Les anomalies en el gen USH2A descrites en aquest treball (apartat 4.3.2.) s'han evidenciat tant en afectats amb RPAR sense problemes de pèrdua d'audició com en casos d'individus sense cap manifestació clínica de RP ni de sordesa. La



hipòtesi d'una herència tri-al·lèlica, ja descrita en la síndrome de Bardet-Biedl (Katsanis i col., 2001a), permet plantejar que els homozigots p.C759F simptomàtics serien portadors d'una mutació addicional no identificada en un altre gen, mentre que els casos d'homozigots assintomàtics no haurien heretat aquest tercer al·lel mutat necessari per manifestar la malaltia. Seguint aquesta hipòtesi, els portadors simptomàtics de p.C759F haurien heretat també dos al·lells mutats del gen no identificat, mentre que en els casos de portadors simptomàtics amb dos mutacions en forma de doble heterozigot presentarien un tercer al·lel mutat en el gen sense identificar.

En la Figura 26 s'observa la localització de les mutacions identificades en el gen USH2A associades a RP no sindròmica amb un patró d'herència autosòmic recessiu. L'anàlisi mutacional de la restant regió codificant del gen USH2A en els pacients portadors de la mutació p.C759F ha detectat diferents canvis addicionals:

- Mutacions que condueixen directament o indirectament a una terminació prematura de la traducció: 1) Una mutació sense sentit, p.R63X, ja descrita en la síndrome d'Usher II, que té lloc en una regió rica en dinucleòtids CpG, caracteritzada per ser un lloc calent (*hot spots*) amb una elevada susceptibilitat a produir-se transicions, 2) la deleció c.2299delG més freqüent detectada en la síndrome d'Usher II, i 3) una mutació no descrita que altera el lloc acceptor del mecanisme de l'*splicing* en l'intró 10 (IVS10-2 A>G).
- Canvis d'aminoàcids que es caracteritzen per afectar els dominis LE (*laminin epidermal growth factor-like*) presents en la proteïna usherina. El canvi d'una leucina per una valina en el codó 555 (p.L555V) ja descrit en la síndrome d'Usher tipus II, i la substitució d'un aminoàcid d'histidina per un residu de prolina en el codó 610 (p.H610P) descrita per primera vegada en un pacient amb RPAR, sense familiars disponibles per estudiar la cosegregació dels dos al·lells portadors de les mutacions de canvi de sentit (p.C759F i p.H610P) amb la malaltia.

Finalment, hem identificat un canvi d'aminoàcid (p.P761R) localitzat tres codons després de la p.C759F en un pacient amb RP no sindròmica, sense detectar l'altre al·lel mutat en la restant regió codificant del gen USH2A.

Fins al moment, la implicació del gen USH2A en la RPAR no sindròmica s'ha associat a l'existència de diferents mutacions però bàsicament heretades en combinació amb la mutació de canvi de sentit p.C759F. Per aquest motiu ens hem proposat avaluar el compromís del gen USH2A en un grup de 85 famílies afectades de RPAR i 4 casos amb retinosi punctata albescens (apartat 4.4.) caracteritzades per no presentar la mutació p.C759F, segons l'estudi anterior (apartat 4.3.2). L'anàlisi molecular del gen USH2A en aquest grup de famílies amb RPAR no sindròmica i caracteritzades per no presentar el canvi d'aminoàcid p.C759F ha permès identificar 3 mutacions en 4 de les 85 famílies (apartat 4.4., Figura 22), només una d'aquestes és descrita per primera vegada (apartat 4.4., Taula 8). D'aquests canvis detectats, dos causen alteració en la pauta de lectura amb aparició d'un codó de parada prematur i el tercer produeix una substitució d'aminoàcid.

Tot i que tres de les quatre famílies amb RPAR sense problemes d'audició són consanguínies només s'ha detectat un dels al·lells causants de la malaltia en estat heterozigot (apartat 4.4., Figura 22). En una d'aquestes famílies (M-140), els dos germans afectats són portadors del canvi patològic més freqüentment detectat en la síndrome d'Usher tipus II, la mutació c.2299delG. En els pacients afectats de RPAR sense afectació auditiva corresponents a les altres dues famílies consanguínies (M-320 i M-509) presenten el canvi d'aminoàcid d'una glicina per una arginina en el codó 713 (p.G713R) en estat heterozigot. Aquest canvi s'ha descrit en la síndrome d'Usher II, en un pacient d'origen danès en forma de doble heterozigot amb la mutació c.2299delG (Dreyer i col., 2000), i en un pacient d'origen espanyol sense detectar el segon al·lel mutat (Nájera i col., 2002).

Finalment, en la família no consanguínia restant (M-11), els dos germans afectats de RPAR són portadors d'una mutació de canvi en la pauta de lectura (c.544\_6delAA) no descrita abans, que consisteix en una deleció de dos nucleòtids d'adenina en el codó 182 que codifica per una lisina, aquesta alteració incorpora una seqüència anòmla que finalment condueix a l'aparició d'un codó de parada 44 aminoàcids després (p.K182fsX44).

L'anàlisi complet de la restant regió codificant del gen USH2A realitzat en els pacients amb RPAR portadors d'un únic al·lel mutat no ha revelat cap altre canvi associat a la malaltia. L'estudi de diferents polimorfismes intragènics (SNP's) ha permès excloure una gran deleció del gen USH2A en tots aquests pacients amb una única mutació detectada.

Per determinar si els canvis d'aminoàcids (p.L555V, p.H610P, p.G713R, p.C759F i p.P761R) identificats en la RP no sindròmica autosòmica recessiva estan implicats en la patologia es van analitzar 190 cromosomes controls. S'ha detectat únicament dos al·lels portadors de la mutació p.C759F i dos al·lels portadors de p.G713R, tots ells en estat heterozigot, i mostrant una freqüència al·lèlica de l'1%.

Tots aquests canvis d'aminoàcids identificats en el gen USH2A estan situats en dominis LE de la usherina. Dreyer i col. (2000) van determinar a través de l'estudi comparatiu de múltiples alineaments amb dominis proteics que les mutacions p.G713R i p.C759F ocupen llocs conservats en els dominis LE. Aquests dominis es caracteritzen per presentar una seqüència d'aminoàcids conservada formada per 8 residus de cisteïnes, que són importants per participar en els ponts disulfurs que mantenen l'estructura de la proteïna. Per aquest motiu, per la mutació p.C759F es va postular que el fet d'implicar un canvi del tercer residu de cisteïna situat en el 5<sup>è</sup> domini LE de la proteïna, podria conduir a l'alteració de les propietats estructurals de l'usherina. Considerant que la mutació p.G713R determina un reemplaçament d'un residu hidrofòbic per un aminoàcid amb càrrega positiva, van proposar que aquesta alteració en la càrrega de la proteïna podria causar una possible desestabilització de les propietats estructurals de l'usherina (Dreyer i col., 2000). La mutació p.G713R descrita per Dreyer i col. (2000) no va ser detectada en població control d'origen danès i noruec, mentre que en població espanyola va ser identificada en 2 dels 200 cromosomes controls analitzats (Nájera i col., 2002) coincidint amb la freqüència detectada en el present treball. Els estudis familiars per la mutació p.G713R indiquen cosegregació d'aquest canvi amb la patologia de la RP no sindròmica (apartat 4.4., Figura 22). Malgrat tot, caldrien estudis addicionals per determinar el significat patològic d'aquests canvis que impliquen la substitució d'un aminoàcid.

L'ample ventall de fenotips associats amb les mutacions descrites en el gen USH2A evidencia, una vegada més, la complexitat de les relacions genotip/fenotip. Aquests resultats confirmen el compromís del gen USH2A en la patologia de la RP no sindròmica amb un patró d'herència autosòmic recessiu, i posa de manifest la gran heterogeneïtat genètica presentada per aquesta malaltia.

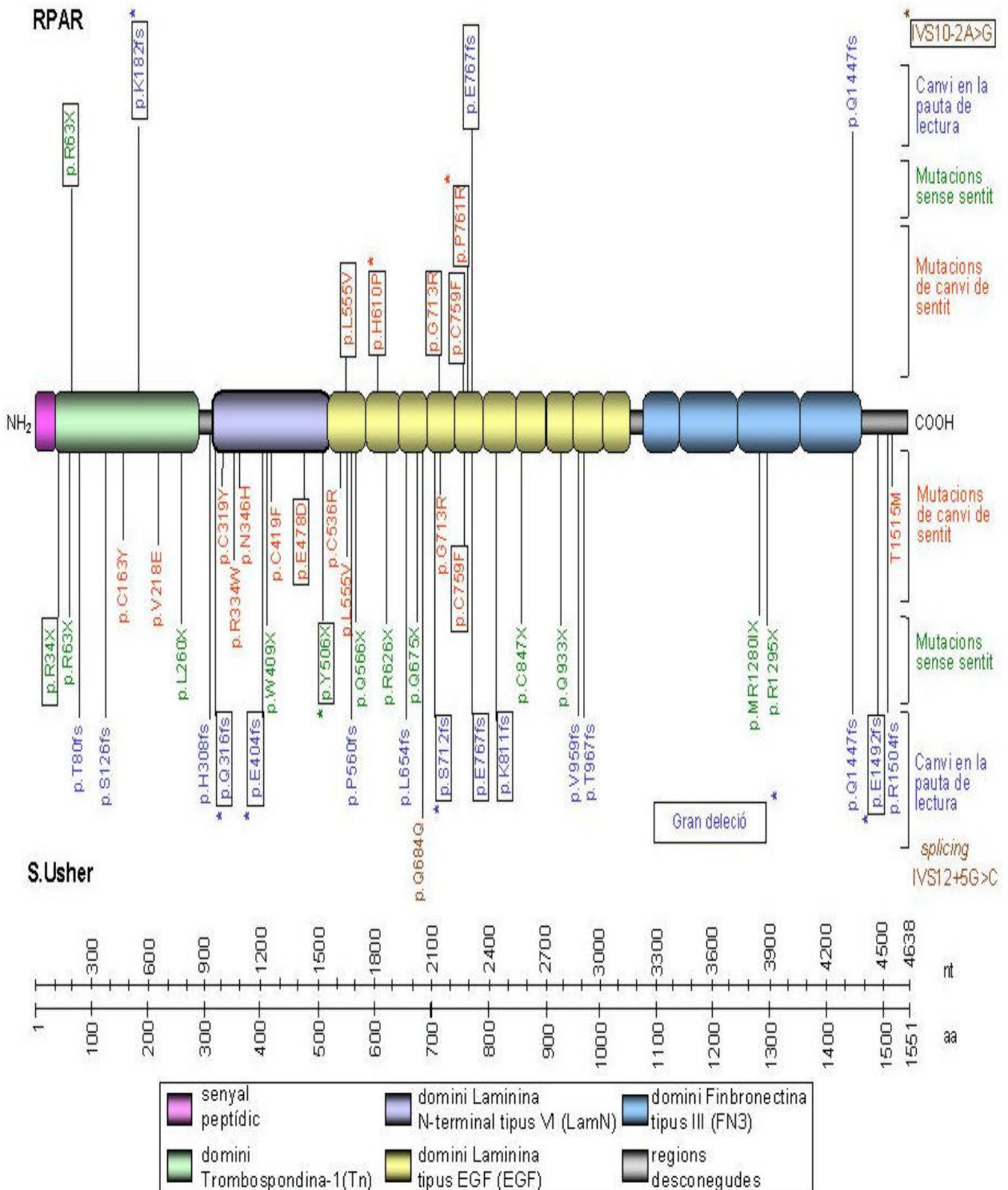


Figura 26. Distribució de les diferents mutacions a nivell de la proteïna usherina, i en funció de les diferents patologies associades (incloses la síndrome d'Usher tipus II i la RPAR no sindròmica). El requadre indica les mutacions que s'han identificat en els pacients procedents de població espanyola estudiats en aquesta tesi, i l'asterisc mostra les mutacions descrites per primera vegada.

