



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Departament de Genètica
Facultat de Biologia
UNIVERSITAT DE BARCELONA

**Anàlisi genètica i molecular de distròfies retinianes
autosòmiques recessives**

Eva Paloma Aparici

2002

Anàlisi genètica i molecular de distròfies retinianes autosòmiques recessives

Memòria presentada per

Eva Paloma Aparici

per optar al grau de

Doctor en Ciències Biològiques

Tesi realitzada sota la direcció de
la Dra. Roser González-Duarte i de la Dra. Susana Balcells i Comas
al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona
Programa de Genètica (Bienni 1997-1999)

Roser González-Duarte

Susana Balcells

Eva Paloma

Barcelona, Març de 2002

*Als meus pares,
perquè sense ells aquesta aventura no hagués tingut inici.*

AGRAÏMENTS

Aquest capítol és un dels més difícils de redactar de tota la tesi. Són molts anys, mesos, dies, hores de vivències compartides amb tots vosaltres, que m'han fet entendre que aquest projecte no s'hagués fet realitat sense tenir-vos al costat.

De fet no vull començar sense recordar qui ha estat la persona que, als meus divuit anys, va fer que la meua vida s'orientés cap a la Biologia. Ella es diu Jeanette, i realment el seu particular entusiasme em va obrir les portes a un món fins llavors desconegut. Després d'aquest moment, per mi memorable, n'hi ha hagut molts més, és clar que sí, i és aquí on tots vosaltres hi heu pres part en més o menys mesura.

Primer de tot he d'agrair al Fundaluce per haver estat una font de subvenció necessària per poder dur a terme aquest treball. I a la Generalitat de Catalunya per haver-me concedit una beca de formació d'investigadors durant 4 anys.

També a les famílies i pacients afectats de retinitis pigmentosa, Stargardt, fundus flavimaculatus, distròfia de cons i bastons, distròfia en patró de l'epiteli pigmentari de la retina, i degeneració macular associada a l'edat per haver col.laborat en aquest projecte. Sense vosaltres aquestes ratlles no haurien pogut ser escrites. Gràcies a tots.

Vull donar les gràcies a les meves companyes d'Humana, perquè a més de companyes, heu estat una part molt important de la meua tesi. A les "reines": Olga, mai no he vist ningú tan disposat a ajudar pel que sigui sense esperar res a canvi, he après molt de tu, i realment per mi ets com una germana. Gràcies pels esmorzars d'integralet on ens confessàvem i on disfrutàvem dels moments previs a la feina; Kika, la Kikatona, persona més endreçada em sembla que no l'he vist mai, només em sap greu haver-te vist patir tant i haver-te pogut ajudar tan poc, però a hores d'ara et desitjo el millor per Ses Illes, que de segur que serà tal com tu ho somniaves i tal com totes esperem que sigui; Natàlia, l'alegria del departament, una romàntica que es dóna de progrè. M'has arrencat més d'un cop un somriure intern quan et deia "ara no Natàlia, estic concentrada!! En el fons em sabia greu tallar-te el rotllo aventurer, però és que a tota hora en tenies una per explicar, i en algun moment havíem de treballar, no?"; Anna, l'ampostina que amb el seu "a vore" ha arreglat moltes coses, t'he vist mai enfadada? Moltes coses faran que no m'oblidi de tu, ah! I ho sento per haver frustrat la teua carrera artística, tú vales reina!; Magda, gràcies per respondre a les meves preguntes desesperades i per fer-me sentir que no estava sola amb això dels SSCPs. També, tot i que ja no compartim poiata, m'enrecordo de tu, Adriana, que de seguida vas ser una humana més i vas entendre les nostres inquietuds. La teua estada amb nosaltres va ser curta, però espero que la nostra amistat no ho sigui. A tu, Sara, que tantes vegades has hagut d'aguantar a l'Eva depre, a l'Eva amb ganes de xerrar, a l'Eva animada, a l'Eva...a totes les Evas que hi ha dintre meu i que en un moment o altre han aflorat i s'han trobat amb tu, gràcies per entendre'm i ser còmplice. A la Rebe, reina, que perfecta seria la vida si ens la deixessin organitzar a nosaltres, oi? Ella també és de la penya integralet i és en aquests esmorzars on realment ens hem anat coneixent més. Els teus moments d'eufòria són fantàstics, fes que hi siguin sovint. Et desitjo el millor, de tot cor. A la Neus, per ser tan jovial, per amoinar-se del què realment és important (o almenys fer-ho veure), per deixar-me el PC en moments de desesperació, per aguantar la meua figuració a l'amic invisible, perquè això és el que és, figuració... I tantes altres coses. Gràcies. A la Raquel, que tot i no haver-hi interaccionat molt, m'ha donat molt bon "feeling". També m'enrecordo molt i moltíssim de la persona que va haver d'aguantar que les mostres del SSCP correguessin en direcció oposada, que els gels d'agarosa fossin transparents, sense bandes ... i per la que sento una especial i carinyosa admiració, n'Amalia. A més de tot això, t'agraeixo que m'escoltis des de molt lluny. Seguir els teus passos m'ha ajudat molt. Al Marc, l'optimisme flotant del departament, res mai porta pressa, tot té el seu temps, i tot es farà igual o millor seguint l'ordre de les coses. Treballava molt i era eficient, dues coses que no acostumen a anar plegades en el laboratori. Per mi ha estat un "cotilla" divertidíssim, que sabia de tot i amb el que podies parlar de tot. M'enrecordo de moltes estones divertides i del dia que vas dir adéu, quan em vaig posar a plorar com una magdalena. A la Mònica i al Bru, perquè sempre van tenir una paraula amable amb mi i dels que vaig aprendre moltes coses, entre elles a muntar col.leccions de Hoffers, que semblaven un aparador de miralls. Especialment a la Mònica per respondre ràpidament i amable a les meves sol.licituds. A la Teresa, que vaig conèixer a l'escriptura de la seva tesi, i ja veus, ja t'he atrapat. Al Lars for sharing with me nice moments of happiness and others of deception, and for teach me in many ways in the lab. Thank you for making an

effort in order to understand my English!! I també de les noves generacions (i amb això no vull dir que em senti gran), tot i que alguns potser ja comencen a tenir antiguitat, oi Miquel? Primer em sabia greu no haver deixat la llavor de retinitis ben plantada, i entenia que els llevats et tinguessin el cor robat, però no saps pas la il·lusió que em fa saber que hi ha un hereu de les terres retiníiques (adaptat de Susana *et al*). Molta sort!, a la Roser, treballadora de cap a peus, al Raül, ei! Ara que jo no hi sóc ja us podeu marcar un duo amb l'Anna, eh?, a l'Anna Down, perquè ja ha començat, i només ha començat a veure què és fer una tesi, no t'amoïnis, aquesta és una cosa que porta el seu temps (comença a adonar-se de que l'esmorzar és necessari per entrar a treballar amb harmonia); a la Mariona, Eva, Elena, .. que disfruteu del període tesi, master, col.laboracions... tal com jo ho he fet. Al Dani junior, per haver-me ajudat en un període de la meva tesi. A la Silvína, a la Mari Carmen, una abraçada cap a l'altra costat de l'Atlàntic. Aprofito aquí per agrair a l'Eugènia els pocs però bons moments compartits. I a la Judith, per ella sento un carinyo especial. Als seniors de tota aquesta colla, a la Lluïsa, a la que admiro pel seu esperit muntanyenc i el seu treball tranquil i eficient; al Dani, per donar-me el vot de confiança a les meves primeres pràctiques d'humana, per compartir algun moment d'emoció i d'altres de decepció quan trucava a la porta del despatx, i per solucionar-me el dipòsit de tesi; a la Gemma, la seva font de dades i riquesa experimental m'han guiat en algun moment de la tesi. Per sobre d'això, gràcies per oferir-me la vostra part més humana.

Als Biotec team, perquè ara que ja són un grup consolidat ja els puc anomenar així. A la persona que ha començat a donar nom a aquesta línia, al Cañestro, al que he d'agrair tot i molt, tot el què m'ha donat i en abundància, ha estat un gran confident i amic, i ha sabut veure més enllà de les meves inquietuds amb una simple mirada. Tal com pots imaginar et trobaré a faltar moltíssim; a la Diana, reservada al principi, però només al principi, ja s'ha destapat i quant!!, seguint els passos del Cristian, creus que tindràs algun problema?; a la Laura, que de seguida ha entès què és fer una tesi amb esmorzars-integralet inclosos, de seguida t'has fet una "humana" més i les estones que hem compartit han donat molt de sí. Gràcies per escoltar-me quan parava un moment entre ratlla i ratlla, per subvencionar-me galetes per merendolar i per ser tan "maca"; al Jon, màster del univers, per les estones d'agobio que m'ha vist passar, per la paciència que ha tingut amb mi davant el G3 i la bona voluntat que té per ajudar a tothom. I finalment al Ricard, perquè l'admiro com a director, perquè ha conseguit un equip fantàstic i perquè tot això ho ha conseguit per ser com és.

Als metalos actuals, al Jordi i a la Laura, fabricadors i multiplicadors de proteïnes (sempre he admirat el vostre tipus de feina, i que bé que el porteu). Al Jordi, per aquest somriure optimista i ple d'energia que sempre té a peu de boca, no crec que hi hagi res que pugui amb ell. Gràcies per compartir "llargues" estones davant aquestes caixes quadrades que em dona la impressió ens fan la vida més fàcil, però menys activa. També per subvencionar-me la presa de xocolata que permetia que la feina continués unes hores més. A la Laura, masteranda aprovada i tesinanda per aprobar, però de segur que ho aconseguiràs igual o més bé que al master. A la Sílvia, que a més de ser una autèntica socorredora d'ordinadors atabalats i impressores adormides, ha tingut la paciència d'aguantar escriptures d'articles en el seu reduït espai despatxal. Gràcies a tots tres.

Als Epis I, que actualment en són molts, tants que no els conec a tots. Al David, que tot i ser un Epi, m'ha deixat anar la seva part més Humana, i amb el que tot i la diferència de les nostres vides tinc la sensació que compartim part dels mateixos neguits. A la Carol, et desitjo molta sort i gràcies per solidaritzar-te amb mi amb la tesi: dates de dipòsit, ordre de les coses, poc apoc i bona lletra... A l'Anna Rosanes, Mol o Epi, aquesta no és la qüestió, la veritat és que estiguis on estiguis et desitjo molta sort. A la Maria, que tot i ser novella (potser no tan novella), el seu encant de seguida va fer que hi conectés. Al Josep, al Jordi T, a l'Estela que tot i que ja no estan en persona en el departament, el seu esperit hi continua sent. A l'altre Eva del depar, la Jiménez, quants cops ens han confós al telèfon? Ànims que tot s'acaba!! Al Dave i a la Mette, thank you for sharing with me nice moments in the lab. I wish you the best. Al Javi, per els bons dies plens d'optimisme, a la Cristina, al Josep, a l'Èlia, a l'Elisa, l'Elena i a tots els que venen darrera vostre que ja no m'ha donat temps de conèixer. Als directors de les dues línies, al Jordi, i a l'Emili, al què admiro (sense que ell ho sàpiga) per les seves ganes de fer muntanya i d'estar en forma i per la seva pulcritud experimental.

Als Epi II, al Salvi amb el qui vaig realitzar les primeres pràctiques de molecular i ho he de dir, em va ensenyar que més que l'experiment en sí, el què s'ha d'ensenyar als alumnes és la manera de treballar al laboratori. Van ser molt divertides. Al Gonzalo, l'admiro per tenir clar el que volia a la vida, i així ho ha aconseguit. Al Francesc, sempre tenia paraules amables quan li demanaves alguna cosa. A l'Iñaki, la seva cordial simpatia de seguida el va fer característicament estimat, i l'entenc perfectament en les qüestions del fum. A la Susana, a la Mercè, al Víctor, al Jordi, a la Juani, a l'Albert, al Miquel...no sé si em deixo a algú, molta sort en el que us queda de tesi i altres coses. Als seus directors, David i Rafa, i Marta i Jaume.