### 5.5.2. En famílies amb la síndrome d'Usher tipus II

Més de la meitat de tots els casos amb la síndrome d'Usher corresponen al tipus II, i dins d'aquesta categoria clínica la majoria dels casos presenten lligament amb el gen USH2A, tot i que existeixen variacions en funció de la població estudiada (Kimberling i col., 1995; Hope i col., 1997; Rosenberg i col., 1997; Weston i col., 2000). Tres deleccions eren identificades en el gen USH2A associades amb la síndrome d'Usher tipus II, de les quals la mutació c.2299delG era la més freqüent (Eudy i col., 1998).

En l'estudi dissenyat per conèixer la prevalença d'aquestes mutacions (c.2299delG, c.2898delG i c.4338-9delCT) en pacients de població amb origen espanyol diagnosticats amb la síndrome d'Usher tipus II (apartat 4.3.1.), es va identificar únicament la presència de la mutació c.2299delG. En 15 de les 59 famílies analitzades (25%) es va identificar aquesta mutació. Quatre pacients de famílies no relacionades (tres d'elles amb consanguinitat) eren homozigots mentre que els altres 11 casos estudiats eren portadors en estat heterozigot de la mutació c.2299delG. Dels 118 cromosomes analitzats en aquest treball, 19 (16%) eren portadors de la mutació c.2299delG. Tant si considerem el percentatge de la mutació c.2299delG trobat en pacients de població espanyola com la freqüència al·lèlica associada a la mutació c.2299delG es dona la mateixa situació ja que els dos valors estan inclosos dins els rangs descrits en pacients afectats amb la síndrome d'Usher tipus II procedents de poblacions amb diferents orígens (22-52% i 15-40% respectivament) (Eudy i col., 1998; Liu i col., 1999; Dreyer i col. 2000). Recentment s'ha determinat l'existència d'un origen comú i ancestral per la mutació c.2299delG, i que l'efecte fundador originat a Europa junt amb els posteriors moviments migratoris explicaria l'amplia distribució geogràfica de la mutació c.2299delG (Dreyer i col., 2001).

En un treball posterior (apartat 4.4) s'ha realitzat l'estudi del gen USH2A en un grup de 27 famílies no relacionades i caracteritzades per presentar la síndrome d'Usher tipus II. L'anàlisi mutacional del gen USH2A ha revelat la presència d'11 mutacions diferents en 12 de les 27 famílies amb síndrome d'Usher II (44%). Sis d'aquestes mutacions són descrites per primera vegada (apartat 4.4. , Taula 8).

Cinc de les 27 famílies estudiades presenten la mutació més freqüent descrita en la síndrome d'Usher tipus II originada per la delecció d'un residu de guanina en la posició 2299 (Eudy i col., 1998). En dues d'aquestes cinc famílies, la mutació

c.2299delG es troba en estat homozigot (B-90 i B-132) mentre que en les altres 3 famílies restants es presenta en estat heterozigot (apartat 4.4., Figura 23). Dues d'aquestes darreres famílies no s'ha identificat el segon al·lel mutat (B-1 i M-184b). En aquests casos no es pot descartar la possibilitat que l'al·lel mutat no identificat pugui estar localitzat en les regions intròniques no analitzades o en les regions del promotor del gen encara no caracteritzades. L'existència d'una gran deleció del gen USH2A com a segon al·lel mutat queda exclosa pels resultats obtinguts de l'anàlisi de diferents polimorfismes intragènics tipus SNP's (apartat 4.4., Taula 9). En la restant família, caracteritzada per no presentar consanguinitat (B-33), els dos germans afectes presenten la mutació c.2299delG en forma de doble heterozigot amb combinació amb dos mutacions més, el canvi d'aminoàcid p.E478D i una nova mutació sense sentit p.E1492X. L'estudi a nivell familiar ha mostrat una cosegregació de les mutacions amb la malaltia, on els dos germans afectes han heretat l'al·lel matern amb la mutació c.2299delG i l'al·lel patern amb les mutacions p.E478D i p.E1492X, mentre que la germana sana és únicament portadora de la mutació c.2299delG.

La transversió d'una guanina per una citosina en la posició 1434 implica un canvi d'un àcid glutàmic per un àcid aspartic en el codó 478 (p.E478D). Aquest canvi en el gen USH2A va ser descrit per Adato i col. (2000) com una variant poc freqüent probablement no associada a la malaltia. Les alteracions que impliquen un canvi d'aminoàcid solen ser problemàtiques quan han de ser classificades en mutacions associades a la malaltia o variants no patològiques. L'anàlisi de 190 cromosomes controls no ha revelat la presència d'aquesta variant i l'estudi familiar demostra cosegregació d'aquesta variant (p.E478D) amb la malaltia, definint aquest canvi d'aminoàcid com un possible canvi associat al fenotip patològic. Adato i col. (2000) van detectar un únic al·lel portador d'aquest canvi en un sol pacient malgrat van analitzar un total de 142 cromosomes, dels quals 120 corresponien a controls i els 22 restants a pacients. Els autors van qüestionar el significat patològic d'aquest canvi al postular que tot i que aquesta variant p.E478D afecta un aminoàcid localitzat en el domini laminina N-terminal de l'usherina ocupant una posició conservada, la presència de l'altre aminoàcid implicat en el canvi també es trobava present en alguns dels dominis de les proteïnes homòlogues. L'altre mutació (p.E1492X) identificada per primera vegada en aquesta família (B-33) en estat heterozigot implica una transició d'una G>T en el nucleòtid 4474 del gen USH2A, que causa

l'aparició d'un codó de parada prematur. Aquesta mutació permet atribuir una funció important a la regió localitzada en l'extrem C-terminal de la proteïna usherina.

En aquesta família (B-33) el diagnòstic clínic inicial dels dos germans afectes (II.2 i II.3) definia la presència d'una hipoacúsia neurosensorial moderada, congènita i bilateral amb normalitat pel què fa a la funció vestibular i associada a una forma clàssica de RP, coincidint amb la simptomatologia típica de la síndrome d'Usher tipus II (apartat 4.4., Figura 23). Les exploracions audiomètriques al llarg del temps han mostrat únicament en un dels dos germans afectats (II.2) una important progressió de la hipoacúsia fins assolir un grau profund de severitat tot i mantenir la funció vestibular dins els valors normals. Per contra, la hipoacúsia presentada per la germana afectada es manté estable en les successives exploracions. Amb les dades clíniques i moleculars dels dos germans afectats podem concloure que malgrat presentar les mateixes mutacions en forma de doble heterozigot s'evidencia una important heterogeneïtat clínica a nivell intrafamiliar. En aquesta situació es podria considerar tant l'existència de possibles gens modificadors capaços de modular l'expressió de la malaltia com l'efecte produït per factors ambientals. Una situació similar d'expressió variable del gen *USH2A* va ser descrita per Liu i col. (1999) en bessons monozigòtics portadors de la mateixa mutació en homozigosi (c.2299delG), suggerint que aquesta variabilitat fenotípica en la síndrome d'Usher podria no estar determinada únicament per factors genètics. Considerant la possible implicació dels factors ambientals en el cas de la família B-33 estudiada en el present treball, és important destacar que el germa afectat (II-2) amb progressió de la hipoacúsia havia estat exposat a elevats decibels de soroll, a diferència de la germana afectada sense progressió de la malaltia. Amb totes les dades disponibles fins al moment, podem especular que l'aparició de progressió en la hipoacúsia únicament en un dels dos germans afectats podria estar accelerada per l'efecte de factors ambientals.

El segon canvi més freqüent detectat en les famílies incloses en aquest treball és la mutació de canvi de sentit p.C759F (detectada en 3 de les 12 famílies amb mutacions (apartat 4.4., Figura 23)). Les dades clíniques indiquen que únicament la família M-16 segueix els criteris de diagnòstic corresponents a una forma clàssica de la síndrome d'Usher II, mentre que en les altres dues famílies existeix progressió de la hipoacúsia (B-114 i M-4). En els dos casos portadors de la mutació p.C759F, corresponents a les famílies M-4 i M-16, s'ha detectat el segon al·lel causant de la malaltia, identificant dues noves mutacions que impliquen una alteració en la pauta de lectura (apartat 4.4., Taula 8): i) Una d'aquestes mutacions és produïda per una

deleció d'un residu de citosina en el nucleòtid 2135, reemplaçant un aminoàcid de serina per un codó de parada en la posició 712 del 4<sup>rt</sup> domini EGF de la usherina, resultant una proteïna anòmala. ii) L'altre mutació detectada en forma de doble heterozigot amb p.C759F és causada per una duplicació de 8 parell de bases situades entre els nucleòtids 947 i 954 del gen USH2A, produint una alteració en la pauta de lectura després del codó 316 que determina la introducció d'una seqüència d'aminoàcids aberrants que finalitza amb l'aparició d'un codó prematur de parada localitzat a 20 residus del lloc duplicat. Aquesta duplicació determinarà una proteïna severament truncada. L'existència de diferències pel què fa a la progressió de la patologia entre ambdues famílies (M-4 i M-16) suggereix que les proteïnes anòmales conduiran de forma diferent a una important alteració de la seva funcionalitat en els teixits afectats en la síndrome d'Usher II, sense oblidar la possible existència de gens modificadors i l'efecte de factors ambientals.

El diagnòstic clínic inicial del tercer pacient (II.2, família B-114) portador de la mutació p.C759F difereix del fenotip típic de la síndrome d'Usher tipus II pel què fa al grau de severitat ja que presenta una hipoacúsia neurosensorial congènita i bilateral de grau lleu amb una forma típica de RP associada. Successives examinacions audiològiques han mostrat l'existència d'una progressió de la sordesa confirmant una clínica atípica de la síndrome d'Usher tipus II. En aquest pacient s'ha detectat la mutació p.C759F en estat heterozigot, quedant sense identificar el segon al·lel mutat. Una situació similar és descrita per Najera i col (2002) en la que un pacient portador de la p.C759F amb el segon al·lel mutat sense identificar també presenta un fenotip definit per una progressió de la sordesa. Aquesta mutació p.C759F s'ha associat a la RP no sindròmica quan es troba en combinació amb altres mutacions de canvi en la pauta de lectura (Rivolta i col., 2000). Com s'exposa en l'apartat anterior d'aquesta tesi, s'ha mostrat una important variabilitat fenotípica associada a la mutació p.C759F del gen USH2A, en combinació amb altres tipus de mutacions de canvi de sentit, sense sentit i mutacions que alteren els llocs implicats en el mecanisme de maduració del RNAm (*splicing*). Liu i col. (1999) van determinar l'existència de variabilitat fenotípica associada a una mateixa mutació en el gen USH2A (c.2299delG) en la síndrome d'Usher, aquesta variabilitat fenotípica variava entre la forma clàssica de la síndrome d'Usher tipus II i una forma atípica de la síndrome d'Usher caracteritzada per una progressió de la hipoacúsia, definició que coincideix amb el què actualment es coneix com la tercera categoria clínic d'aquesta patologia (síndrome d'Usher tipus III). Per aquest motiu, van suggerir que aquesta variabilitat



fenotípica observada, podria venir determinada per l'efecte produït per factors genètics com són el *background* genètic, gens modificadors o bé altres mutacions diferents addicionals en el mateix gen.