Als Epi III (i ja no en queda cap més), a la Berta pel seu bon humor característic que generava positivitat; a la Montse, només em sap greu veure que hi ha gent que pateix tant quan les coses poden ser sempre més fàcils; a la Martona, ella sí que s'ha convertit en una Humana més, m'agradaria tenir part de la teva energia, que sembla que porti piles alcalines, no s'esgota mai!!; al John, al Manel i al Jordi us desitjo el millor; al Sergi, per compartir amb mi l'època de l'edifici nou i per socórrer-me amb el CD perdut; a les noves generacions: Mireia... Als seus directors, a la Montse i al Florenci.

Als Evo, a l'Eli, a la Marta Pasqual per deixar-se convèncer fàcilment amb el kit de seqüenciació i per demostrar tan obertament la seva satisfacció per ser titi; al Jaume Balanyà, al Francesc Mestres, al Lluís per ser un mestre exemplar i per fer-nos pensar més enllà de les coses evidents.

I també als que ja estan fora i amb els que vaig compartir algunes estones a l'inici de la meva tesi: al David, les seves retransmissions des de l'estranger ens han fet riure més d'una estona; a l'Agustí i a l'Aurea, a l'Anna, a l'Amaya, al Sebas amb el qui he compartit també estones a l'edifici nou, a l'Umberto, a l'Úrsula, a la Gema i a totes les noves generacions per mi desconegudes. Molta sort a tots. Als seus directors: al Julio, a les Montses, a la Carme i a l'Elvira.

Als secres i a les secres, que sense ells i elles la burocràcia es faria una muntanya, gràcies a tots: Isabel, Xavi, Sergi, Núria, i Irene.

A la Mari, ai la Mari, sense ella molts dels nostres experiments es realitzarien en setmanes, mesos, i no en dies com ha estat. Gràcies per tants favors d'última hora, i per donar-nos tans i bons consells, però a més, per preocupar-te per nosaltres amb el teu gran instint maternal. També a l'Anna, una altra font de subvenció de material. I a l'Amparo.

A la Sra. Ramona, per aguantar de bon matí les meves trepitjades a la zona mullada, i per intentar entendre que els que venim d'hora, venim a fer feina.

Aprofito aquí per agrair a les persones que han ajudat a que la feina funcionés: al Ramon, a l'Anna i a l'Amaya, els vull demanar perdó per tenir que aguantar la meva pressió en el tema seqüències i a l'hora gràcies per atendre'm amb tant bon humor; a la Imma Rafèques, per vetllar per la nostra seguretat al "profund" laboratori de radioactivitat. També a la Rosa Coco per respondre als meus interrogants sobre oftalmologia, i fer que la relació clínica-genètica funcioni.

Als meus companys de carrera, alguns de vosaltres ja m'heu avançat amb això de la lectura, d'altres anireu al meu darrera i d'altres us heu espavilat per fer front al què la vida ens depara fora de l'edifici on hem compartit tantes estones. Per tots tinc un record en aquests moments: a la Núria i al Ramon, a l'Esther, a la Feli, a la Sandra, a la Itzi, al Ferran, al Toni, al Pol, a la Mònica i a la Pili.

A la Gemma, una cirurgiana excepcional, però per sobre de tot la meva amiga.

Al Miquel i a la Claudia, per estar aprop meu durant tot aquest temps.

A la M^aDolors perquè el seu constant afecte i interès, m'han acompanyat durant tota la tesi. A l'Alfredo i al Pedro, per intentar saber de mi, i oferir-me la seva amistat. Al Jacint, per rebre'm amb un somriure, per dedicar-me part del seu valuós temps i per solucinar-me algun dels problemes d'última hora. Moltíssimes gràcies.

A les parelles de les Humanes: Gabri, Carlos, Jaume, Pau, Gerard....perquè les estimen i cuiden molt.

A tota la família Tarrida-Castellana, al Magí, la Providència, la Sandra i el Juan Ramon, el Jesús, l'Ivan i el Guillem. Per saber entendre que els dissabtes a la tarda era hora d'estudi i per preocupar-vos de la meua vida "científica".

A la família Paloma-Aparici, als meus pares, Josep i Quima, perquè sempre han volgut que els seus fills arribessin lluny i així ho han aconseguit. Sempre heu respectat les meves decisions, tot i que no ho veiéssiu igual que jo, gràcies pel vot de confiança i per ser al meu costat quan us he necessitat; al meu germà Josep i a la Núria, gràcies per escoltar-me i deixar-me desfogar; als meus avis Ramon i Maria, i Josep i Liduvina. Als meus tiets i cosins: Joan i Montserrat, Montse, Joan i Montse, Jordi i Marta, Josep Ramon i Eli.

A la persona que ha viscut aquesta tesi en silenci, des de la Llunyania, que m'ha guiat en moments baixos, que ha compartit amb mi moments d'emoció, que m'ha ensenyat moltes coses d'aquesta vida que ens envolta, que passa volant i de la que hem de treure el màxim suc possible. A la gran persona amb la que comparteixo moltes il·lusions. A tú JosepM^a. Vull agrair-te de tot cor que hagis entès les meves decisions.

Finalment encara em queda agrair, i amb molta energia, a les dues persones que m'han dirigit dins aquest món de l'investigació. Elles són la Roser i la Susana i sense elles avui no estaria escrivint aquestes ratlles.

A la Roser, perquè sempre ha vetllat perquè no em faltés de res i perquè les seves classes d'enginyeria genètica avançada eren fora de sèrie i van alimentar les meves ganes d'entrar a fer el doctorat. Gràcies per donar-me la oportunitat de treballar amb tu, d'haver-me valorat des d'un principi, d'haver-me deixat aprendre tant (i no només de Biologia) i finalment, de poder arribar a aquest moment amb la il·lusió que he arribat.

A la Susana, per haver "suportat" tants toc-tocs a la seva porta, i en més d'un moment de caos haver sabut atendre'm amb un somriure a la cara. Per les estones compartides davant el seu ordinador, per ser una de les meves instigadores a l'aprenentatge dels que considero avui dia companys de treball, els ordinadors, i per sobre de tot, aguantar la meua tossudesia i algun dia de mal humor, que com tots sabem, existeixen de tant en quant.

Gràcies a les dues per ser com sou.

*No vemos la Naturaleza con nuestros ojos
sinó con la comprensión de nuestros corazones.*

William Hazlitt

• <u>ABREVIATURES</u>	1
• <u>INTRODUCCIÓ</u>	3
1. LA RETINA: TEIXIT CLAU EN LA VISIÓ	3
1.1. Fisiologia de l'ull i la retina	3
1.2. Fotoreceptors	5
1.2.1. Bastons i cons	5
1.2.2. Components proteics dels fotoreceptors	6
1.2.3. Renovació cel.lular en el segment extern del fotoreceptor	7
1.2.4. Dany fotooxidatiu i efecte dels retinoids en el segment extern dels fotoreceptors	7
1.3. Transducció del senyal lluminós, retorn a l'estat de foscor i cicle visual	8
1.3.1. Transducció del senyal lluminós i retorn a l'estat de foscor	8
1.3.2. El cicle visual	9
1.3.3. Valoració de la cascada d'amplificació del senyal lluminós	10
1.3.4. Alteracions en els components del procés de fototransducció	11
2. BASES CLÍNQUES I GENÈTIQUES DE LES DEGENERACIONS RETINIANES	11
2.1. Distròfies d'afectació macular	12
2.1.1. Malaltia de Stargardt i Fundus flavimaculatus	12
2.1.1.1. Una o dues entitats clíniques i genètiques?	15
2.1.2. Degeneració macular associada a l'edat	16
2.1.3. Altres distròfies maculars	18
2.1.3.1. Distròfia de cons i bastons	18
2.1.3.2. Gens i loci responsables d'altres distròfies maculars	19
2.2. Distròfies d'afectació perifèrica	20
2.2.1. Retinitis pigmentosa	21
2.2.2. Altres distròfies perifèriques	23
3. HETEROGENEÏTAT AL·LÈLICA I VARIABILITAT FENOTÍPICA	24
3.1. Heterogeneïtat al·lèlica en gens responsables de distròfies retinianes	24
3.1.1. Rodopsina	24
3.1.2. Periferina	25
3.2. El gen <i>ABCA4</i> com a responsable de la malaltia de Stargardt	26
3.2.1. Estructura del gen i de la proteïna ABCR	26
3.2.2. Localització	29
3.2.3. Funció	29
3.2.3.1. ABCR, A2E i patologia	30
3.2.4. Mutacions que causen STGD/FFM	31
3.2.4.1. Altres gens i loci implicats en la malaltia d'STGD/FFM	32
3.3. Variants d'<i>ABCA4</i> associades a d'altres distròfies retinianes	33
3.3.1. <i>ABCA4</i> i retinitis pigmentosa	33
3.3.2. <i>ABCA4</i> i distròfia de cons i bastons	34

3.3.3. <i>ABCA4</i> i susceptibilitat genètica a la DMAE	34
3.3.4. Model de correlacions genotip-fenotip per <i>ABCA4</i>	35
4. HETEROGENEÏTAT GENÈTICA I UNIFORMITAT CLÍNICA	36
4.1. Gens i loci responsables de la RP	36
4.1.1. Estratègies per a la identificació de nous gens i loci	36
4.1.2. Classificació dels gens i loci responsables de la RP	37
4.1.3. Estratègies per la cerca de mutacions	40
4.2. Anàlisi de gens i loci responsables d'arRP	40
4.2.1. Antecedents	40
4.2.2. Gens candidats i loci analitzats en 52 famílies espanyoles	41
4.2.3. Gens i loci analitzats en aquest treball	41
4.2.3.1. <i>TULP1</i>	41
4.2.3.2. <i>CNGA1</i>	43
4.2.3.3. <i>RPGRIP1</i>	43
4.2.3.4. <i>MERTK</i>	45
4.2.3.5. <i>RPE65</i>	46
4.2.3.6. El locus <i>RP25</i>	46
5. MODELS ANIMALS	47
5.1. <i>Drosophila</i> com a organisme model	47
5.2. Models animals vertebrats	47
5.2.1. Models animals naturals	48
5.2.2. Models trangènics	49
6. ESTRATÈGIES TERAPEÛTIQUES	49
6.1. Tractaments farmacològics, transplants cel·lulars i altres	49
6.2. Teràpia gènica	51
7. EL DIA A DIA DELS PACIENTS AMB DISTRÒFIA DE RETINA: COM HI VEUEN I QUÈ PODEN FER PER FER FRONT A LA PÈRDUA PROGRESSIVA DE LA VISIÓ	52
7.1. Com hi veuen	52
7.2. Què poden fer	52
• <u>OBJECTIUS</u>	53
• <u>RESULTATS</u>	55
CAPÍTOL 1: Heterogeneïtat al·lèlica	57
1.1. Anàlisi del gen <i>ABCA4</i> en un grup de famílies i pacients espanyols afectats de diferents distròfies de la retina	57
1.1.1. <i>ABCA4</i> i la retinitis pigmentosa	57