En dos famílies no consanguínies diferents (B-21 i B-55) diagnosticades inicialment per presentar la síndrome d'Usher II s'han identificat dues noves mutacions en estat heterozigot (apartat 4.4., Figura 23): i) La deleció d'un residu d'adenina entre els nucleòtids 1211-1214, alterant la pauta de lectura a partir del codó 405, i aparició d'un codó de parada situat dos aminoàcids després (família B-21) i ii) una transversió d'una timina per una adenina en el nucleòtid 1518 que implica un reemplaçament d'una tirosina per un codó de parada en la posició 506 (p.Y506X). Aquesta substitució genera una proteïna aberrant, a causa de la pèrdua dels 10 dominis LE i els 3 dominis FN3 (família B-55). L'anàlisi de la restant regió codificant del gen USH2A no ha revelat cap altre mutació causant de malaltia en aquests dos casos, acceptant la possibilitat que l'al·lel no identificat es trobi en regions no codificants, o en zones encara no caracteritzades corresponents a la part promotora del gen. Es descarta una gran deleció del gen USH2A a partir de les dades obtingudes de l'estudi de polimorfismes intragènics tipus SNP's (apartat 4.4., Taula 9).

En els dos membres afectats de la família no consanguínia B-129 (membres II.1 i II.4) s'ha detectat dues mutacions ja descrites en forma de doble heterozigot, una mutació de canvi en la pauta de lectura (c.2431\_2delAA) i una mutació sense sentit (p.R34X). La mutació c.2431\_2delAA va ser identificada per primera vegada en un pacient espanyol afectat amb la síndrome d'Usher tipus II en estat heterozigot en combinació amb la mutació p.C759F (Najera i col., 2002). Fins ara, aquesta mutació només s'ha identificat en pacients procedents de població espanyola.

L'examen clínic dels pacients de la família B-55 i de la família B-129 confirmava el diagnòstic de la síndrome d'Usher tipus II, caracteritzada per una hipoacúsia de grau sever, sense poder establir l'existència o no de progressió de la sordesa degut a la manca d'exploracions audiomètriques posteriors. Per contra, en el pacient de la família B-21 portador de la mutació de canvi en la pauta de lectura, c.1211\_4delA, el diagnòstic inicial va mostrar les característiques clíniques corresponents al tipus II de la síndrome d'Usher amb una hipoacúsia de grau sever i una RP associada molt severa. En aquest cas, les successives exploracions clíniques van indicar una important progressió de la pèrdua d'audició fins assolir una hipoacúsia de grau

profund a l'edat de 28 anys amb uns valors de la funció vestibular inclosos dins el rang de normalitat. Aquest cas seria un altre exemple de variabilitat fenotípica associada al gen USH2.

Finalment, els dos membres afectats de la família consanguínia B-148 són homozigots per una gran deleció. Tot i que no es coneixen els extrems delimitants d'aquesta deleció, s'ha determinat que aquesta implica l'eliminació de la regió codificant del gen USH2A compresa entre els exons 9 i 14. Fins al moment no s'havia descrit cap deleció d'aquesta magnitud en el gen USH2A. Les exhaustives examinacions clíniques dels membres afectats d'aquesta família per avaluar la correlació genotip-fenotip, determinen progressió de la hipoacúsia amb la funció vestibular normal, definint un altre cas atípic de la síndrome d'Usher tipus II. L'existència a nivell fenotípic de casos amb presència o no de progressió en la hipoacúsia indica que únicament la funció vestibular és la característica clínica comuna en la síndrome d'Usher tipus II de tots els pacients amb mutació estudiats en aquest treball.

L'anàlisi molecular del gen USH2A va permetre detectar diferents polimorfismes en el grup de pacients caracteritzats per presentar RP no sindròmica o síndrome d'Usher tipus II inclosos en el present treball (apartat 4.4., Taula 9). D'aquests canvis cal destacar la presència d'una nova variant silenciosa (p.V191V) en una família amb RP no sindròmica que implica un canvi d'una guanina per una adenina en el nucleòtid 573 sense afectar l'aminoàcid de valina corresponent. També s'ha detectat en un únic pacient amb RP no sindròmica un canvi d'aminoàcid en el codó 841 no descrit abans, que dóna lloc al reemplaçament d'un residu de serina per un de tirosina (p.S841Y). L'estudi familiar no mostra cosegregació d'aquests canvis amb la malaltia i per aquest motiu són classificats com a canvis no patològics. En cinc pacients (només un amb síndrome d'Usher II) es va detectar el canvi d'aminoàcid p.V230M prèviament descrit com una mutació patològica per Dreyer i col. (2000), l'estudi a nivell familiar va determinar absència de cosegregació d'aquest canvi amb la malaltia, el que permet considerar aquest canvi com una variant no patològica.

De forma global, considerant les diferents famílies estudiades en aquest treball queda evidenciada en la síndrome d'Usher la clara heterogeneïtat fenotípica associada al gen USH2A, tant pel què fa a la progressió de la malaltia com pel què fa al grau de severitat. En aquest estudi es mostra que les famílies amb la mutació c.2299delG en homozigosi presenten una simptomatologia típica del tipus II de la

síndrome d'Usher (Figura 23, famílies B-90 i B-132), mentre que les famílies B-21, B-114, M-4 i M-184b manifesten un fenotip atípic de la síndrome d'Usher, caracteritzat per una progressió de la sordesa, coincidint amb les característiques clíniques que defineixen el tipus III. La presència de variabilitat fenotípica expressada a nivell intrafamiliar queda confirmada si considerem les diferències clíniques observades entre els germans afectats de la família B-33 caracteritzats a nivell molecular per compartir idèntiques mutacions en el gen USH2A.

El gen USH2A explica el 44% de les famílies amb síndrome d'Usher tipus II incloses en aquest estudi. Aquesta freqüència és similar a la trobada en altres treballs realitzats en pacients amb síndrome d'Usher II, tot i existir diferències entre les poblacions estudiades segons la consanguinitat i la procedència. La localització de totes les mutacions descrites en la síndrome d'Usher en la proteïna codificada pel gen USH2A es mostren en la figura 26, on s'observa que la distribució d'aquestes mutacions no mostra la presència de regions on existeixi una major concentració de canvis patològics. Els resultats en el gen USH2A obtinguts en aquest treball indiquen que la combinació de diferents mutacions en el gen USH2A junt amb la variabilitat fenotípica expressada dificulten la correlació genotip-fenotip. És important considerar que l'efecte produït per la combinació de diferents mutacions dins d'un mateix gen, l'efecte de factors ambientals, l'existència de gens modificadors o la combinació de tots aquests factors podrien contribuir de forma important a determinar l'heterogeneïtat clínica manifestada per les patologies de la visió i de l'oïda pel què fa a l'edat d'aparició, el grau de progressió i a la severitat de la malaltia, quedant incloses la RP no sindròmica i la síndrome d'Usher. Diversos casos com és l'herència digènica descrita en la RP no sindròmica (Kajiwara i col., 1994) i l'herència tri-al·lèlica identificada en el síndrome de Bardet-Biedl (RP sindròmica) (Katsanis i col., 2001a) suggereixen l'existència de gens modificadors, l'efecte d'aquests gens podria ser determinant per explicar la clara heterogeneïtat clínica presentada pel gen USH2A.

## **6. CONCLUSIONS**

L'absència de mutacions en l'anàlisi molecular directe dels tres gens expressats en l'EPR i caracteritzats per la seva implicació en el cicle visual (RLBP1, CRBP1 i RGR) i els resultats obtinguts dels estudis de cosegregació de les variants no patogèniques identificades, permeten excloure aquests gens com a responsables de la RPAR en les famílies analitzades.

L'estudi dels gens expressats en la part neural de la retina, CRB1 i USH2A, ha evidenciat la implicació dels mateixos en els processos de degeneració retiniana.

S'han identificat un total de 19 variants en la seqüència del gen CRB1. Set d'aquestes són mutacions patogèniques, de les quals sis es descriuen per primera vegada. Els diferents fenotips dels pacients portadors d'aquestes mutacions confirmen l'elevada heterogeneïtat clínica associada a les alteracions del gen CRB1. En aquest estudi, les mutacions de CRB1 són responsables d'un 6,5% de les famílies analitzades.

S'han caracteritzat un total de 34 variants nucleotídiques en el gen USH2A. Vint d'aquestes tenen significat patològic. En el grup de pacients amb RPAR, s'ha detectat l'existència de 9 mutacions en el gen USH2A, 4 de les quals s'han descrit per primera vegada. La mutació p.C759F s'ha evidenciat en el 4,6% de les famílies amb RP no sindròmica. En el grup de pacients amb síndrome d'Usher tipus II, s'han identificat 11 mutacions en el gen USH2A, sis de les quals no havien estat prèviament descrites. Aquestes mutacions en el gen USH2A s'han detectat en el 44% de les famílies analitzades amb la síndrome d'Usher tipus II. La mutació c.2299delG s'ha identificat entre el 19-25% de les famílies estudiades, amb una freqüència al·lèlica del 13-16%.

Les mutacions detectades en el gen USH2A confirmen el compromís d'aquest gen tant en la RPAR no sindròmica com en la síndrome d'Usher.

Les dades obtingudes en aquest treball evidencien l'elevada heterogeneïtat tant clínica com genètica i l'absència d'un locus majoritari en la RP no sindròmica amb un patró d'herència autosòmic recessiu.