• <i>Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargard disease gene ABCR</i> . 1998. <i>Nature Genetics</i> 18: 11-12.	
1.1.2. ABCA4 i les distròfies maculars	61
• <i>Spectrum of ABCA4 (ABCR) gene mutations in Spanish patients with autosomal recessive macular dystrophies</i> . 2001. <i>Human Mutation</i> 17: 504-510.	
1.1.3. ABCA4 en famílies mixtes	71
• <i>Analysis of ABCA4 in mixed Spanish families segregating different retinal dystrophies; implication of this gene in a pattern dystrophy phenotype</i> (en revisió a <i>Human Genetics</i> , 2002).	
1.1.4. Altres resultats no publicats sobre l'anàlisi d'ABCA4	97
1.1.4.1. La família SP3	97
1.1.4.2. La família SZ5	98
1.1.4.3. Les famílies SZ6 i MC	100
1.1.4.4. La mutació L1940P	102
1.2. Col.laboracions en treballs multicèntrics	105
1.2.1. ABCA4 i la susceptibilitat a la degeneració macular associada a l'edat	105
• <i>Further evidence for an association of ABCR alleles with age-related macular degeneration</i> . 2000. <i>American Journal of Human Genetics</i> 67: 487-491.	
1.2.2. Origen de la variant 2588G->C d'ABCA4	113
• <i>The ABCA4 2588G>C Stargardt mutation: single origin and increasing carrier frequency from South-West to North-East Europe</i> (acceptat per publicació a <i>European Journal of Human Genetics</i> , 2002).	
CAPÍTOL 2: Heterogeneïtat genètica	139
2.1. Anàlisi de TULP1 (RP14) en el panell de famílies espanyoles afectades d'arRP	139
• <i>Novel mutations in the TULP1 gene causing autosomal recessive retinitis pigmentosa</i> 2000. <i>Investigative Ophthalmology and Visual Science</i> 41: 656-659.	
2.2. Anàlisi del gen CNGA1 en el mateix panell de famílies arRP	145
• <i>Novel homozygous mutation in the alpha subunit of the rod cGMP-gated channel (CNGA1) in two Spanish sibs affected of autosomal recessive Retinitis pigmentosa</i> (sotmès a <i>Journal of Medical Genetics</i> , 2002).	
2.3. Resultats no publicats sobre l'anàlisi d'altres gens i loci	165
2.3.1. Anàlisi dels gens i loci RPE65, RP25, MERTK i NRL/RPGRIP1	165
2.3.2. Cerca de mutacions en el gen RPGRIP1	176
2.3.3. ABCA4 i altres gens RP en la família M-280	178

2.3.4. <i>ROM-1</i> i altres gens RP en la família V-8	182
2.3.5. Resum de l'anàlisi de gens i loci d'arRP en el panell de famílies espanyoles	183
• <u>DISCUSSIÓ</u>	185
DISCUSSIÓ DELS RESULTATS OBTINGUTS EN AQUEST TREBALL	
1. La complexitat d'<i>ABCA4</i>	185
1.1. <i>ABCA4</i> : un nou gen responsable del fenotip arRP.	185
1.2. Un gen clau per a les distròfies de la retina?	186
1.3. La base genètica de la malaltia de STGD	186
1.4. Variants al·lèliques d' <i>ABCA4</i> en les distròfies maculars: patogenicitat.	186
1.5. Eficiència en la detecció de variants patogèniques en els individus STGD.	188
1.6. Ampliació del model de correlacions genotip-fenotip: la família L-H.	190
1.7. <i>ABCA4</i> : susceptibilitat genètica a la DMAE?	191
1.8. Origen de les mutacions 2588G->C i L1940P en el gen <i>ABCA4</i> .	192
1.9. La família SZ5.	193
2. Gens assajats en l'estudi de les bases genètiques de l'arRP	194
2.1. <i>TULP1</i> : la família M-141	194
2.2. <i>CNGA1</i> : les famílies M-68 i M-71	195
2.3. El gen <i>RPGRIP1</i>	196
2.4. La família M-280	197
2.5. La família V-8	198
2.6. Els gens i loci <i>RPE65</i> , <i>RP25</i> i <i>MERTK</i> en l'arRP espanyola	199
2.7. Resum global de l'estudi de gens i loci en la línia d'investigació de les bases genètiques i moleculars de l'arRP espanyola	200
2.8. Famílies arRP per explicar	204
3. DISCUSSIÓ GENERAL	204
3.1. Limitacions clíniques	204
3.2. Heterogeneïtat al·lèlica	205
3.3. Paper dels gens modificadors en la variabilitat fenotípica	206
3.4. Perspectives de futur	206
3.4.1. Noves perspectives de diagnòstic per a les patologies retinianes	206
3.4.2. Nous gens responsables de patologies retinianes	207
3.4.3. Futur en les estratègies terapèutiques	209
4. PREGUNTES OBERTES	210
• <u>CONCLUSIONS</u>	211
• <u>REFERÈNCIES DOCUMENTALS</u>	213

* Les estratègies metodològiques emprades en aquest treball estan àmpliament descrites en 2 capítols de llibre: 1) **González-Duarte R, Bayés M, Martínez-Mir A, Valverde D, Balcells S, Baiget M, Vilageliu L, Grinberg D** (1997) Strategies for the genetic analysis of autosomal recessive retinitis pigmentosa in Spanish families. En: *Degenerative Retinal Diseases*. Eds. LaVail et al. Plenum press, New York, pp 263-275.

2) **Martínez-Mir A, Paloma E, Balcells S, Vilageliu L, Pittler SJ, González-Duarte R** (1999) Genetic mapping and evaluation of PDE6A in 49 Spanish families with autosomal recessive Retinitis pigmentosa. En: *Retinal Degenerative Diseases and Experimental Theory*. Eds. Hollyfield et al. Plenum Publishers, New York, pp:201-213.

Ambdós han estat escrits pel grup en el que s'ha desenvolupat aquest treball. A més, les diferents estratègies estan degudament referenciades en cadascun dels articles.

• FIGURES

INTRODUCCIÓ

Figura 1. Esquema de l'ull

Figura 2. Diferents capes en la retina de vertebrats

Figura 3. Cèl.lula fotoreceptora tipus bastó

Figura 4. Localització de proteïnes involucrades en degeneracions retinianes

Figura 5. Fototransducció en vertebrats

Figura 6. Cicle visual

Figura 7. Disminució de l'agudes visual en un pacient afectat de malaltia de Stargardt

Figura 8. Angiografia de fluorescència en un pacient Stargardt

Figura 9. Fons d'ull d'un pacient afectat de *fundus flavimaculatus*

Figura 10. Fons d'ull d'un individu sa front un afecte de RP

Figura 11. Prevalença de la RP

Figura 12. Mapatge físic d'*ABCA4*

Figura 13. Dominis de la proteïna ABCR

Figura 14. Funció d'ABCR

Figura 15. Model de patogenicitat d'ABCR en els afectes de Stargardt

Figura 16. Model de correlacions genotip-fenotip associat a ABCR

Figura 17. Localització de *TULP1* al cromosoma 6

Figura 18. Esquema de la seqüència genòmica de *RPGRIP1*

Figura 19. Estructura gènica de *MERTK* i dominis proteics coneguts

Figura 20. Alteració de la visió en pacients afectats de distròfies retinianes

RESULTATS

Figura 1. Segregació de 3 variants d'*ABCA4* a la família SP3

Figura 2. Anàlisi de restricció de les variants G1961E i R212H

Figura 3. Haplotips per al locus *RP19* en la família SZ5

Figura 4. Anàlisi de cosegregació entre *STGD3* i *STGD4* i la patologia en la família SZ5

Figura 5. Anàlisi de cosegregació entre el locus *STGD1* i la patologia en les famílies SZ6 i MC

Figura 6. Valors consens de *splicing* per a seqüències acceptores de l'exó 10 d'*ABCA4*

Figura 7. Segregació de marcadors del cromosoma 1 i la variant L1940P en L-H, SZ1 i SZ2

Figura 8. *TULP1*: anàlisi de cosegregació i homozigositat en 8 famílies arRP

Figura 9. *CNGA1*: anàlisi de cosegregació i homozigositat en 47 famílies arRP

Figura 10. Segregació i detecció de la substitució R28Q a la família M-71

Figura 11. *RPE65*: anàlisi de cosegregació i homozigositat en el panell de famílies arRP

Figura 12. Anàlisi de cosegregació i homozigositat amb el locus *RP25*

Figura 13. Anàlisi de cosegregació i homozigositat amb *MERTK*

Figura 14. Anàlisi de cosegregació i homozigositat amb *NRL*

Figura 15. Haplotips per els marcadors de la regió *NRL-RPGRIP* en 4 famílies arRP

Figura 16. Segregació de la variant N1805D en la família M-280

Figura 17. Anàlisi de cosegregació i homozigositat en la família M-280

Figura 18. Anàlisi de cosegregació en la família V-8

DISCUSSIÓ

Figura 1. Variacions en la seqüència donadora de *splicing* de l'intró 10

Figura 2. Ampliació del model de correlacions genotip-fenotip d'*ABCA4*

Figura 3. Distribució geogràfica de variants d'*ABCA4*

Figura 4. Segregació d'una variant i de marcadors que la flanquegen en la família M-71

Figura 5. Mutacions descrites en la proteïna *CNGA1*

Figura 6. Resum de l'anàlisi de famílies arRP dins la línia d'investigació de la RP

Figura 7. Percentatge de casos arRP explicats front els no resolts

• TAULES

INTRODUCCIÓ

Taula 1. Gens descrits com a responsables de distròfies maculars

Taula 2. Loci implicats en algunes distròfies maculars

Taula 3. Distròfies que cursen amb afectació perifèrica de la retina

Taula 4. El gen *RPGRIP1*

Taula 5. Alguns gens ABC de procariotes i eucariotes

Taula 6. Loci responsables de RP en els que encara no s'ha descrit el gen

Taula 7. Gens responsables de la RP aïllada

RESULTATS

Taula 1. Microsatèl.lits utilitzats en les anàlisis de cosegregació i homozigositat

Taula 2. Oligonucleòtids utilitzats per l'amplificació dels exons de *RPGRIP1*

Taula 3. Variants nucleotídiques detectades en *RPGRIP1*

Taula 4. Resum de l'anàlisi de cosegregació i homozigositat en els gens analitzats

Taula 5. Resum de les variants patogèniques identificades en els gens analitzats

DISCUSSIÓ

Taula 1. Gens i loci analitzats en la família M-280

Taula 2. Resum dels resultats globals obtinguts en aquesta línia d'investigació

Taula 3. Resum de les variants patogèniques identificades en aquesta línia

ABCA4	<i>ATP Binding Cassette Retina specific gene</i>
ABCR	<i>ATP Binding Cassette Retina specific protein</i>
ADMD	<i>Autosomal Dominant Macular Dystrophy</i>
adRP	Retinitis Pigmentosa autosòmica dominant (<i>autosomal dominant Retinitis Pigmentosa</i>)
adSTGD	Malaltia de Stargardt autosòmica dominant
ApoE	Apolipoproteïna E
arCRD	Distròfia de Cons i Bastons autosòmica recessiva (<i>autosomal recessive Cone-Rod Dystrophy</i>)
arRP	Retinitis Pigmentosa autosòmica recessiva (<i>autosomal recessive Retinitis Pigmentosa</i>)
arSTGD	Malaltia de Stargardt autosòmica recessiva
CNCG	Canal depenent de cGMP (<i>Cyclic Nucleotide Gated Channel</i>)
CNGA1	Subunitat α del canal depenent de cGMP
CNGB1	Subunitat β del canal depenent de cGMP
CRALBP	<i>Retinaldehyde-Binding Protein 1</i>
CRBP	<i>Cellular Retinol-Binding Protein</i>
CRD	Distròfia de Cons i Bastons (<i>Cone-Rod dystrophy</i>)
DMAE (AMD)	Degeneració macular associada a l'edat (<i>Age-related Macular Degeneration</i>)
EOG	Electrooculograma
ERG	Electroretinograma
FFM	Fundus flavimaculatus
IRBP	<i>Interphotoreceptor Retinol Binding Protein</i>
LCA	Amaurosi congènita de Leber (<i>Leber Congenital Amaurosis</i>)
MERTK	Receptor de tirosina-kinases
mRNA	RNA missatger
NRL	<i>Neuronal Retina-specific Leucine zipper</i>
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDE	Fosfodiesterasa de GMPc (Phosphodiesterase)
PDEA	Subunitat α de la fosfodiesterasa del GMPc
PDEB	Subunitat β de la fosfodiesterasa del GMPc
PDEG	Subunitat γ de la fosfodiesterasa del GMPc
PE	Fosfatidil-etanolamines (Phosphatidil Ethanolamines)
RCS	<i>Royal College of Surgeons</i>
rd	Degeneració de la retina (<i>Retinal Degeneration</i>)
rds	Degeneració lenta de la retina (<i>Retinal Degeneration Slow</i>)
RHD	<i>RCC1 Homologous Domain</i>
RHO	Rodopsina
RHOK	Rodopsina kinasa
ROM-1	<i>Rod Outer segment Membrane protein 1</i>
RP	Retinitis Pigmentosa
RPE	Epiteli pigmentari de la retina (<i>Retinal Pigment Epithelium</i>)
RPE65	<i>Retinal Protein Epithelium Protein 65</i>
RPGR	Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator
RPGRIP	Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator Interacting Protein
SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
STGD	Malaltia de Stargardt
TULP	<i>Tubby-Like genes</i>
TULP1	<i>Tubby-Like Protein 1</i>
xLRP	Retinitis Pigmentosa lligada al cromosoma X (<i>X-Linked Retinitis Pigmentosa</i>)

1. LA RETINA: TEIXIT CLAU EN LA VISIÓ.

Per abordar l'estudi de patologies que condueixen a la ceguesa és necessari conèixer l'òrgan i els teixits implicats en el procés de la visió, així com l'entorn tant fisiològic com funcional en què es donen les alteracions. En aquest apartat es farà una breu descripció de l'ull, dels seus teixits i unitats cel.lulars, i dels processos fisiològics i bioquímics directament afectats en aquestes patologies. Aquests coneixements ens permetran entendre els defectes que condueixen als processos degeneratius i finalment, en molts casos, a la ceguesa.

1.1. FISIOLOGIA DE L'ULL I LA RETINA

L'ull és l'òrgan que ens permet la visió. Està format per un conjunt de teixits cadascun dels quals conté unitats cel.lulars especialitzades en una funció concreta.

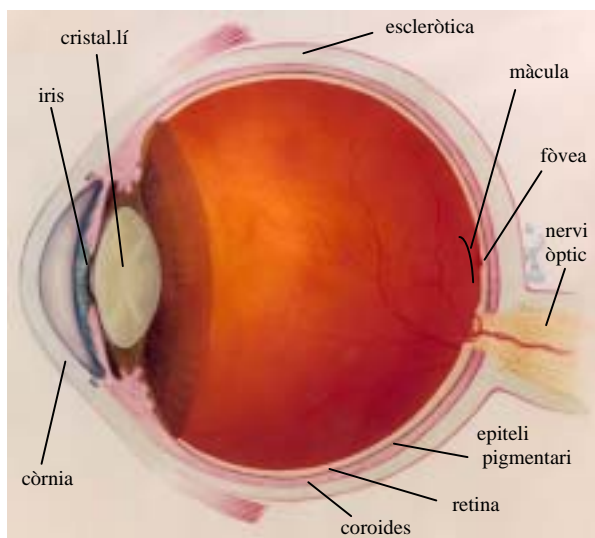


Figura 1. Esquema de les diferents parts de l'ull. La llum entra a través de la còrnia, creua l'iris cap el cristallí i d'aquí finalment arriba a la retina.

En una secció longitudinal, des de la part més externa a la més interna de l'ull hi podem distingir: la còrnia (membrana protectora), l'iris (membrana circular pigmentada i contràctil), el cristallí (lent biconvexa transparent destinada a fer convergir els raigs de llum formant imatges sobre la retina), la retina, la coroides (capa de cèl.lules que permet que els nutrients de la sang arribin a l'ull) i l'escleròtica (embolcall blanquinós inflexible que subjecta el globus ocular) (Lodish i col., 1995).

La retina està formada per diferents capes de cèl.lules, la funció de les quals consisteix en rebre el senyal lluminós i convertir-lo en impuls elèctric que serà enviat en forma de potencial d'acció al cervell a través del nervi òptic. S'hi distingeixen dues zones: una de gruixuda formada per diferents capes cel.lulars anomenada la retina neuronal i una de més prima formada per les cèl.lules de l'epiteli pigmentari.

La zona més externa del segment neuronal (Figura 2) conté milions de fotoreceptors, bastons i cons, altament fotosensibles. Estan especialitzats en l'absorció de fotons de llum a través dels seus fotopigments (opsines). Més cap a l'interior hi ha dues capes de cèl.lules neuronals, les neurones bipolars i les ganglionars, essent aquestes últimes les que estan en contacte amb les fibres del nervi òptic. Entre les cèl.lules neuronals hi ha altres cèl.lules de suport com són les cèl.lules de Müller (Guyton, 1988; Sun i Nathans, 2001).

L'epiteli pigmentari de la retina (RPE) està format per una monocapa cel.lular que es troba en contacte directe amb la retina neurosensorial mitjançant unes prolongacions membranoses a la regió apical. Les funcions d'aquest epiteli estan relacionades amb el manteniment de l'estructura i funcionament correcte dels fotoreceptors presents en la capa neurosensorial. S'encarrega de la fagocitosi i digestió dels fragments més externs dels fotoreceptors quan perden funcionalitat. A més, representa una barrera protectora entre la sang i la neuroretina. També participa en el reciclatge de components del procés de fototransducció (com l'11-cis-retinal) i, finalment, aquest teixit és el proveïdor de factors tròfics crítics per al manteniment dels fotoreceptors (Bessant i col., 2001). Conté grànuls de melanina, que absorbeixen la llum que passa a través dels fotoreceptors minimitzant, així, la pèrdua de qualitat de la imatge que es produiria per la incidència directa de la llum a l'ull (Sun i Nathans, 2001). La regió basal connecta amb la membrana de Bruch que facilita l'intercanvi de nutrients i gasos entre la retina i els vasos coroïdeus.

La fòvea és una zona petita de la retina central o màcula responsable de l'alta agudesa visual dels humans. El centre de la fòvea presenta un punt que és molt més prim quant a gruix de capes de cèl.lules, degut a un desplaçament d'algunes neurones internes de la retina cap a la perifèria. Per tant, la màcula humana està formada per una fòvea on hi dominen els cons i una parafòvea on hi dominen els bastons (Curcio i col., 1990; Eckert i col., 1990).

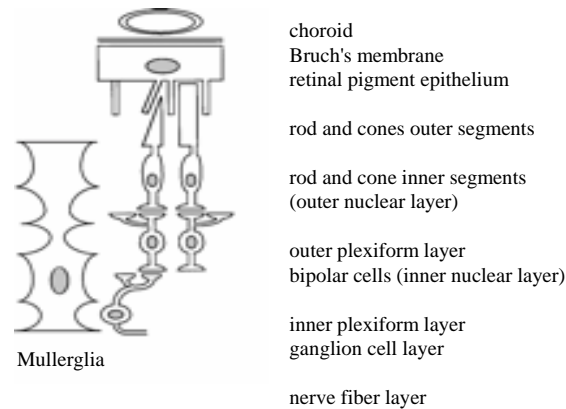


Figura 2. Esquema de la retina de vertebrats junt amb la coroides. Es mostren la majoria de tipus cel.lulars a excepció de les cèl.lules horitzontals i amacrines que processen la informació en la capa plexiforme externa i interna respectivament (Rattner i col., 1999).

1.2. FOTORECEPTORS

Els bastons i els cons són les cèl.lules especialitzades en la captació de l'energia lluminosa. En la retina humana els cons representen un 5% del volum total de fotoreceptors; mentre els bastons, el 95% restant (Rattner i col., 1999). Estan formats per dues parts diferenciades: un segment intern i un segment extern que està en íntim contacte amb les cèl.lules del RPE.

El segment intern és ple de mitocòndries, conté la maquinària necessària per a la síntesi proteica, un nucli i una terminació sinàptica per establir contacte amb altres cèl.lules neuronals. El segment extern està format per discs, que generen una extensa superfície que facilita que els fotons de llum puguin ser capturats pels fotopigments (opsines).

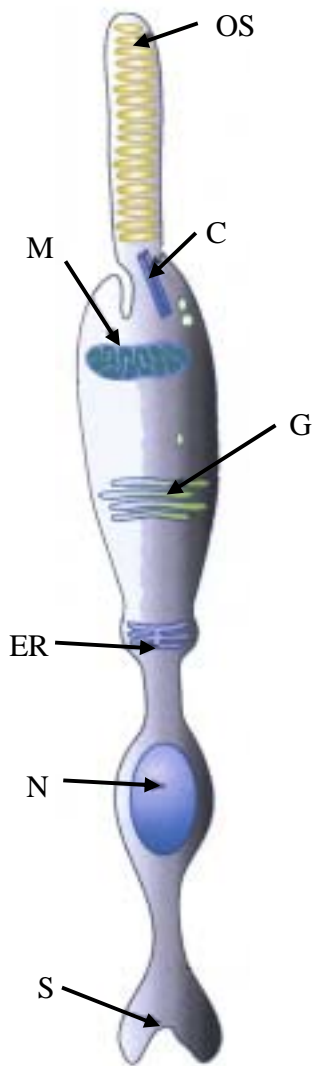


Figura 3. Imatge d'un fotoreceptor de tipus bastó. OS: segment extern del fotoreceptor; C:cili conector; M: mitocòndria; G: golgi; ER:reticle endoplasmàtic; N:nucli; S: regió de sinapsi (Chapple i col., 2001).

1.2.1. Bastons i cons

Ambdós tipus cel.lulars capturen els fotons de llum a través del pigment fotosensible situat en el segment extern. Morfològicament es diferencien per la distribució de membranes en el seu segment extern. Mentre en els bastons aquestes formen discs aplanats independents de la membrana plasmàtica, en els cons les membranes dels discs són contínues amb aquesta i estan obertes directament a l'exterior, el que òpticament es pot observar com un segment extern més curt. A nivell funcional, els bastons permeten veure en la foscor, ja que són sensibles a baixos estímuls de llum, i són responsables de la visió perifèrica, mentre els cons són necessaris per la visió en detall i del colors (Bloom i Fawcett, 1989). Ambdues cèl.lules capten llum lleugerament diferent de

l'espectre, per tant envien respostes elèctriques diferents cap al cervell, que aquest s'encarrega de rebre i convertir en una imatge.

El bastó ha estat considerat model d'estudi dels fotoreceptors en els processos de fototransducció per la seva grandària i la total compartimentació del segment extern, que faciliten una millor comprensió d'aquest processos. Es creu que el procés de fototransducció en els cons és semblant al dels bastons però moltes de les molècules que hi contribueixen són diferents en ambdós tipus cel·lulars (Gregory-Evans i Bhattacharya, 1998).