## **7.REFERÈNCIES**

**A**

**Adato A, Weston MD, Berry A, Kimberling WJ, Bonne-Tamir B.** Three novel mutations and twelve polymorphisms identified in the USH2A gene in Israeli USH2 families. *Hum Mutat* 2000; 15 (4): 388

**Akhmedov NB, Piriev NI, Chang B, Rapoport AL, Hawes NL, Nishina PM, Nusinowitz S, Heckenlively JR, Roderick TH, Kozak ChA, Dancinger M, Davisson MT, Farber DB.** A deletion in a photoreceptor-specific nuclear receptor mRNA causes retinal degeneration in the rd7 mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(10): 5551-6

**Antiñolo G, Ruiz A, Borrego S, Sánchez B, Sáez ME, Sánchez J, Marcos I.** Mutation and polymorphism analysis in the rhodopsin gene in dominant and recessive retinitis pigmentosa patients from the South of Spain. *Med Genet* 1997; 9: 141

**Ayuso C, García-Sandoval B, Nájera C, Valverde D, Carballo M, Antiñolo G.** Retinitis pigmentosa in Spain. The Spanish Multicentric and Multidisciplinary Group for Research into Retinitis Pigmentosa. *Clin Genet* 1995; 48: 120-2

**Ayuso C, Trujillo MJ, Sanz R, Sandoval B, Ramos C, Garcia-Sandoval B.** Genetic epidemiology of retinitis pigmentosa in Spain. *Med Genet* 1997 suppl; 9: 33-4

**Ayuso C.** Estudio de la Retinosis pigmentaria en España. En Grupo multicéntrico español de investigación sobre RP (eds): La retinosis pigmentaria en España: Estudio clínico y genético. 1ª edición. Madrid: ONCE. 2001; 231-300

**B**

**Bachmann A, Schneider M, Theilenberg E, Grawe F, Knust E.** Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* 2001; 414(6864): 638-43

**Baiget M, Calaf M, Valverde D, del Rio E, Reig C, Carballo M, Calvo M, Gonzalez-Duarte R.** Identificación de dos mutaciones alélicas en el gen de la subunidad beta de la fosfodiesterasa en una familia española afectada de retinosis pigmentaria autosómica recesiva. *Med Clin (Barc)* 1998; 111:420-2

**Banerjee P, Kleyn PW, Knowles JA, Lewis CA, Ross BM, Parano E, Kovats SG, Lee JJ, Penschaszadeh GK, Ott J, Jacobson SG, Gilliam TC.** TULP1 mutation in two extended Dominican kindreds with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 1998; 18: 177-9

**Bareil C, Hamel CP, Delague V, Arnaud B, Demaille J, Claustres M.** Segregation of a mutation in CNGB1 encoding the beta-subunit of rod cGMP-gated channel in a family with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Genet* 2001; 108: 328-34

**Bayés M, Giordano M, Balcells S, Grinberg D, Vilageliu L, Martínez I, Ayuso C, Benítez J, Ramos MA, Chivelet P, Solans T, Valverde D, Amselem S, Goossens M, Baiget M, Gonzalez-Duarte R, Besmond C.** Homozygous tandem duplication within the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase as a cause for autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* 1995; 5: 228-234

**Bayés M, Goldaracena B, Martínez-Mir A, Iragui-Madoz MI, Solans T, Chivelet P, Bussaglia E, Ramos-Arroyo MA, Baiget M, Vilageliu LI, Balcells S, Gonzalez-Duarte R, Grinberg D.** A new autosomal recessive retinitis pigmentosa locus maps on chromosome 2q31-q33. *J Med Genet* 1998; 35: 141-5

**Baylor D.** How photons start vision. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 560-6

**Berson EL.** Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 1659-76

**Bessant DA, Payne AM, Plant C, Bird AC, Bhattacharya SS.** Further refinement of the Usher 2A locus at 1q41. *J Med Genet.* 1998 Sep;35(9):773-4

**Bhattacharya G, Kalluri R, Orten DJ, Kimberling WJ, Cosgrove D.** A domain-specific usherin-collagen IV interaction may be required for stable integration into the basement membrane superstructure. *J Cell Sci* 2004; 117: 233-42

**Bhattacharya G, Miller C, Kimberling WJ, Jablonski MM, Cosgrove D.** Localization and expression of usherin: a novel basement membrane protein defective in people with Usher's syndrome type IIa. *Hear Res* 2002;163 (1-2): 1-11



**Bressant DA, Payne AM, Snow BE, Antino G, Mehdi SQ, Bird AC, Siderovski DP, Bhattacharya SS.** Importance of the autosomal recessive retinitis pigmentosa locus on 1q31-q32.1 (RP12) and mutation analysis of the candidate gene RGS16 (RGS-r). *J Med Genet.* 2000; 37(5): 384-7

**Bird AC.** Retinal photoreceptor dystrophies. Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol* 1995; 119: 543-62

**Boughman JA, Vernon M, Shaver KA.** Usher syndrome: definition and estimate of prevalence from two high-risk populations. *J Chronic Dis* 1983; 36: 595-603

**Bowes C, Li T, Dancinger M, Baxter LC, Applebury ML, Farber DB.** Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the  $\beta$  subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* 1990; 347: 677-80

**Burstedt MSI, Sandgren O, Holmgren G, Forsman-Semb K** Bothnia dystrophy caused by mutations in the cellular retinaldehyde-binding protein gene (RLBP1) on chromosome 15q26. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999; 40: 995-1000.

**Burstedt MSI, Forsman-Semb K, Golovleva I, Janunger T, Wachtmeister L, Sandgren O.** Ocular phenotype of Bothnia dystrophy, an autosomal recessive retinitis pigmentosa associated with an R234W mutation in the RLBP1 gene. *Arch Ophthalmol* 2001; 119: 260-7

## C

**Chen CK.** Recoverin and rhodopsin kinase. *Adv Exp Med Biol* 2002; 514: 101-7

**Chen P, Hao W, Rife L, Wang X P, Shen D, Chen J, Ogden T, Van Boemel G B, Wu L, Yang M, Fong H K W** A photic visual cycle of rhodopsin regeneration is dependent on Rgr. *Nat Genet* 2001; 28: 256-60

**Chen TY, Illing M, Molday LL, Hsu YT, Yau KW, Molday RS.** Subunit 2 (or beta) of retinal rod cGMP-gated cation channel is a component of the 240-kDa channel-associated protein and mediates Ca (2+)-calmodulin modulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11757-61

**Chen XN, Korenberg JR, Jiang M, Shen D, Fong HKW.** Localization of the human RGR opsin gene to chromosome 10q23. *Hum Genet* 1996; 97 (6); 720-2

**Chen P, Hao W, Rife L, Wang XP, Shen D, Chen J, Ogden T, Van Boemel GB, Wu L, Yang M, Fong HKW.** A photic visual cycle of rhodopsin regeneration is dependent on Rgr. *Nat Genet* 2001; 28: 256-60

**Chen P, Lee TD, Fong HKW.** Interaction of 11-cis-retinol dehydrogenase with the chromophore of retinal G protein-coupled receptor opsin. *J Biol Chem* 2001; 276 (24): 21098-104

**Colantuoni V, Cortese R, Nilsson M, Lundvall J, Bavik CO, Eriksson U, Peterson PA, Sundelin J.** Cloning and sequencing of a full length cDNA corresponding to human cellular retinol-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 130: 431-9

**Colantuoni V, Rocchi M, Roncuzzi L, Romeo G.** Mapping of human cellular retinol-binding protein to chromosome 3. *Cytogenet Cell Genet* 1986; 43: 221-2

**Crabb JW, Goldflam S, Harris SE, Saari JC.** Cloning of the cDNAs encoding the cellular retinaldehyde-binding protein from bovine and human retina and comparison of the protein structures. *J Biol Chem* 1988; 263 (35): 18688-92

## D

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

**Dancinger M, Heilbron V, Yong-Qing G, Dan-Zhu Z, , Jacobson SG, Farber DB.** A homozygous PDE $\beta$  mutation in a family with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 1996; 2: 10

**D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, Vollrath D.** Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Genet.* 2000; 9: 645-51

**De Baere E, Speleman F, Van Roy N, De Paepe A, Messiaen L.** Assignment of the cellular retinol-binding protein 1 gene (RBP1) and of the coatomer beta-prime subunit gene (COPB2) to human chromosome band 3q23 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1998; 82: 226-7

**den Hollander AI, ten Brink J B, de Kok YJM, van Soest S, van den Born LI, van Driel MA, van de Pol DJR, Payne AM, Bhattacharya SS, Kellner U, Hoyng CB, Westerveld A, Brunner HG, Bleeker-Wagemakers EM, Deutman AF, Heckenlively JR, Cremers FPM, Bergen AAB.** Mutations in a human homologue of *Drosophila crumbs* cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat Genet* 1999; 23: 217-21

**den Hollander AI, Heckenlively J R, van den Born L I, de Kok Y J M, van der Velde-Visser S D, Kellner U, Bernhard J, van Schooneveld M J, Blankenagel A, Rohrschneider K, Wissinger B, Cruysberg J R M, Deutman A F, Brunner H G, Apfelstedt-Sylla E, Hoyng C B, Cremers F P M.** Leber Congenital Amaurosis and Retinitis with Coats-like Exudative Vasculopathy are associated with mutations in the *Crumbs Homologue 1 (CRB1)* Gene. *Am J Hum Genet* 2001a; 69: 198-203

**den Hollander AI, Johnson K, de Kok YJ, Klebes A, Brunner HG, Knust E, Cremers FP.** *CRB1* has a cytoplasmic domain that is functionally conserved between human and *Drosophila*. *Hum Mol Genet.* 2001b; 10(24): 2767-73

**den Hollander AI, Ghiani M, de Kok YJ, Wijnholds J, Ballabio A, Cremers FP, Broccoli V.** Isolation of *Crb1*, a mouse homologue of *Drosophila crumbs*, and analysis of its expression pattern in eye and brain. *Mech Dev* 2002; 110(1-2): 203-7

**Dharmaraj S, Silva E, Pina AL, Li YY, Yang J-M, Carter RC, Loyer M, El-Hilari H, Traboulsi E, Sundin O, Zhu D, Koenekoop RK, Maumenee IH.** Mutational analysis and clinical correlation in Leber congenital amaurosis. *Ophthalmic Genetics* 2000; 21 (3): 135-50

**Dizhoor AM, Lowe DG, Olshevskaya EV, Laura RP, Hurley JB.** The human photoreceptor membrane guanylyl cyclase, RetGC, is present in outer segments and is regulated by calcium and a soluble activator. *Neuron* 1994 ; 12(6): 1345-52

**Dizhoor AM, Olshevskaya EV, Henzel WJ, Wong SC, Stults JT, Ankoudinova I, Hurley JB.** Cloning, sequencing, and expression of a 24-kDa Ca(2+)-binding protein activating photoreceptor guanylyl cyclase. *J Biol Chem.* 1995 ; 270(42): 25200-6

**Dreyer B, Tranebjærg L, Rosenberg T, Weston MD, Kimberling WJ, Nilssen Æ.** Identification of novel *USH2A* mutations: implications for the structure of *USH2A* protein. *Eur J Hum Genet* 2000;8:500-506

**Dreyer B, Tranebjærg L, Brox V, Rosenberg T, Moller C, Beneyto M, Weston MD, Kimberling WJ, Cremers CW, Liu XZ, Nilssen Æ.** A common ancestral origin of the frequent and widespread 2299delG USH2A mutation. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 228-34

**Dryja TP.** Human genetics. Deficiencies in sight with the candidate gene approach. *Nature* 1990; 347: 614

**Dryja TP, Hahn LB, Cowley GS, McGee TL, Berson EL.** Mutation spectrum of the rhodopsin gene among patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(20): 9370-4

**Dryja TP, Berson EL.** Retinitis pigmentosa and allied diseases. Implications of genetic heterogeneity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 1197-1200

**Dryja TP, Finn JT, Peng Y-W, McGee TL, Berson EL, Yau K-W.** Mutations in the gene encoding the  $\alpha$  subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10177-81

**Dryja TP, Li T.** Molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1739-43

**Dryja TP, McEvoy JA, McGee TL, Berson EL.** Novel rhodopsin mutations Gly114Val and Gln184Pro in dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 3124-7

**Dryja TP, Adams SM, Grimsby JL, McGee TL, Hong D -H, Li T, Andreasson S, Berson EL.** Null RPGRIP1 alleles in patients with Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1295-8

## E

**Edwards A, Fishman GA, Anderson RJ, Grover S, Derlacki DJ.** Visual acuity and visual field impairment in Usher syndrome. *Arch Ophthalmol* 1998; 116: 165-8

**Eichers ER, Green JS, Stockton DW, Jackman ChS, Whelan J, McNamara A, Johnson GJ, Lupski JR, Katsanis N.** Newfoundland rod-cone dystrophy, an early-onset retinal dystrophy, is caused by splice-junction mutations in RLBP1. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 955-64

**Eudy JD, Weston MD, Yao S, Hoover DM, Rehm HL, Ma-Edmonds M, Yan D, Ahmad I, Cheng JJ, Ayuso C, Cremers C, Davenport S, Moller C, Talmadge CB, Beisel KW, Tamayo M, Morton CC, Swaroop A, Kimberling WJ, Sumegi J.** Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa. *Science* 1998; 280: 1753-5

## F

**Fain GL, Matthews HR, Cornwall MC, Koutalos Y.** Adaptation in Vertebrate Photoreceptors. *Physiol Rev.* 2001; 81: 117-151

**Farber MD, Fishman GA, Weiss RA** Autosomal dominantly inherited retinitis pigmentosa. Visual acuity loss by subtype. *Arch Ophthalmol* 1985; 103: 524-8

**Farber DB, Lolley RN.** Cyclic guanosine monophosphate: elevation in degenerating photoreceptor cells of the C3H mouse retina. *Science* 1974; 186: 449-51

**Farber DB, Lolley RN.** Enzyme basis for cyclic GMP accumulation in degenerative photoreceptor cells of mouse retina. *J Cyclic Nucleotide Res* 1976; 2: 139-48

**Farrar GJ, Kenna PF, Humphries P.** On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention. *EMBO J* 2002; 21: 857-64

**Fawcett DW.** Tratado de histología. Bloom-Fawcett. 12<sup>a</sup> ed. Interamericana Mc Graw Hill de España. Madrid, 1995

**Finckh U, Xu S, Kumaramanickavel G, Schurmann M, Mukkadan JK, Fernandez ST, John S, Weber JL, Denton MJ, Gal A** Homozygosity mapping of autosomal recessive retinitis pigmentosa locus (RP22) on chromosome 16p12.1-p12.3. *Genomics* 1998; 48: 341-5

**Fishman GA, Alexander KR, Anderson RJ.** Autosomal dominant retinitis pigmentosa: A method of classification. *Arch Ophthalmol* 1985; 103: 366-74

**Fishman GA, Weinberg AB, McMahon TT.** X-linked recessive retinitis pigmentosa. Clinical characteristics of carriers. *Arch Ophthalmol* 1986; 104: 1329-35

**Fishman GA, Roberts MF, Derlacki DJ, Grimsby JL, Yamamoto H, Sharon D, Nishiguchi KM, Dryja TP.** Novel mutations in the cellular retinaldehyde-binding protein gene (RLBP1) associated with retinitis punctata albescens: evidence of interfamilial genetic heterogeneity and fundus changes in heterozygotes. *Arch Ophthalmol* 2004; 122(1): 70-5

**Freund CL, Wang Q -L, Chen S, Muskat BL, Wiles CD, Sheffield VC, Jacobson SG, McInnes RR, Zack DJ, Stone EM.** De novo mutations in the CRX homeobox gene associated with Leber congenital amaurosis. *Nature genet* 1998; 18: 311-2

**Fuchs S, Nakazawa M, Maw M, Tamai M, Oguchi Y, Gal A** A homozygous 1-base pair deletion in the arrestin gene is a frequent cause of Oguchi disease in Japanese. *Nat Genet* 1995; 10: 360-2

## G

**Gal A, Artlich A, Ludwig M, Niemeyer G, Olek K, Schwinger E, Schinzel A** Pro-347-Arg mutation of the rhodopsin gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Genomics* 1991; 11: 468-70

**Gal A, Orth U, Baehr W, Schwinger E, Rosenberg T.** Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in autosomal dominant stationary night blindness. *Nat Genet* 1994; 7: 64-8

**Gal A, Li Y, Thompson DA, Weir J, Orth U, Jacobson SG, Apfelstedt-Sylla E, Vollrath D.** Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 2000; 26: 270-1

**Gerber S, Rozet JM, Takezawa SI, dos Santos LC, Lopes L, Gribouval O, Penet C, Perrault I, Ducroq D, Souied E, Jeanpierre M, Romana S, Frezal J, Ferraz F, Yu-Umesono R, Munnich A, Kaplan J.** The photoreceptor cell-specific nuclear receptor gene (PNR) accounts for retinitis pigmentosa in the Crypto-Jews from Portugal (Marranos), survivors from the Spanish Inquisition. *Hum Genet.* 2000 Sep; 107(3): 276-84

- Gerber S, Perrault I, Hanein S, Shalev S, Zlotogora J, Barbet F, Ducroq D, Dufier J, Munnich A, Rozet J, Kaplan J** A novel mutation disrupting the cytoplasmic domain of CRB1 in a large consanguineous family of Palestinian origin affected with Leber congenital amaurosis. *Ophthalmic Genet* 2002; 23(4): 225-35
- Gibson SK, Parkes JH, Liebman PA.** Phosphorylation modulates the affinity of light-activated rhodopsin for G protein and arrestin. *Biochemistry* 2000; 39:5738-49
- Gorczyca WA, Polans AS, Surgucheva IG, Subbaraya I, Baehr W, Palczewski K.** Guanylyl Cyclase activating protein a calcium-sensitive regulator of phototransduction. *J Biol Chem* 1995; 270: 22029-36
- Gorczyca WA, Sokal I.** GCAPs: Ca<sup>2+</sup> sensitive regulators of retGC. *Adv Exp Med Biol* 2002; 514: 319-32
- Golovleva I, Bhattacharya S, Wu Z, Shaw N, Yang Y, Andrabi K, West KA, Burstedt MS, Forsman K, Holmgren G, Sandgren O, Noy N, Qin J, Crabb JW.** Disease-causing mutations in the cellular retinaldehyde binding protein tighten and abolish ligand interactions. *J Biol Chem* 2003 4;278(14):12397-402
- Grawe F, Wodarz A, Lee B, Knust E, Skaer H.** The Drosophila genes crumbs and stardust are involved in the biogenesis of adherens junctions. *Development* 1996;122(3): 951-9
- Gron Dahl J** Estimation of prognosis and prevalence of retinitis pigmentosa and Usher syndrome in Norway. *Clin Genet* 1987; 31: 255-64
- Grunwald ME, Yu WP, Yu HH, Yau KW.** Identification of a domain on the beta-subunit of the rod cGMP-gated cation channel that mediates inhibition by calcium-calmodulin. *J Biol Chem* 1998; 273: 9148-57
- Guyton AC y Hall JE** . *Tratado de Fisiología Médica*. 9<sup>a</sup> Ed. Interamericana McGraw-Hill de España (eds). Madrid, 1996
- Gu SM, Thompson DA, Srikumari CR, Lorenz B, Finckh U, Nicoletti A, Murthy KR, Rathmann M, Kumaramanickavel G, Denton MJ, Gal A** Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* 1997; 17:194-7

**Gu SM, Kumaramanickavel G, Srikumari CR, Denton MJ, Gal A.** Autosomal recessive retinitis pigmentosa locus RP28 maps between D2S1337 and D2S286 on chromosome 2p11-p15 in an Indian family. *J Med Genet* 1999; 36: 705-7

## H

**Haeseleer F, Sokal I, Li N, Pettenati M, Rao N, Bronson D, Wechter R, Baehr W, Palczewski K.** Molecular characterization of a third member of the guanylyl cyclase-activating protein subfamily. *J Biol Chem*.1999; 274(10): 6526-35

**Haeseleer F, Jang GF, Imanishi Y, Driessen CA, Matsumura M, Nelson PS, Palczewski K.** Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina. *J Biol Chem* 2002; 277(47): 45537-46

**Hagstrom SA, North MA, Nishina PM, Berson EL, Dryja TP.** Recessive mutations in the gene encoding the tubby-like protein TULP1 in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 1998; 18: 174-6

**Haider NB, Jacobson SG, Cideciyan AV, Swiderski R, Streb LM, Searby C, Beck G, Hockey R, Hanna DB, Gorman S, Duhl D, Carmi R, Bennett J, Weleber RG, Fishman GA, Wright AF, Stone EM, Sheffield VC.** Mutation of a nuclear receptor gene, NR2E3, causes enhanced S cone syndrome, a disorder of retinal cell fate. *Nat Genet* 2000; 24: 127-31

**Haider NB, Jacobson SG, Cideciyan AV, Swiderski R, Streb LM, Searby C, Beck G, Hockey R, Hanna DB, Gorman S, Duhl D, Carmi R, Bennett J, Weleber RG, Fishman GA, Wright AF, Stone EM, Sheffield VC.** Mutation of a nuclear receptor gene, NR2E3, causes enhanced S cone syndrome, a disorder of retinal cell fate. *Nat Genet*. 2000; 24(2): 127-31

**Haider NB, Naggert JK, Nishina PM.** Excess cone cell proliferation due to lack of a functional NR2E3 causes retinal dysplasia and degeneration in rd7/rd7 mice. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1619-26

**Haim M.** Retinitis pigmentosa: problems associated with genetic classification. *Clin Genet* 1993; 44: 62-70



- Hameed A, Khaliq S, Ismail M, Anwar K, Mehdi SQ, Bessant D, Payne AM, Bhattacharya SS.** A new locus for autosomal recessive RP (RP29) mapping to chromosome 4q32-q34 in a Pakistani family. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1436-8
- Hamel CP, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Redmond TM.** The gene for the retinal pigment epithelium-specific protein RPE65 is localized to human 1p31 and mouse 3. *Genomics* 1994; 20: 509-12
- Hamm HE.** How activated receptors coupled to G proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 4819-21
- Hanein S, Perrault I, Gerber S, Tanguy G, Barbet F, Ducroq D, Calvas P, Dollfus H, Hamel C, Lopponen T, Munier F, Santos L, Shalev S, Zafeiriou D, Dufier JL, Munnich A, Rozet JM, Kaplan J.** Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. *Hum Mutat* 2004; 23: 306-17
- Hao W, Fong HKW.** Blue and ultraviolet light-absorbing opsin from the retinal pigment epithelium. *Biochemistry* 1996; 35: 6251-6
- Hao W, Fong HKW.** The endogenous chromophore of retinal G protein-coupled receptor opsin from the pigment epithelium. *J Biol Chem* 1999; 274 (10): 6085-90
- He W, Cowan CW, Wensel TG.** RGS9, a CTPase accelerator for phototransduction. *Neuron* 1998; 20: 95-102
- He W, Lu L, Zhang X, El-Hodiri HM, Chen CK, Slep KC, Simon MI, Jamrich M, Wensel TG.** Modules in the photoreceptor RGS9-1.Gbeta 5L GTPase-accelerating protein complex control effector coupling, GTPase acceleration, protein folding, and stability. *J Biol Chem*, 2000; 275: 37093-100
- Heckenlively JR.** Preserved para-arteriole retinal pigment epithelium (PPRPE) in retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 1982; 66(1): 26-30
- Heckenlively JR.** Retinitis pigmentosa. JB Lippincott company (eds). Philadelphia.1988
- Heckenlively JR, Yoser SL, Friedman LH, Oversier JJ.** Clinical findings and common symptoms in retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* 1988; 105: 504-11