1.2.2. Components proteics dels fotoreceptors

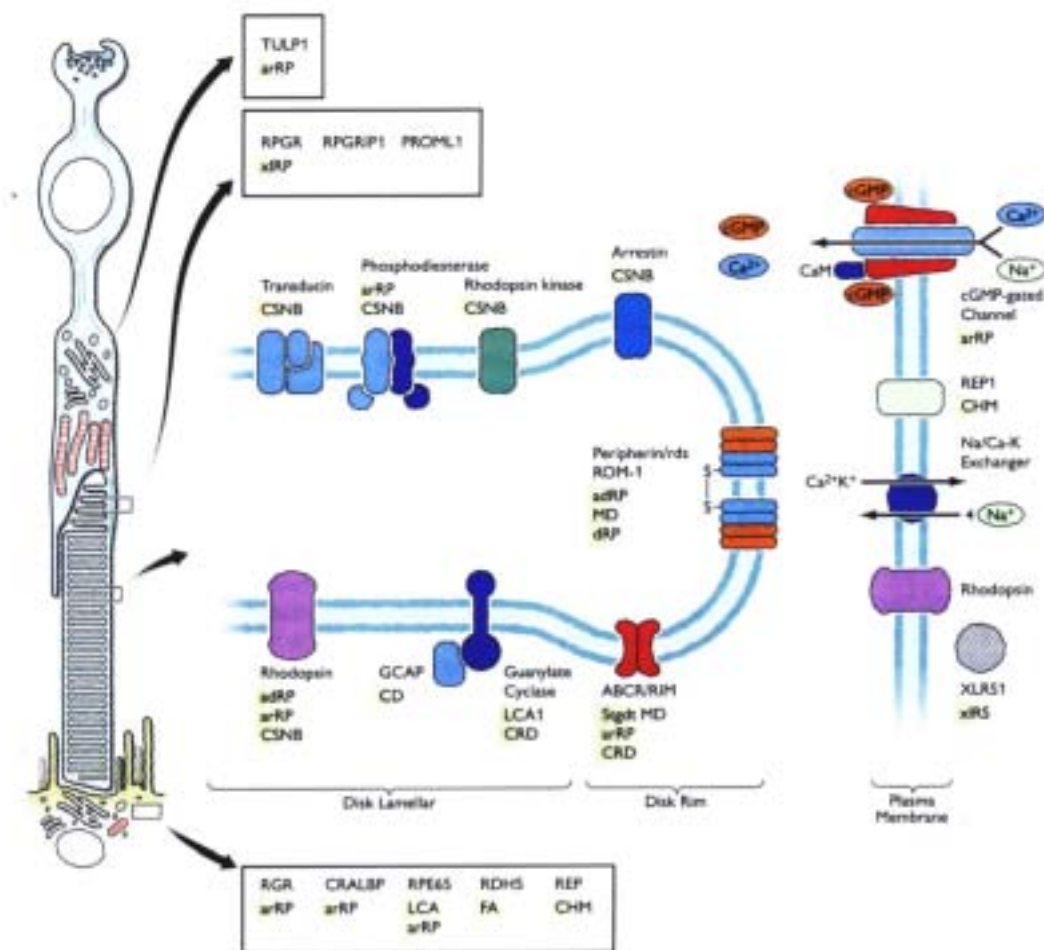


Figura 4. Localització d'algunes proteïnes involucrades en degeneracions retiniques en els fotoreceptors. Els noms de les malalties apareixen en groc. Abreviatures: adRP: Retinitis pigmentosa autosòmica dominant; arRP: Retinitis pigmentosa autosòmica recessiva; CSNB: ceguera nocturna estacionària congènita; CD: distròfia de cons; CRD: distròfia de cons i bastons; dRP: Retinitis pigmentosa digènica; FA: fundus albipunctatus; LCA: amaurosi congènita de Leber; MD: degeneració macular; Stgdt: malaltia de Stargardt; xRP: Retinitis pigmentosa lligada al cromosoma X (Pierce, 2001).

En les membranes dels discs del segment extern dels fotoreceptors abunden els pigments fotosensibles associats a molècules de rodopsina (RHO) i d'altres proteïnes involucrades en el procés de la fototransducció del senyal lluminós com les fosfodiesterases del cGMP (PDEs), la transducina, l'arrestina, la rodopsina quinasa i la guanilat ciclasa. Totes elles estan s'associen a la superfície plana del disc. Les proteïnes responsables del manteniment de les estructures membranoses, com ROM-1 i periferina/RDS, es localitzen a les vores dels discs formant complexos entre elles: un homodímer de periferina/RDS interacciona amb un homodímer de ROM-1 per formar tetràmers que estableixen la curvatura dels discs connectant-los amb el citoesquelet de la cèl.lula (Travis i col., 1991; Gregory-Evans i Bhattacharya, 1998). Molt a prop d'aquestes proteïnes estructurals es localitza ABCR, amb funció transportadora de retinoids (Sun i col., 1999). A la zona de connexió entre el segment extern i l'intern del fotoreceptor hi trobem un regulador de GTPases (RPGR), i que interacciona amb RPGRIP (Boylan i Wright, 2000; Roepman i col., 2000). En el segment intern del fotoreceptor hi ha TULP1, possible component de la maquinària cel.lular que dirigeix la rodopsina acabada de sintetitzar cap als segments externs (Boggon i col., 1999). Finalment, a la membrana plasmàtica del fotoreceptor hi ha proteïnes canal (*cGMP-gated channels*) o bombes d'intercanvi de ions (*Na/Ca-K exchanger*) (Pierce, 2001).

1.2.3. Renovació cel.lular en el segment extern del fotoreceptor

Els segments externs dels fotoreceptors es renoven contínuament. Els discs nous s'afegeixen per la base del segment extern i els discs vells es traslladen a la regió apical del fotoreceptor fins que són fagocitats i degradats per les cèl.lules del RPE (Alberts i col., 1989). Diàriament es renova un 10% del segment extern del fotoreceptor, la part que està més en contacte amb el RPE, i les proteïnes de membrana que es troben en aquest extrem tenen aproximadament 10 dies d'antiguitat. Cada cèl.lula del RPE està en contacte amb uns 50 segments externs de fotoreceptors i, per tant, fagocita l'equivalent d'uns 5 segments externs per dia (Sun i Nathans, 2001). Aquest alt recanvi garanteix l'eliminació de proteïnes i lípids que s'alteren degut als processos fotooxidatius. El processament erroni de proteïnes i lípids en el RPE genera l'acumulació de dipòsits de lipofuscina, observables en pacients afectats d'algunes distròfies maculars. La lipofuscina és un polímer complex i no degradable de residus lipídics i proteics derivat dels processos de peroxidació que es donen en l'interior de les vacuoles lisosomals del RPE. Amb el temps, aquest polímer es va acumulant i pot arribar a ocupar un 19% del citoplasma de les cèl.lules del RPE (Sundelin i Nilson, 2001).

1.2.4. Dany fotooxidatiu i efecte dels retinoids en el segment extern dels fotoreceptors

Paradoxalment, tot i que la llum és el mecanisme que ens permet posar en marxa els processos de fototransducció en l'ull, la quantitat i la qualitat de l'impuls lluminós pot produir alteracions en els fotoreceptors i el RPE. L'exposició a la llum del sol durant un llarg període de temps altera la funció visual i provoca una disminució de l'agudesesa visual i alteracions maculars. També s'ha observat una correlació positiva entre l'exposició a la llum i el desenvolupament de la degeneració macular associada a l'edat (DMAE), patologia freqüent en la tercera edat (Wang i col., 1997).

Els retinoids (derivats de la vitamina A) semblen jugar un paper important en les alteracions visuals derivades de l'excés de llum. D'una banda, el retinal actúa com el cromòfor de les opsines. A més a més, l'àcid retinoic regula la transcripció de diferents gens de la retina. L'absorció de la llum produeix radicals lliures d'oxigen i les proteïnes ABCR, ROM-1, i periferina/RDS són especialment susceptibles al dany oxidatiu. Això es pot veure agreujat per la presència de determinades variants genètiques d'aquestes proteïnes. La retina pot minimitzar el dany fotooxidatiu gràcies a la presència d'elevades concentracions d'antioxidants (com la zeaxantina i la luteïna) i d'enzims especialitzats (superòxid-dismutases i catalases) que absorbeixen eficaçment els radicals lliures. Les degeneracions de la retina provocades per l'exposició a altes dosis de llum són un model per estudiar els processos d'apoptosi, via final comú de la majoria de distròfies hereditàries de la retina. En molts pacients, l'exposició a la llum accelera el desenvolupament de la patologia retiniana (Mata i col., 2000).

1.3. TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL LLUMINÓS, RETORN A L'ESTAT DE FOSCOR I CICLE DE LA VISIÓ

1.3.1. Transducció del senyal lluminós i retorn a l'estat de foscor

La primera molècula que rep el fotó de llum és la RHO, formada per una part proteica (la opsina) unida covalentment a un cromòfor: l'11-cis-retinal. L'absorció del fotó produeix una fotoisomerització de 11-cis-retinal a tot-trans-retinal. Degut als canvis conformacionals, els llocs d'unió de la RHO a proteïnes G queden exposats, de manera que pot unir-se a la transducina (Figura 5). Cada molècula de RHO activada, alhora activarà centenars de molècules de transducina, produint-se una amplificació del senyal que és el primer pas de la cascada enzimàtica. En el citoplasma, la unitat α de la transducina activa una PDE de cGMP, de manera que s'hidrolitza cGMP. La conseqüent baixada en els nivells de cGMP dins el fotoreceptor provoca el tancament dels canals iònics de calci i sodi, i té lloc una hiperpolarització de la membrana (resposta elèctrica) i el lliurament del neurotransmissor glutamat

a les terminals sinàptiques. El final de la resposta a la llum es dona amb la inactivació de la RHO, de les transducines, i de les PDE. I per restablir els nivells de cGMP, s'activen les guanilat ciclastes específiques de la retina (Rando, 1990).

La desactivació de la RHO implica, d'una banda, la dissociació del tot-trans-retinal i, per l'altra, la fosforilació de l'opsina mitjançant una quinasa específica (RHOK). Posteriorment l'arrestina s'uneix a la RHO fosforilada i bloqueja el lloc d'unió de la transducina. D'altra banda, la transducina i la PDE, queden inhibides per la baixada dels nivells de GTP. Aquests processos es donen al mateix temps que la baixada de la concentració de calci dins el fotorceptor (Koutalos i Yau, 1996). El Ca^{++} actua com a missatger intern regulant la sensibilitat del mecanisme de transducció, l'activitat de les quinases específiques de RHO i les guanilat ciclastes, així com l'afinitat pel cGMP dels canals situats a les membranes dels segments externs (Polans i col., 1996; Fain i col., 2001).

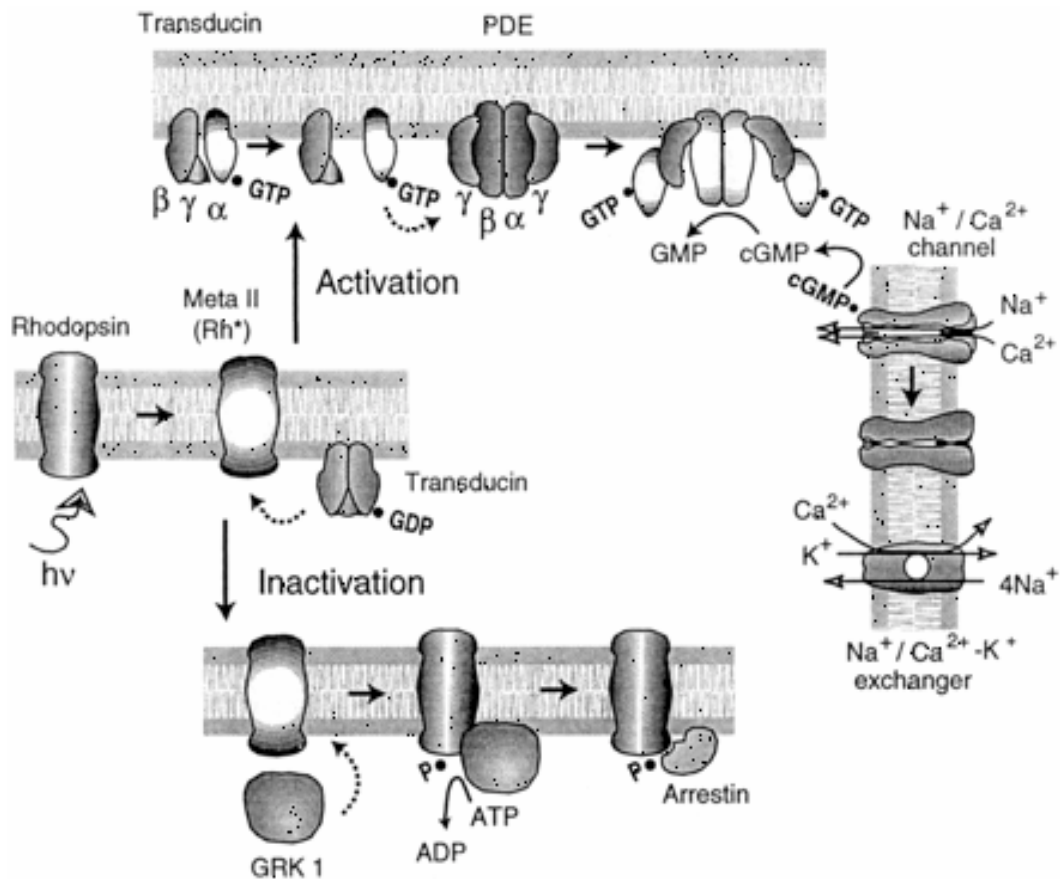
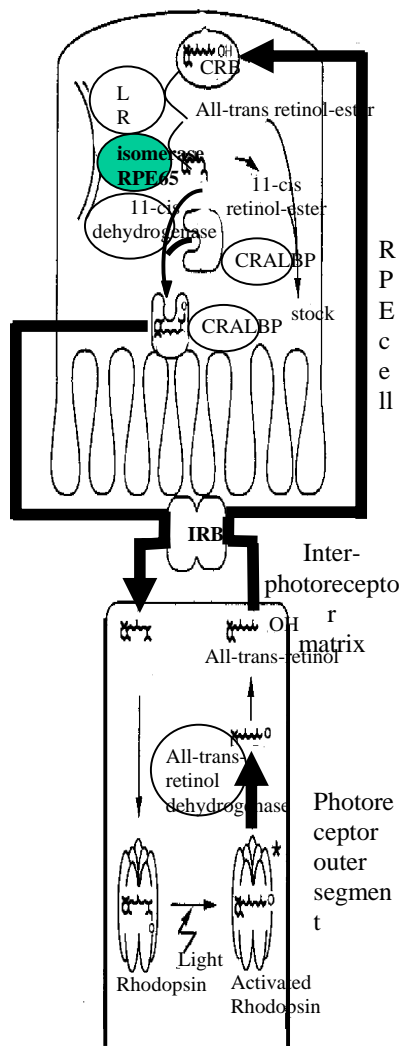


Figura 5. Mecanismes d'activació i inactivació del procés de fototransducció en els fotorceptors de vertebrats (Fain i col., 2001).

1.3.2. El cicle visual

El pigment fotosensible ha d'ésser reciclat per tal de poder absorbir un nou fotó. La part proteica (l'opsina) s'ha de defosforilar i a partir del tot-trans-retinal s'ha de regenerar l'11-cis-retinal, procés conegut com a cicle visual (Figura 6). El tot-trans-retinal alliberat de l'opsina és transportat a l'exterior dels discs mitjançant ABCR, transportador que es fosforila en resposta a la llum. Dins l'espai citoplasmàtic, el tot-trans-retinal és reduït a tot-trans-retinol, un dels passos limitants del cicle visual, per una deshidrogenasa associada a membrana i transportat al RPE, on serà isomeritzat a la configuració 11-cis, oxidat a retinal, i retornat al segment extern del fotorceptor. El retinol és una molècula molt poc soluble. Per aquesta raó, el transport entre fotorceptor i RPE requereix de la unió a



fosfatidiletanolamines i del transportador proteic, IRBP (*interphotoreceptor retinol binding protein*). Així mateix, dins el RPE existeixen transportadors específics pel retinol (CRBP) i pel retinal (CRALBP). La proteïna RPE65, situada al RPE, juga un paper important en aquest cicle, concretament en la isomerització del retinol. Això comporta l'acumulat de molècules de tot-trans-retinal. Una part petita d'aquest cromòfor reacciona amb les fosfatidiletanolamines de les membranes dels discs per formar A2E, un fluoròfor hidrofòbic, que posteriorment s'acumula en el RPE (Rando, 1990).

Figura 6. Reciclatge del tot-trans-retinal dins el cicle de la vitamina A (adaptat de Scriver,

1.3.3. Valoració de la cascada

d'amplificació del senyal lluminós

A partir d'un sol fotó de llum que incideix sobre una molècula de rodopsina es dona una ampliació en la cascada d'excitació per tres processos diferents: 1) una molècula de RHO fotoactivada activa moltes molècules de transducina; 2) l'activació d'una sola subunitat de la PDE genera la hidròlisi d'un nombre molt elevat de molècules de cGMP; i 3) la baixada dels nivells de cGMP provoca el tancament de molts canals a la membrana plasmàtica del fotoreceptor (Burns i Baylor, 2001).

Una molècula de RHO activada pot posar en funcionament un centenar de transducines, que alhora activaran al mateix nombre de PDEs, i que provocaran la hidròlisi de 10^{5-10} molècules de GMP. La baixada dels nivells de cGMP provoca el tancament de centenars de canals de membrana que al seu temps bloquegen el moviment de milions de ions, generant-se un senyal elèctric que serà transmès a través de diferents neurones cap a les fibres del nervi òptic, que el transportaran cap al cervell (Leskov i col., 2000; Burns i Baylor, 2001; Fain i col., 2001).

1.3.4. Alteracions en el procés de fototransducció

L'estratègia de *gene-targeting* permet delecionar, sobreexpressar o mutar gens per a proteïnes específiques i mimetitzar així alguns casos de patologies de la visió en humans (Burns i Baylor, 2001). *A priori*, es parteix de la hipòtesi que qualsevol alteració de les proteïnes de la cascada de transducció del senyal lluminós i del cicle visual, repercutirà en alteracions d'aquest procés i generarà la mort dels fotoreceptors (Shastry, 1997; Phelan i Bok, 2000). Les dades acumulades fins ara semblen recolzar aquesta hipòtesi.

Per exemple, una sobreexpressió de les opsines a la membrana dels discs indueix la degeneració dels fotoreceptors de manera similar a la mort cel.lular observada en models animals de retinitis pigmentosa i d'altres distròfies de la retina. En el ratolí, un increment d'un 23% més de molècules d'opsina indueix la mort dels fotoreceptors (Tan i col., 2001).

2. BASES CLÍNiques I GENÈTIQUES DE LES DEGENERACIONS RETINIANES.

Les distròfies de la retina inclouen una gran varietat de fenotips associats a la degeneració de les cèl.lules fotoreptores que han estat mapats a més de 120 loci al llarg del genoma humà (RetNet: Retinal Information Network, <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>). Actualment, tot i que s'ha fet un gran esforç en la determinació de les bases genètiques de les diferents distròfies, només han estat

identificats menys de la meitat dels gens responsables d'aquestes patologies. A més, les mutacions detectades en cadascun d'aquests gens expliquen fenotips concrets d'un grup molt reduït de pacients.

En aquest apartat es descriuran alguns d'aquests fenotips, que per facilitar la seva comprensió s'han dividit en dos blocs atenent a la regió de la retina inicialment afectada. Es parlarà de les bases clíniques que permeten el diagnòstic d'aquestes distròfies i finalment es comentaran les formes d'herència descrites en aquestes patologies.

2.1. DISTRÒFIES D'AFECTACIÓ MACULAR

Les degeneracions maculars són un grup heterogeni de patologies que tenen en comú la pèrdua progressiva de la visió central. Així, doncs, dins aquest grup s'inclouen les alteracions de la retina neuronal o del RPE que s'inicien amb defectes a la regió macular, tot i que la progressió de la malaltia comporti l'afectació generalitzada a tota la retina. El diagnòstic diferencial es pot fer tant per criteris morfològics (anomalies maculars visibles) com per criteris funcionals (baixada de l'agudesa visual) (Merin, 1991).

2.1.1. Malaltia de Stargardt i fundus flavimaculatus

La distròfia macular de Stargardt (STGD) i el fundus flavimaculatus (FFM) són exemples d'alteracions maculars de la retina.

Stargardt al 1909 va descriure per primera vegada aquesta distròfia macular en dues famílies independents, en les que l'inici dels símptomes era entre els 8 i els 16 anys. És una de les causes més freqüents de degeneració macular en infants i representa entre un 7% i un 10% de totes les distròfies retinianes que apareixen en aquestes edats (Kaplan i col., 1990). Actualment té una prevalença de 1:10.000 (Blackarski, 1988; Kaplan i col., 1990).

Els canvis afecten els dos ulls per igual i de forma simètrica. Es donen en ambdós sexes i s'hereten majoritàriament de forma autosòmica recessiva. També s'han descrit famílies amb patró d'herència dominant (veure apartat 3.2.4.1.). Les formes recessives i casos símplex (pedigrís on només hi trobem un individu afectat, també anomenats esporàdics) són els més freqüents. Aquesta patologia es presenta amb una penetrància de 95-97% (Anderson i col., 1995; Hoyng i col., 1996), i expressivitat variable en relació a la detecció de portadors sans i respecte l'edat de manifestació dels primers símptomes (Anderson i col., 1995; Hoyng i col., 1996; Yatsenko i col., 2001).

El primer símptoma d'aquesta distròfia juvenil és la pèrdua de l'agudesa visual, entre la primera i la segona dècada de vida. La imatge del fons d'ull en els pacients STGD mostra canvis de pigmentació cap a un color grogós, sovint en forma d'anell o cercle, deguts a la deposició anòmala

d'un material tipus lipofuscina o melanolipofuscina (Birnbach i col., 1994). Un altre aspecte morfològic característic del fons d'ull d'aquests pacients és una taca al centre de la màcula que rep el nom de reflex bronzejat (*beaten bronze*). Aquesta atròfia central es pot estendre en forma d'un nombre reduït d'espícules d'un color groc-taronjós distribuïdes al voltant de la màcula i/o la perifèria de la retina mitja. Sovint i amb el pas dels anys, el que comença amb un defecte a la regió central de l'ull acaba presentant diferents graus d'afectació perifèrica. La malaltia de STGD també implica una disfunció i atròfia progressiva del RPE, que es pot avaluar amb les proves funcionals que es descriuen a continuació.

El diagnòstic clínic de la malaltia de STGD es basa en diferents paràmetres oftalmològics i electrofisiològics. Com s'ha comentat, l'estudi del **fons d'ull** revela possibles alteracions patològiques.

En canvi, la pèrdua d'**agudesa visual** és el símptoma més important pel diagnòstic. Normalment es manifesta al mateix temps que es produeixen les anomalies maculars però fins i tot pot manifestar-se molt abans que aquests canvis es produeixin. En tot cas aquest símptoma és progressiu i imparable, de manera que en pocs anys el pacient esdevé quasi o totalment cec (Figura 7). S'analitza

mitjançant el test de la E de Snellen o variants d'aquest.