**Holopigian K, Greenstein V, Seiple W, Carr RE.** Rates of change differ among measures of visual function in patients with retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 1996; 103: 398-405

**Hong Y, Stronach B, Perrimon N, Jan LY, Jan YN.** *Drosophila* Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature* 2001; 414(6864): 634-8

**Hope CI, Bunday S, Proops D, Fielder AR.** Usher syndrome in the city of Birmingham- prevalence and clinical classification. *Br J Ophthalmol* 1997; 81: 46-53

**Hsu YT, Molday RS.** Interaction of calmodulin with the cyclic GMP-gated channel of rod photoreceptor cells. Modulation of activity, affinity purification, and localization. *J Biol Chem* 1994; 269: 29765-70

**Hu G, Jangs G-F, Cowan CW, Wensel TG, Palczewski K.** Phosphorylation of RGS9-1 by an endogenous protein kinase in rod outer segments. *J Biol Chem* 2001; 276: 22287-95

**Huang D, Eudy JD, Uzvolgyi E, Davis JR, Talmadge CB, Pretto D, Weston MD, Lehman JE, Zhou M, Seemayer TA, Ahmad I, Kimberling WJ, Sumegi J.** Identification of the mouse and rat orthologs of the gene mutated in Usher syndrome type IIA and the cellular source of USH2A mRNA in retina, a target tissue of the disease. *Genomics* 2002; 80 (2): 195-203

**Huang SH, Pittler SJ, Huang X, Oliveira L, Berson EL, Dryja TP.** Autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the alpha subunit of rod cGMP phosphodiesterase. *Nat Genet* 1995; 11: 468-71

**Humphries P, Kenna P, Farrar GJ.** On the molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Science* 1992; 256: 804-8

## I

**Inglehearn CF, Keen TJ, Bashir R, Jay M, Fitzker F, Bird AC, Crombie A, Bhattacharya S.** A completed screen for mutations of the rhodopsin gene in a panel of patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 41-5

**Intres R, Goldflam S, Cook JR, Crabb JW.** Molecular cloning and structural analysis of the human gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein. *J Biol Chem* 1994; 269 (14): 25411-18

**Izaddoost S, Nam SC, Bhat MA, Bellen HJ, Choi KW.** Drosophila Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. *Nature* 2002; 416(6877): 178-83

## J

**Jiang M, Pandey S, Fong HKW.** An opsin homologue in the retina and pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34 (13): 3669-78

**Johnson K, Grawe F, Grzeschik N, Knust E.** Drosophila crumbs is required to inhibit light-induced photoreceptor degeneration. *Curr Biol* 2002; 12(19): 1675-80

## K

**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. *Nat Genet* 1993; 3: 208-12

**Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP.** Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science* 1994; 264:1604-8

**Kaplan J, Bonneau D, Frézal J, Munnich A, Dufier J-L.** Clinical and genetic heterogeneity in retinitis pigmentosa. *Hum Genet* 1990; 85: 635-42

**Kaplan J, Pelet A, Martin C, Delrieu O, Ayme S, Bonneau D, Briard ML, Hanauer A, Larget-Piet L, Lefrancois P, Michelawad A, Plauchu H, Dufier JL, Frezal J, Munnich A.** Phenotype-genotype correlations in X-linked retinitis pigmentosa. *J Med Genet* 1992; 29: 615-23

**Katsanis N, Ansley SJ, Badano JL, Eichers ER, Lewis RA, Hoskins BE, Scambler PJ, Davidson WS, Beales PL, Lupski JR.** Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science* 2001a; 293: 2256-9

- Katsanis N, Shroyer NF, Lewis RA, Cavender JC, Al-Rajhi AA, Jabak M, Lupski JR.** Fundus albipunctatus and retinitis punctata albescens in a pedigree with an R150Q mutation in RLBP1. *Clin Genet* 2001b; 59: 424-9
- Kennedy BN, Goldflam S, Chang MA, Campochiaro P, Davis AA, Zack DJ, Crabb JW.** Transcriptional regulation of cellular retinaldehyde-binding protein in the retinal pigment epithelium. *J Biol Chem* 1998; 273 (10): 5591-8
- Kennedy BN, Huang J, Saari JC, Crabb JW.** Molecular characterization of the mouse gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein. *Mol Vis* 1998; 4: 14
- Kennedy BN, Chibo L, Ortego J, Coca-Prados M, Sarthy V, Crabb JW.** CRALBP transcriptional regulation in ciliary epithelial, retinal Müller and retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2003; 76: 257-60
- Khaliq S, Hameed A, Ismail M, Mehdi SQ, Bessant DAR, Payne AM, Bhattacharya SS.** Refinement of the locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP25) linked to chromosome 6q in a family of Pakistani origin. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 571-4
- Khaliq S, Aiysha A, Hameed A, Anwar K, Mohyuddin A, Azmat Z, Shami SA, Ismail M, Mehdi Q.** Mutation screening of Pakistani families with congenital eye disorders. *Exp Eye Res* 2003; 76: 343-8
- Kimberling WJ, Weston MD, Moller C, Davenport SL, Shugart YY, Priluck IA, Martini A, Milani M, Smith RJ.** Localization of Usher syndrome type II to chromosome 1q. *Genomics* 1990; 7(2): 245-9
- Kimberling WJ, Weston MD, Moller C, van Aarem A, Cremers CWRJ, Sumegi J, Ing PS, Connolly C, Martini A, Milani M, Tamayo ML, Bernal J, Greenberg J, Ayuso C.** Gene mapping of Usher syndrome type IIa: localization of the gene to a 2.1-cM segment on chromosome 1q41. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 216-223
- Knowles JA, Shugart Y, Banerjee P, Gilliam TC, Lewis CA, Jacobson SG, Ott J.** Identification of a locus, distinct from RDS-peripherin, for autosomal recessive retinitis pigmentosa on chromosome 6p. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1401-3
- Knust E, Tepass U, Wodarz A.** Crumbs and stardust, two genes of *Drosophila* required for the development of epithelial cell polarity. *Dev Suppl.* 1993:261-8

**Kobayashi M, Takezawa S-I, Hara K, Yu RT, Umesono Y, Agata K, Taniwaki M, Yasuda K, Umesono K.** Identification of a photoreceptor cell-specific nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4814-9

**Köksal Özgül R, Durukan H, Turan A, Öner C, Ögüs A, Farber DB.** Molecular analysis of the ABCA4 gene in Turkish patients with Stargardt disease and Retinitis Pigmentosa. *Hum Mut* 2004; 23(5): 523 (mutation in Brief online).

**Kolb H.** The architecture of functional neural circuits in the vertebrate retina. The Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 2385-404

**Kumaramanickavel G, Maw M, Denton MJ, John S, Srikumari CR, Orth U, Oehlmann R, Gal A.** Missense rhodopsin mutation in a family with recessive RP. *Nat Genet* 1994; 8: 10-1

## L

**Laura RP, Hurley JB.** The kinase homology domain of retinal guanylyl cyclases 1 and 2 specifies the affinity and cooperativity of interaction with guanylyl cyclase activating protein-2. *Biochemistry* 1998; 37(32): 11264-71

**Leconte L, Barnstable CJ.** Impairment of rod cGMP-gated channel alpha-subunit expression leads to photoreceptor and bipolar cell degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 917-26

**Leroy BP, Aragon-Martin JA, Weston MD, Bessant DA, Willis C, Webster AR, Bird AC, Kimberling WJ, Payne AM, Bhattacharya SS.** Spectrum of mutations in USH2A in British patients with Usher syndrome type II. *Exp Eye Res* 2001; 72(5): 503-9

**Leutelt J, Oehlmann R, Younus F, van den Born LI, Weber JL, Denton MJ, Mehdi SQ, Gal A.** Autosomal recessive retinitis pigmentosa locus maps on chromosome 1q in a large consanguineous family from Pakistan. *Clin Genet* 1995; 47(3): 122-4

**Lewis CA, Batlle IR, Batlle KGR, Banerjee P, Cideciyan AV, Huang J, Alemán TS, Huang Y, Ott J, Guillian TC, Knowles JA, Jacobson SG.** Tubby-like protein 1 homozygous splice-site mutation causes early-onset severe retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 2106-14

**Lewis RA, Otterud B, Stauffer D, Lalouel JM, Leppert M.** Mapping recessive ophthalmic diseases: linkage of the locus for Usher syndrome type II to a DNA marker on chromosome 1q. *Genomics* 1990; 7(2): 250-6

**Li ZY, Possin DE, Milam AH.** Histopathology of bone spicule pigmentation in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 1995; 102: 805-16

**Lindsay S, Inglehearn CF, Curtis A, Bhattacharya S.** Molecular genetics of inherited retinal degenerations. *Curr Opin Genet Develop* 1992; 2: 459-66

**Liu XZ, Hope C, Liang CY, Zou JM, Xu LR, Cole T, Mueller RF, Bunday S, Nance W, Steel KP, Brown SDM.** A mutation (2314delG) in the Usher syndrome type IIa gene: high prevalence and phenotypic variation. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1221-5

**Lotery AJ, Jacobson SG, Fishman GA, Weleber RG, Fulton AB, Namperumalsamy P, Hoen E, Levin AV, Grover S, Rosenow JR, Kopp KK, Sheffield VC, Stone EM.** Mutations in the CRB1 gene cause Leber congenital amaurosis. *Arch Ophthalmol* 2001a; 119: 415-20

**Lotery AJ, Malik A, Shami SA, Sindhi M, Chohan B, Moore P A, Denton M J, Stone E M.** CRB1 mutations may result in retinitis pigmentosa without para-arteriolar RPE preservation. *Ophthalmic Genet* 2001b; 22: 163-9

**Lowe DG, Dizhoor AM, Liu K, Gu Q, Spencer M, Laura R, Lu L, Hurley JB.** Cloning and expression of a second photoreceptor-specific membrane retina guanylyl cyclase (RetGC), RetGC-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(12): 5535-9

**Lyness AL, Ernst W, Quinlan MP, Clover GM, Arden GB, Carter RM, Bird AC, Parker JA.** A clinical, psychophysical, and electroretinographic survey of patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 1985; 69: 326-39

**M**

**Maeda T, Van Hooser JP, Driessen CAGG, Filipek S, Janssens JJM, Palczewski K.** Evaluation of the role of the retinal G protein-coupled receptor (RGR) in the vertebrate retina *in vivo*. *J Neurochem* 2003; 85: 944-56

**Makino ER, Handy JW, Li T, Arshavsky VY.** The GTPase activating factor for transducin in rod photoreceptors is the complex between RGS9 and type 5 G protein  $\beta$  subunit. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 1947-52