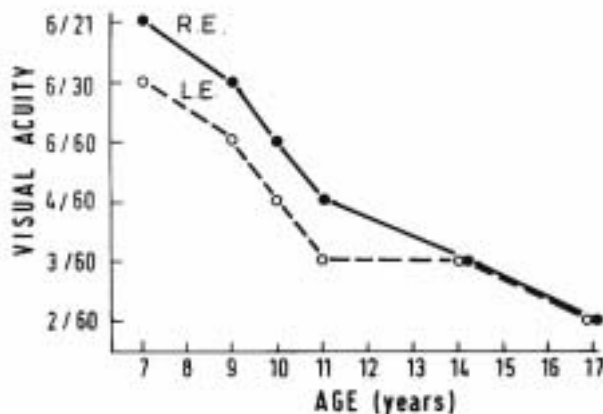


Figura 7. Baixada de l'agudesa visual dels dos ulls d'un pacient afecte de malaltia de Stargardt al llarg de temps (Merin, 1991). R.E.: right eye; L.E.: left eye

L'anàlisi del **camp visual** permet detectar la zona afectada de la retina. A més, la repetició d'aquesta prova en anys successius permet avaluar, junt amb la pèrdua d'agudesa visual, la progressió de la malaltia. Es realitza analitzant el perímetre de Goldman, que posa de manifest la presència d'escotomes (regions de la retina amb funció nul·la o gairebé nul·la). En els pacients amb STGD es detecta la presència d'un escotoma central en ambdós ulls que reflecteix la major pèrdua funcional dels cons (fotoreceptors més

abundants en la zona macular de la retina). Aquesta avaluació també permet detectar que la zona perifèrica d'aquest teixit, almenys durant els primers anys de la malaltia, es manté en bon estat.

Mitjançant les **electroretinografies o electroretinogrames** (ERGs) es mesura l'adaptació de la retina a la llum i a la foscor en forma de resposta elèctrica enfront estímuls de llum, de manera que permeten evaluar quin dels dos tipus cel·lulars de fotoreceptors es troba afectat. En les primeres fases de la malaltia els ERG són completament normals, però amb la progressió es posa de manifest un

retard en la resposta a la llum dels cons; i en estadis molt avançats, també es detecta una alteració de la resposta en condicions escotòpiques (adaptació a la foscor), fet que demostra que els bastons esdevenen lleugerament afectats (Fishman, 1976; Merin, 1991).

Els **electrooculogrames** (EOGs) són tests electrofisiològics que donen una mesura indirecta del potencial de repòs de la retina. En aquesta prova es calcula l'índex d'Arden (màxima resposta a la llum/mínima resposta en l'obscuritat), un coeficient també indicatiu de l'estat del RPE. No és una prova del tot conclouent ja que existeix molta variabilitat d'uns pacients a uns altres (Merin, 1991). Fishman (1976) va observar que l'EOG podia estar alterat en els estadis més tardans de la malaltia.

La **visió en color** es troba lleugerament alterada en els pacients amb STGD, el què indica l'afectació dels cons. L'alteració més freqüent és la tendència a la deuteranòpia (dificultat per distingir el color verd) (Merin, 1991).

L'**angiografia de fluorescència** és el test determinant pel diagnòstic de la malaltia de STGD. Consisteix en la injecció d'un component fluorescent al sistema circulatori sanguini. Amb aquesta prova podem detectar alteracions de la màcula, analitzar l'estat d'atròfia del RPE i observar l'estat dels vasos sanguinis de la retina. En els pacients STGD s'observa un centre d'hipofluorescència en la zona macular degut possiblement a la formació de dipòsits de pigment en les cèl.lules del RPE (Figura 8). Sovint, al voltant d'aquest centre s'hi troba un cercle d'hiperfluorescència que correspon a la zona d'atròfia total d'aquest epitel·li, i encara a la regió més perifèrica d'aquest cercle se'n pot distingir un altre d'hipofluorescent. Aquesta figura rep el nom d'ull de bou (*Bull's-eye phenomenon*). De fet, l'anell hiperfluorescent no és més que el teixit vascular de la coroides, que normalment no es veu, ja que queda darrera d'un RPE intacte.

El centre hipofluorescent ha rebut el nom de coroides silenciada (Bonnin, 1971) o coroides fosca (Fish i col., 1981). També es detecten algunes taques o espícules fluorescents, que amb el pas del temps difonen assenyalant l'atròfia definitiva d'aquest epitel·li. Gass (1987) va considerar que la presència de la coroides fosca o silenciada era un tret característic de la malaltia de STGD amb o sense presència d'espícules. Però posteriorment s'ha detectat que aquesta figura pot aparèixer en algunes famílies i no en altres.

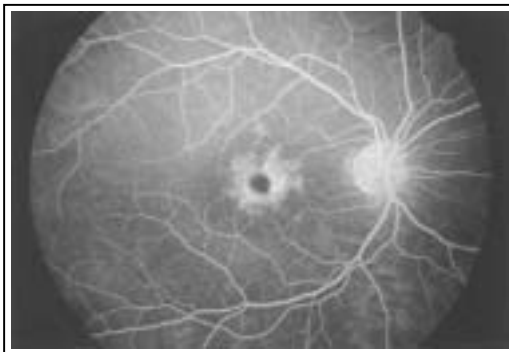


Figura 8. Angiografia de fluorescència d'un pacient STGD (Fishman i col., 1999).

L'any 1962, Franceschetti va introduir el terme fundus flavimaculatus per definir una alteració de la retina similar a la malaltia de STGD. En aquest cas el què observava era la presència de moltes espícules en el pol posterior del fons d'ull, espícules que també s'havien detectat en alguns casos de malaltia de STGD. Va considerar-la una entitat clínica diferent perquè les espícules no anaven acompanyades, en principi, d'una baixada ràpida i progressiva de l'agudesesa visual típica de STGD. Els pacients amb FFM són difícils de diagnosticar perquè inicialment no tenen símptomes de malaltia. L'agudesesa visual, la visió en color i els camps de visió no es troben alterats, i tampoc es donen alteracions funcionals a nivell de la regió macular ni perifèrica de la retina. De fet, només presenten aquests dipòsits de pigment en forma d'espícules que en un principi són unitats independents i que amb el pas del temps difonen assenyalant regions d'atròfia en el RPE i regions adjacents. Utilitzant l'angiografia de fluorescència es detecten aquestes zones d'atròfia i és en aquesta fase que els pacients comencen a presentar alteracions en la visió. Aquest fet fa que sovint la malaltia no es detecti fins que s'ha superat l'adolescència (Merin, 1991).

El FFM també presenta herència autosòmica recessiva, però com en la malaltia de STGD s'ha descrit algun cas amb herència dominant (López i col., 1992).

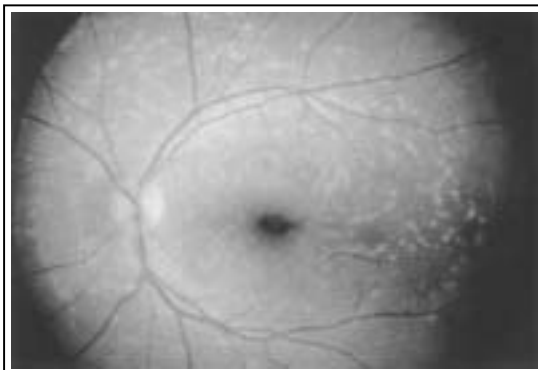


Figura 9. Fons d'ull d'un pacient afectat de FFM. Un munt d'espícules són presents al voltant de la màcula (Fishman i col., 1999).

2.1.1.1. Una o dues entitats clíniques i genètiques?

Franceschetti (1965) va suggerir la dificultat de diferenciar la malaltia de STGD del FFM en edats avançades. Malgrat molts autors, a la dècada dels 70, van proposar que es tractava d'una sola entitat clínica, hi ha una sèrie de característiques que permeten diferenciar-les, com per exemple l'edat d'aparició dels primers símptomes. Mentre que el STGD es comença a detectar a la infantesa (6-12 anys), la major part de pacients FFM es detecten a la tercera dècada de vida (Merin, 1991; Weleber, 1994). Diferents autors han utilitzat l'edat d'aparició de la malaltia per distingir aquestes dues anomalies, és a dir, que pacients amb alteracions maculars i amb espícules de pigment seran classificats

com a STGD si els símptomes apareixen entre els 6 i 12 anys, i com a FFM si els símptomes es donen a partir de la tercera dècada de vida (Weleber, 1994). La visió en color, l'ERG i l'EOG són altres aspectes diferencials entre ambdues maculopaties. Aquests paràmetres romanen estables en els individus FFM mentre que, en els pacients STGD, les alteracions són progressives (Merin, 1991; Weleber, 1994). S'ha proposat, però, que tot i les diferències en edat d'aparició, clínica i severitat, STGD i FFM són probablement una mateixa distròfia clínica. S'ha suggerit homogeneïtat genètica per aquestes patologies i s'ha proposat que són dues entitats al·lèliques. Aquest fet ha estat recolzat pel fet que les dues han estat mapades a 1p (Kaplan i col., 1993; Weleber, 1994; Gerber i col., 1995; Anderson i col., 1995). Recentment s'han fet estudis electrofisiològics en un grup de pacients STGD i FFM que indiquen que existeixen subtipus dins aquestes malalties, i que suggereixen que són malalties diferents, més que no pas estadis diferents d'una mateixa malaltia (Lois i col., 2001). Finalment, també s'han descrit famílies mixtes amb pacients afectats d'una o l'altra malaltia, fet que ha permès començar a establir les relacions genotip-fenotip i demostrar l'homogeneïtat genètica suggerida per aquestes dues distròfies retinianes.

2.1.2. Degeneració macular associada a l'edat

La degeneració macular associada a l'edat (DMAE) és la principal causa de pèrdua de visió irreversible en la població de més de 60 anys (Hyman, 1987). L'increment progressiu de l'esperança de vida ha posat de manifest aquesta patologia. Als EUA afecta un 35% de les persones per sobre de 75 anys i s'observa una prevalença superior en individus caucàsics (Allikmets, 1997b). Estudis epidemiològics han considerat una prevalença d'entre l'2-1'4%, fet que equival a 30 milions de persones arreu del món (Verma i col., 2000). En els pròxims 25 anys s'espera que aquest nombre es dupliqui. Com a tal, la DMAE és considerada un greu problema de salut pública en els països industrialitzats. Es presenta en homes i dones per igual, però en els casos més tardans, a partir de 75 anys, és més freqüent en dones (Yates i Moore, 2000).

Les principals alteracions oculars que es poden observar són l'acumulació de dipòsits de pigment de tipus lipofuscina en la regió macular de la retina, especialment en les cèl·lules del RPE. Aquest fet comporta una disfunció progressiva i finalment la mort cel·lular en aquest teixit que és detectada per la presència d'àrees d'atròfia (Coscas, 1987; Sun i Nathans, 2001). Es donen alteracions morfològiques en la retina neurosensorial, i la membrana de Bruch i el RPE també estan directament afectats. Els pacients pateixen una pèrdua de la visió macular que en estadis avançats es manifesta en forma d'escotoma. El diagnòstic clínic de la DMAE es realitza amb l'**angiografia de fluorescència**. Amb aquesta prova es detecta la presència de fluorescència en els vasos de la coroides que únicament

són visibles si les cèl·lules del RPE han degenerat i, per tant, no existeix pigmentació present que bloquegi la visió d'aquest vasos. També podem detectar una alteració en la tinció específica de les plaques de lipofuscina i un punt fosc cap al centre la de màcula (Green, 1999).

Existeixen dos tipus de DMAE: la forma exudativa o humida i la forma atròfica o seca. La forma exudativa la presenten aproximadament un 20% dels individus i es caracteritza per una pèrdua severa de visió, deguda a l'aparició i creixement anormal de vasos sanguinis amb la presència d'hemorràgies i acúmuls de pigment en el RPE (neovascularització). Aquesta forma pot ser alleugerida mitjançant fotocoagulació amb làser, tot i que sovint hi ha recurrència. No existeix cap teràpia definitiva per aquesta variant. La forma atròfica la presenten el 80% restant d'afectats i es caracteritza fenotípicament per la presència de dipòsits anòmals de pigment dins o sota el RPE que donen lloc a una atròfia geogràfica de la retina. No existeix cap tractament per aturar o evitar la seva progressió (Bressler i col., 1988; Soubrane i Bressler, 2001).