**Marcos I, Ruiz A, Blaschak CJ, Borrego S, Cutting GR, Antiñolo G** Mutation analysis of GABRR1 and GABRR2 in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *J Med Genet* 2000; 37: E5

**Marlhens F, Bareil C, Griffoin J-M, Zrenner E, Amalric P, Eliaou C, Liu S-Y, Harris E, Redmond TM, Arnaud B, Claustres M, Hamel CP.** Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet* 1997; 17: 139-41

**Marmor MF, Aguirre G, Berson E, Birch DG, Boughman JA, Carr R, Chatrion GE, Del Monte M, Dowling J, Enoch J, Fishman GA, Fulton AB, Garcia CA, Gouras P, Heckenlively J, Hu D-N, Lewis RA, Niemeyer G, Parker JA; Perlman I, Ripps H, Sandberg MA, Siegel I, Weleber RG; Wolf ML, Wu L, Young RSL.** Retinitis pigmentosa. A symposium on terminology and methods of examination. *Ophthalmology* 1983; 90: 126-131

**Marmor MF, Zrenner E.** Standard for clinical electroretinography. *Doc Ophthalmol* 1995; 89: 199-210

**Marmor MF, Zrenner E.** Standard for clinical electroretinography. *Int Soc Clin Electrophysiol Vision Doc Ophthalmol* 1998-99; 97: 143-56

**Martinez-Mir A, Bayes M, Vilageliu LI, Grinberg D, Ayuso C, del Rio T, Garcia-Sandoval B, Bussaglia E, Baiget M, Gonzalez-Duarte R, Balcells S.** A new locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP19) maps to 1p13-1p21. *Genomics* 1997; 40: 142-6

**Martinez-Mir A, Paloma E, Allikmets R, Ayuso C, del Rio T, Dean M, Vilageliu LI, Gonzalez-Duarte R, Balcells S.** Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR. *Nat Genet* 1998; 18: 11-2

**Mata NL, Moghrabi WN, Lee JS, Bui TV, Radu RA, Horwitz J, Travis GH.** Rpe65 is a retinyl ester binding protein that presents insoluble substrate to the isomerase in retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem* 2004; 279(1): 635-43

**Maw MA, Kennedy B, Knight A, Bridges R, Roth KE, Mani EJ, Mukkadan JK, Nancarrow D, Crabb JW, Denton MJ.** Mutation of the gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat. Genetics*. 1997; 17:198-200

**McBee JK, Kuksa V, Alvarez R, de Lera AR, Prezhdo O, Haeseleer F, Sokal I, Palczewski K.** Isomerization of all-trans-retinol to cis-retinols in bovine retinal pigment epithelial cells: dependence on the specificity of retinoid-binding proteins. *Biochemistry* 2000; 39(37): 11370-80

**McBee JK, Van Hooser JP, Jang G-F, Palczewski K.** Isomerization of 11-cis-retinoids to all-trans-retinoids in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2001; 276: 48483-93

**McLaughlin ME, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP.** Recessive mutations in the gene encoding the  $\beta$ -subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 1993; 4: 130-3

**McLaughlin ME, Ehrhart TL, Berson EL, Dryja TP.** Mutation spectrum of the gene encoding the beta subunit of rod phosphodiesterase among patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3249-53

**Medina E, Lemmers C, Lane-Guermonprez L, Le Bivic A.** Role of the Crumbs complex in the regulation of junction formation in *Drosophila* and mammalian epithelial cells. *Biol Cell* 2002; 94(6): 305-13

**Mehalow AK, Shuhei K, Smith RS, Hawes NL, Denegre JM, Young JA, Bechtold L, Haider NB, Tepass U, Heckenlively JR, Chang B, Naggert JK, Nishina PM.** CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina. *Hum Mol Genet* 2003, 12 (7): 2179-89

**Merin S.** Retinitis pigmentosa. *Inherited eye diseases: Diagnosis and clinical management*. Marcel Dekker (eds). New York. 1991; 219-65

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



**Molday RS, Molday LL.** Molecular properties of the cGMP-gated channel of rod photoreceptors. *Vision Res* 1998; 38: 1315-23

**Morimura H, Fishman GA, Grover SA, Fulton AB, Berson EL, Dryja TP.** Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or Leber congenital amaurosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3088-93

**Morimura H, Berson EL, Dryja TP.** Recessive mutations in the RLBP1 gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in a form of retinitis punctata albescens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999a; 40: 1000-4.

**Morimura H, Saindelle-Ribeau F, Berson E L, Dryja T P.** Mutations in RGR, encoding a light-sensitive opsin homologue, in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 1999b; 23: 393-4

**Mullen RJ, LaVail MM.** Inherited retinal dystrophy: primary defect in pigment epithelium determined with experimental rats chimeras. *Science* 1975; 192: 799-801

**Mustapha M, Chouery E, Torchard-Pagnez, D; Nouaille, S; Khrais A, Sayegh FN, Megarbane A, Loiselet J, Lathrop M, Petit C, Weil D.** A novel locus for Usher syndrome type I, USH1G, maps to chromosome 17q24-25. *Hum Genet* 2002; 110: 348-50

## N

**Najera C, Beneyto M, Blanca J, Aller E, Fontcuberta A, Millan JM, Ayuso C.** Mutations in myosin VIIA (MYO7A) and usherin (USH2A) in Spanish patients with Usher syndrome types I and II, respectively. *Hum Mutat* 2002; 20(1): 76-7

**Nakatani K, Chen C, Yau KW, Koutalos Y.** Calcium and phototransduction. *Adv Exp Med Biol* 2002; 514: 1-20

**Nakazawa M, Wada Y, Tamai M.** Arrestin gene mutations in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 1998; 116: 498-501

**Nathans J.** Rhodopsin: structure, function, and genetics. *Biochemistry* 1992; 31: 4923-31

**Nicoletti A, Wong DJ, Kawase K, Gibson LH, Yang-Feng TL, Richards JE, Thompson DA.** Molecular characterization of the human gene encoding an abundant 61kDa protein specific to the retinal pigment epithelium. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 641-9

**Nilsson MHL, Spurr NK, Lundvall J, Rask L, Peterson PA.** Human cellular retinol-binding protein gene organization and chromosomal location. *Europ J Biochem* 1988; 173: 35-44

**North MA, Naggert JK, Yan Y, Noben-Trauth K, Nishina PM.** Molecular characterization of TUB, TULP1, and TULP2, members of the novel tubby gene family and their possible relation to ocular diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3128-33

## P

**Pagon RA.** Retinitis pigmentosa. *Survey of Ophthalmology* 1988; 33: 137-77

**Palczewski K.** Is vertebrate phototransduction solved? New insights into the molecular mechanism of phototransduction. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 1994; 35: 3577-81

**Palczewski K.** GTP-binding-protein-coupled receptor kinases-two mechanistic models. *Eur J Biochem* 1997; 248: 261-9

**Palczewski K, Polans AS, Baehr W, Ames JB.** Ca<sup>2+</sup>-binding proteins in the retina: structure, function, and the etiology of human visual diseases. *Bioassays* 2000;22:337-50

**Paloma E, Hjelmqvist L, Bayes M, Garcia-Sandoval B, Ayuso C, Balcells S, Gonzalez-Duarte R.** Novel mutations in the TULP1 gene causing autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 656-9

**Paloma E, Martinez-Mir A, Garcia-Sandoval B, Ayuso C, Vilageliu LI, Gonzalez-Duarte R, Balcells S.** Novel homozygous mutation in the alpha subunit of the rod cGMP gated channel (CNGA1) in two Spanish sibs affected with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *J Med Genet* 2002; 39: E66 (1-4)

- Pandey S, Blanks JC, Spee Ch, Jiang M, Fong HKW.** Cytoplasmic retinal localization of an evolutionary homolog of the visual pigments. *Exp Eye Res* 1994; 58: 605-14
- Pellikka M, Tanentzapf G, Pinto M, Smith C, McGlade CJ, Ready DF, Tepass U.** Crumbs, the Drosophila homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature* 2002; 416(6877): 143-9
- Pearsall N, Bhattacharya G, Wisecarver J, Adams J, Cosgrove D, Kimberling W.** Usherin expression is highly conserved in mouse and human tissues. *Hear Res* 2002; 174(1-2): 55-63
- Perrault I, Rozet JM, Calvas P, Gerber S, Camuzat A, Dollfus H, Chatelin S, Souied E, Ghazi I, Leowski C, Bonnemaïson M, Le Paslier D, Frezal J, Dufier JL, Pittler S, Munnich A, Kaplan J.** Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet* 1996;14(4):461-4
- Petit C.** Usher syndrome: from genetics to pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2: 271-97
- Phelan JK, Bok D.** A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes. *Mol Vis* 2000; 6: 116-24
- Piriev NI, Shih JM, Farber DB.** Defective RNA splicing resulting from a mutation in the cyclic guanosine monophosphate-phosphodiesterase beta-subunit gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 463-470
- Polans A, Baehr W, Palczewski K.** Turned on by Ca<sup>2+</sup>! The physiology and pathology of Ca(2+)-binding proteins in the retina. *Trends Neurosci* 1996; 19: 547-54
- Porta A, Pierrottet C, Aschero M, Orzalesi N.** Preserved para-arteriolar retinal pigment epithelium retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* 1992; 113: 161-4
- Pulvermüller A, Palczewski K, Hofmann KP.** Interaction between photoactivated rhodopsin and its kinase: stability and kinetics of complex formation. *Biochemistry* 1993; 32: 14082-8

## R

**Rendtorff ND, Vissing H, Tumer Z, Silahtaroglu A, Tommerup N.** Assignment of the NR2E3 gene to mouse chromosome 9 and to human chromosome 15q22.33-q23. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 89: 279-80

**Riess O, Noerremoelle A, Weber B, Musarella MA, Hayden MR.** The search for mutations in the gene for the beta subunit of the cGMP phosphodiesterase in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 755-62

**Rivolta C, Sweklo EA, Berson EL, Dryja TP.** Missense mutation in the USH2A gene: Association with recessive retinitis pigmentosa without hearing loss. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1975-8

**Rivolta C, Sharon D, DeAngelis MM, Dryja TP.** Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1219-27

**Roh MH, Makarova O, Liu CJ, Shin K, Lee S, Laurinec S, Goyal M, Wiggins R, Margolis B.** The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J Cell Biol* 2002;157(1):161-72

**Rosenfeld PJ, Cowley GS, McGee TL, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP.** A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 1992; 1: 209-13

**Rosenberg T, Haim M, Hauch AM, Parving A.** The prevalence of Usher syndrome and other retinal dystrophy-hearing impairment associations. *Clin Genet* 1997; 51: 314-21

**Rozet JM, Gerber S, Ghazi I, Perrault I, Ducroq D, Souied E, Cabot A, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J.** Mutations of the retinal specific ATP binding transporter gene (ABCR) in a single family segregating both autosomal recessive retinitis pigmentosa RP19 and Stargardt disease: evidence of clinical heterogeneity at this locus. *J Med Genet* 1999; 36: 447-51

**Ruiz A, Borrego S, Marcos I, Antiñolo G.** A major locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa on 6q, determined by homozygosity mapping of chromosomal regions that contain gamma-aminobutyric acid-receptor clusters. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1452-9

**Ruiz A, Kuehn MH, Andorf JL, Stone E, Hageman GS, Bok D.** Genomic organization and mutation analysis of the gene encoding lecithin retinol acyltransferase in human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 31-7

## S

**Saari JC.** Isolation of cellular retinoid-binding proteins from bovine retina with bound endogenous ligands. *Methods Enzymol* 1982; 81: 819-26

**Saari JC and Bredberg DL.** Photochemistry and stereoselectivity of cellular retinaldehyde-binding protein from bovine retina. *J Biol Chem* 1987; 262(16): 7618-22

**Saari JC, Bredberg DL, Noy N.** Control of substrate flow at a branch in the visual cycle. *Biochemistry* 1994; 33 (10): 3106-12

**Saari JC, Huang J, Possin DE, Fariss RN, Leonard J, Garwin GG, Crabb JW, Milam AH.** Cellular retinaldehyde-binding protein is expressed by oligodendrocytes in optic nerve and brain. *Glia* 1997; 21 (3): 259-68

**Saari JC.** Biochemistry of visual pigment regeneration: the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 337-48

**Saari JC.** The sights along route 65. *Nat Genet* 2001; 29: 8-9

**Saari JC, Nawrot M, Kennedy BN, Garwin GG, Hurley JB, Huang J, Possin DE, Crabb JW.** Visual cycle impairment in cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) knockout mice results in delayed dark adaptation. *Neuron* 2001; 29: 739-48

**Saari JC, Nawrot M, Garwin GG, Kennedy MJ, Hurley JB, Ghyselinck NB, Chambon P.** Analysis of the visual cycle in cellular retinol-binding protein type I (CRBPI) knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43 (6): 1730-5

**Shammat IM, Gordon SE.** Stoichiometry and arrangement of subunits in rod cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 1999 ; 23(4): 809-19

**Schwarzer A, Schauf H, Bauer PJ.** Binding of the cGMP-gated channel to the Na/Ca-K exchanger in rod photoreceptors. *J Biol Chem* 2000; 275: 13448-54

**Sharon D, Sandberg MA, Rabe VW, Stillberger M, Dryja TP, Berson EL.** RP2 and RPGR Mutations and Clinical Correlations in Patients with X-Linked Retinitis Pigmentosa. *Am J Hum Genet* 2003; 73(6): 1131-46

**Shen D, Jiang M, Hao W, Tao L, Salazar M, Fong HKW.** A human opsin-related gene that encodes a retinaldehyde-binding protein. *Biochemistry* 1994; 33: 13117-25

**Smith RJ, Berlin CI, Hejtmancik JF, Keats BJ, Kimberling WJ, Lewis RA, Moller CG, Pelias MZ, Tranebjaerg L.** Clinical diagnosis of the Usher syndromes. Usher Syndrome Consortium. *Am J Med Genet* 1994; 50 (1): 32-8

**Sohocki MM, Bowne SJ, Sullivan LS, Blackshaw S, Cepko CL, Payne AM, Bhattacharya SS, Khaliq S, Mehdi SQ, Birch DG, Harrison WR, Elder FFB, Heckenlively JR, Daiger SP.** Mutations in a new photoreceptor-pineal gene on 17p cause Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* 2000; 24: 79-83

**Sohocki MM, Daiger SP, Bowne SJ, Rodriguez JA, Northrup H, Heckenlively JR, Birch DG, Mintz-Hittner H, Ruiz RS, Lewis RA, Saperstein DA, Sullivan LS.** Prevalence of mutations causing retinitis pigmentosa and other inherited retinopathies. *Hum Mut* 2001; 17: 42-51

**Souied E, Soubrane G, Benlian P, Coscas GJ, Gerber S, Munnich A, Kaplan J.** Retinitis punctata albescens associated with Arg135Trp mutation in the rhodopsin gene. *Am J Ophthalmol* 1996; 121: 19-25

**Sparkes RS, Heinzmann C, Goldflam S, Kojis T, Saari JC, Mohandas T, Klisak I, Bateman JB, Crabb JW.** Assignment of the gene (RLBP1) for cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) to human chromosome 15q26 and mouse chromosome 7. *Genomics* 1992; 12 (1): 58-62

**Stecher H, Gelb MH, Saari JC, Palczewski K.** Preferential release of 11-cis-retinol from retinal pigment epithelial cells in the presence of cellular retinaldehyde-binding protein. *J Biol Chem* 1999; 274 (13):8577-85

**Stryer L.** Visual excitation and recovery. *J Biol Chem* 1991; 266: 10711-14

**T**

**Tao L, Shen D, Pandey S, Hao W, Rich KA, Fong HKW.** Structure and developmental expression of the mouse RGR opsin gene. *Mol Vis* 1998; 4: 25

**Tepass U.** Adherents junctions: new insight into assembly, modulation and function. *Bioessays* 2001; 24: 690-5

**Tepass U, Tanentzapf G, Ward R, Fehon R.** Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 2001; 35: 747-84

**Tepass U, Theres C, Knust E.** Crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell*. 1990; 61(5): 787-99

**Thompson DA, Li Y, McHenry CL, Carlson TJ, Ding X, Sieving PA, Apfelstedt-Sylla E, Gal A** Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* 2001; 28: 123-4

**Thompson DA, McHenry CL, Li Y, Richards JE, Othman MI, Schwinger E, Vollrath D, Jacobson SG, Gal A.** Retinal dystrophy due to paternal isodisomy for chromosome 1 or chromosome 2, with homoallelism for mutations in RPE65 or MERTK, respectively. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 224-9

**Travis GH.** Insights from a lost visual pigment. *Nat Genet*. 1997; 15: 115-7

**Trudeau MC, Zagotta WN.** Mechanism of calcium / calmodulin inhibition of rod cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8424-29

**Tsang SH, Gouras P, Yamashita CK, Kjeldbye H, Fisher J, Farber DB, Goff SP.** Retinal degeneration in mice lacking the gamma subunit of the rod cGMP phosphodiesterase. *Science* 1996; 272: 1026-9

**Tsang GH, Yamashita CK, Lee WH, Lin CS, Goff SP, Gouras P, Farber DB.** The positive role of the carboxyl terminus of the gamma subunit of retinal cGMP-phosphodiesterase in maintaining phosphodiesterase activity in vivo. *Vision Res* 2002; 42: 439-45

**Tsilou ET, Rubin BI, Caruso RC, Reed GF, Pikus A, Hejtmancik JF, Iwata F, Redman JB, Kaiser-Kupfer MI.** Usher syndrome clinical types I and II: Could ocular symptoms and signs differentiate between the two types?. *Acta Ophthalmol Scand* 2002; 80: 196-201

**Tuson M, Marfany G, González-Duarte R.** Mutation of CERKL, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26). *Am J Hum Genet* 2004; 74: 128-38

## V

**Valverde D, Baiget M, Seminago R, del Rio E, Garcia Sandoval B, del Rio T, Bayés M, Balcells S, Martínez A, Grinberg D, Ayuso C.** Identification of a novel R552Q mutation in exon 13 of the beta-subunit of rod phosphodiesterase gene in a Spanish family with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* 1996a; 8: 393-394

**Valverde D, Solans T, Grinberg D, Balcells S, Vilageliu LI, Bayés M, Chivelet P, Besmond C, Goossens M, Gonzalez-Duarte R, Baiget M.** A novel mutation in exon 17 of the beta-subunit of rod phosphodiesterase in two RP sisters of a consanguineous family. *Human Genet* 1996b; 97: 35-38

**van den Born LI, van Soest S, van Schooneveld MJ, Riemsdag FC, de Jong PT, Bleeker-Wagemakers EM.** Autosomal recessive retinitis pigmentosa with preserved para-arteriolar retinal pigment epithelium. *Am J Ophthalmol* 1994; 118: 430-9

**van Soest S, Van den Born LI, Gal A, Farrar GJ, Bleeker-Wagemakers LM, Westerveld A, Humphries P, Sandkuijl LA, Bergen AAB.** Assignment of a gene for autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP12) to chromosome 1q31-q32.1 in an inbred and genetically heterogeneous disease population. *Genomics* 1994; 22 (3): 499-504

**van Soest S, Nijenhuis ST, van den Born LI, Bleeker-Wagemakers EM, Sharp E, Sandkuijl LA, Westerveld A, Bergen AA.** Fine mapping of the autosomal recessive retinitis pigmentosa locus (RP12) on chromosome 1q; exclusion of the phosphodiesterase gene (PDC). *Cytogenet Cell Genet* 1996; 73(1-2):81-5



**W**

**Warren R, Molday RS.** Regulation of the rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channel. *Adv Exp Med Biol* 2002; 514: 205-23

**Weitz D, Zoche M, Müller F, Beyermann M, Körschen HG, Kaupp UB, Koch KW.** Calmodulin controls the rod photoreceptor CNG channel through an unconventional binding site in the N-terminus of the  $\beta$ -subunit. *EMBO J* 1998; 17: 2273-84

**Weston MD, Eudy JD, Fujita S, Yao S-F, Usami S, Cremers C, Greenburg J, Ramesar R, Martini A, Moller C, Smith RJ, Sumegi J, Kimberling WJ.** Genomic structure and identification of novel mutations in Usherin, the gene responsible for Usher Syndrome Type IIa. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1199-210

**Winston A and Rando RR.** Regulation of isomerohydrolase activity in the visual cycle. *Biochemistry* 1998; 37: 2044-50

**Wodarz A, Grawe F, Knust E.** CRUMBS is involved in the control of apical protein targeting during *Drosophila* epithelial development. *Mech Dev* 1993; 44(2-3): 175-87

**Wodarz A, Hinz U, Engelbert M, Knust E.** Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* 1995 Jul 14;82(1):67-76

**Wright AF, Jay B.** The molecular genetics of inherited eye disorders (modern genetics). Martin Dunitz Ltd (Taylor and Francis group) eds. 1994

**Wright AF.** A searchlight through the fog. *Nat Genet* 1997; 17: 132-134

**Y**

**Yang RB, Foster DC, Garbers DL, Fulle HJ.** Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc Natl. Acad Sci. USA* 1995; 92: 602-6

**Yang RB, Garbers DL.** Two eye guanylyl cyclases are expressed in the same photoreceptor cells and form homomers in preference to heteromers. *J Biol Chem* 1997; 272:13738-42

**Yang M, Fong HKW.** Synthesis of the all-trans-retinal chromophore of retinal G protein-coupled receptor opsin in cultured pigment epithelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277 (5): 3318-24

**Yu H, Olshevskaya E, Duda T, Seno K, Hayashi F, Sharma RK, Dizhoor AM, Yamazaki A.** Activation of retinal guanylyl cyclase-1 by  $Ca^{2+}$ -binding proteins involves its dimerization. *J Biol Chem* 1999; 274 (22); 15547-55

## **Z**

**Zhao X, Huang J, Khani SC, Palczewski K.** Molecular forms of human rhodopsin kinase (GRK1). *J Biol Chem* 1998; 273(9): 5124-31

**Zhong H, Lai J, Yau KW.** Selective heteromeric assembly of cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5509-13