L'etiologia de la malaltia és poc coneguda i no està clar que sigui la mateixa per les dues variants clíniques (Bird, 1998). Com que es tracta d'una malaltia de l'adult, per tal d'explicar la patologia s'han proposat tant causes ambientals com genètiques.

D'una banda sembla que existeixen factors de risc com l'hàbit de fumar (Delcourt i col., 1998; Smith i col., 2001), nivells alts de colesterol (Klein i col., 1997), la hipertensió sistèmica (Sperduto i Hiller, 1986), o el color blanc de la pell (Mitchell i col., 1998), que poden afectar al desenvolupament d'aquesta retinopatia. Únicament el fet de ser fumador ha donat resultats conclouents segurament degut a l'estrés oxidatiu que aquesta activitat comporta, indirectament per ser promotor de problemes d'aterosclerosi o pel seu efecte en la disminució de la densitat del pigment macular (McCarty i col., 2001). El fet que la prevalença de la malaltia variï entre diferents grups racials ha fet pensar en un paper protector del color de la pell (Friedman i col., 1999). L'aprofundiment en l'estudi dels processos bioquímics que tenen lloc en el desenvolupament de la DMAE ha permès detectar que l'origen de l'acumulació dels dipòsits de lipofuscina rau en els processos de peroxidació i polimerització que es donen en l'interior de les vacuoles fagocítiques del RPE. En aquest sentit, estudis preliminars semblen relacionar les dietes riques amb antioxidants (com són els carotenoids i el zenc) amb un menor risc de patir DMAE (VandenLangenberg i col., 1998; Sundelin i Nilsson, 2001).

Pel que fa la genètica, l'alta prevalença de la malaltia, l'edat tardana d'inici dels primers símptomes i la sospita d'heterogeneïtat genètica són obstacles importants per al descobriment dels gens que podrien estar implicats en aquesta patologia (Weeks i col., 2000; Guymer i col., 2001). Tot i això, les repercussions que aquesta malaltia té en la societat i l'alt nombre de gens involucrats en degeneracions maculars de la retina que s'han descrit recentment, han impulsat l'estudi de gens que predisposen a la DMAE.

Estudis realitzats amb bessons monozigòtics (Meyers i col., 1995; Meyers i Zachary, 1988), i casos d'agregació familiar (Seddon i col., 1997) han posat de manifest algun factor genètic que podria afectar al desenvolupament d'aquesta patologia (Silvestri i col., 1994; Rozet i col., 1998; Shroyer i col., 1999). S'han fet estudis de la capacitat protectora a la DMAE exudativa de l'al·lel E4 del gen de l'apolipoproteïna E (ApoE) (Souied i col., 1998; Klaver i col., 1998). Recentment, s'ha descrit lligament al cromosoma 1q en una família gran amb un patró d'herència dominant de DMAE i al cromosoma 6 en una altra família amb dipòsits de pigment associats a degeneració macular (Klein i col., 1998; Kniazeva i col., 2000). Ja més recentment, s'ha realitzat una cerca completa en el genoma (amb 386 marcadors polimòrfics) en 364 famílies amb diagnòstic DMAE. Cap de 15 gens candidats de distròfies de la retina analitzats ha mostrat indicis de lligament. D'altra banda, a 5q32, s'ha descrit la presència del gen *GPX3* (*Glutathione Peroxidase 3*) la funció del qual és la de protegir les cèl·lules del dany oxidatiu mitjançant la reducció de components lipídics. El fet que s'expressi en la retina, que els nivells de proteïna decreixin amb l'edat i que la retina sigui un substrat excel·lent per la peroxidació lipídica, fan d'ell un gen candidat per la DMAE (Weeks i col., 2000).

Tenint en compte les dues formes diferents de la malaltia, s'han proposat contribucions genètiques diferents i diversos factors de risc que portarien a desenvolupar un o altre subtipus (Seddon i col., 1997). D'altres autors han afirmat que la DMAE és una malaltia genètica complexa en la que hi contribuirien un o més factors genètics de susceptibilitat i que, secundàriament, altres gens podrien modificar l'edat d'aparició i el fenotip final (Gorin i col., 1999).

2.1.3. Altres distròfies maculars

El món de les distròfies maculars és molt extens a nivell clínic. S'han descrit un nombre considerable de patologies hereditàries que comparteixen el dany a la màcula però que clínicament es diferencien. Les anàlisis genètiques realitzades fins ara han permès caracteritzar 20 dels loci implicats i identificar 7 gens responsables d'algunes d'aquestes patologies. A les Taules 1 i 2 es descriuen les més ben estudiades amb els gens i loci coneguts.

2.1.3.1. Distròfia de cons i bastons

En el context d'aquest treball és important ressenyar la distròfia de cons i bastons (CRD). Es tracta d'una degeneració inicialment macular que es posa de manifest a la primera o segona dècada de vida. S'hi detecten defectes en els cons, tot i que més tard, amb la progressió de la malaltia, els bastons

també queden ràpidament afectats. La simptomatologia inclou una baixada de l'agudes visual, l'alteració de la visió en color i una aversió elevada a la llum (fotofòbia). La prova clínica determinant per al diagnòstic és l'ERG, que es troba disminuït fins a ser totalment absent tant pels cons com pels bastons (Szlyk i col., 1993). A les etapes finals d'aquesta distròfia els símptomes acaben essent molt semblants als de la retinitis pigmentosa. Moltes distròfies de retina que s'inicien amb simptomatologia oposada poden ser confoses en les seves etapes finals, en part perquè en les darreres etapes del procés neurodegeneratiu queda afectada tota la retina neurosensorial (Chang i col., 1993).

Aquesta patologia s'hereta més freqüentment de forma autosòmica recessiva, però també s'han descrit casos de dominància (Szlyk i col., 1993). LA CRD presenta una elevada heterogeneïtat genètica. Existeixen famílies on el defecte genètic s'ha situat en loci dels cromosomes 18q (*CORD1*), 17q (*CORD4*), 19q (*CORD2*), 6q (*CORD7*), 17p (*CORD5*), 1q (*CORD8*) i 8p (*CORD9*) (Warburg i col., 1991; Klystra i col., 1993; Evans i col., 1994; Kelsell i col., 1997; Payne i col., 1999; Khaliq i col., 2000; Danciger i col., 2001).

2.1.3.2. Gens i loci responsables d'altres distròfies maculars

Taula 1. Distròfies maculars en les quals es coneix el gen responsable de la patologia ordenades segons la seva localització cromosòmica.

Distròfia macular	Gen	Localització cromosòmica	Herència	Referències
Malattia Leventinese	<i>EFEMP1</i>	2p16	AD	Stone i col., 1999
Ceguesa total pels colors	<i>CNGA3</i>	2q11	AR	Wisinger i col., 1998
Distròfia en patró perifèric	<i>RDS</i>	6p21.2-cen	AD	Nichols i col., 1993
Distròfia macular	<i>ELOVL4</i>	6q14	AD	Bernsteini col., 2001
Distròfia de cons; distròfia de cons i bastons	<i>GUCAIA</i>	6p21.1	AD	Payne i col., 1998
Distròfia macular de Best	<i>VMD2</i>	11q13	AD	Petrukhin i col., 1998
Distròfia de cons i bastons	<i>UNC119</i>	17q11.2	AD	Kobayashi i col., 2000

Introducció

bastons				
Distròfia de Sorsby	<i>TIMP3</i>	22q12.1-q13.2	AD	Apte i col., 1994; Weber i col., 1994a
Retinoschisis	<i>RS1</i>	Xp22.2	XL	Sauer i col., 1997
Distròfia de cons	<i>RPGR</i>	Xp11.4	XL	Yang i col., 2002

Abreviatures: EFEMP1: *EGF-containing fibrillin-like extracellular matrix protein-1*; CNGA3: subunitat α del canal catiònic dependent de GMPc dels cons; GUCA1A: proteïna activadora de la guanilat ciclasa 1A; VMD2: *Vitelliform macular dystrophy 2* (codifica per la proteïna bestrofina); UNC119: proteïna homòloga a unc119 de *C.elegans*; TIMP3: *Tissue inhibitor of metalloproteinase-3*; RS1: *Retinoschisin 1*. AD: autosòmica dominant; AR: autosòmica recessiva; XL: lligada al cromosoma X.

Referències: Les dades han estat recollides de la web RetNet (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/disease.htm>, dia de la consulta 05.01.2002).

Taula 2. Loci implicats en algunes distròfies maculars ordenats per localització cromosòmica.

Localització cromosòmica	Loci	Herència	Distròfia macular
1q12-q24	<i>CORD8</i>	AR	Distròfia de cons i bastons
1q25-q31	<i>ARMD1</i>	AD	Degeneració macular
6q	<i>CORD7</i>	AD	Distròfia de cons i bastons
6q14-q16.2	<i>MCDR1</i>	AD	Distròfia macular de North Carolina
6q25-q26	<i>RCD1</i>	AD	Distròfia de cons
7p21-p15	<i>CYMD</i>	AD	Distròfia macular cistoïdea
8p11	<i>CORD9</i>	AR	Distròfia de cons i bastons
14	<i>ACHM1</i>	AR	Acromatopsia dels bastons
17p13-p12	<i>CORD5</i>	AD/AR	Distròfia de cons/ Distròfia de cons i bastons
17q	<i>CORD4</i>	?	Distròfia de cons i bastons
Xp11.4	<i>COD1</i>	XL	Distròfia de cons
Xq27	<i>COD2</i>	XL	Distròfia de cons

Abreviatures: AD: autosòmica dominant; AR: autosòmica recessiva; XL: lligada al cromosoma X.

2.2. DISTRÒFIES D'AFECTACIÓ PERIFÈRICA

Dins aquest grup s'inclouen un conjunt de degeneracions hereditàries de la retina que comporten pèrdua de la visió perifèrica deguda, principalment, a alteracions en els bastons. Inicialment la majoria d'elles s'agrupaven sota el nom de retinitis pigmentosa, però actualment, a mesura que s'ha avançat en el seu coneixement clínic i genètic, algunes d'aquestes patologies s'han anat independitzant del grup inicial.

2.2.1. Retinitis pigmentosa

Els pacients afectats de retinitis pigmentosa (RP) presenten ceguesa nocturna i alteració progressiva del camp visual perifèric des de l'inici de la malaltia. Aquesta simptomatologia s'inicia a l'adolescència i és un reflex de la pèrdua de funció dels bastons de la retina. A mesura que la malaltia progressa, el camp visual queda reduït a un cercle de visió central, que es coneix com a visió en túnel o en escopeta. La majoria dels pacients arriben a patir ceguesa total entre els 40 i els 50 anys (Merin, 1991). Molts d'ells pateixen símptomes secundaris com poden ser miopia, astigmatisme, cataractes o alteracions de la màcula. La prevalença de la malaltia varia des de 1/3.000 a 1/7.000 en les diferents poblacions, acceptant-se com a terme mig 1/4.000 (Humphries i col., 1990; Merin, 1991). Per tant, aproximadament, un milió i mig d'individus són afectes de RP arreu del món (Berson, 1993).

L'estudi del fons d'ull revela: atenuació dels vasos sanguinis de la retina, pal·lidesa del disc òptic, dipòsits de pigment dins la retina com a resultat d'una degeneració del RPE (en anglès anomenats *bone-spicule pigmentation*). Per microscòpia s'observa una pèrdua de fotoreceptors, i els que es detecten, presenten segments externs molt reduïts (Humphries i col., 1990). No tots els pacients desenvolupen tots els símptomes ni la mateixa severitat dels trets, sinó que existeix un cert grau de variabilitat fenotípica. Aquesta és en part deguda a l'heterogeneïtat genètica descrita per aquesta patologia, i a la presència de factors secundaris genètics o ambientals que es creu que tindrien un paper important en el seu desenvolupament.

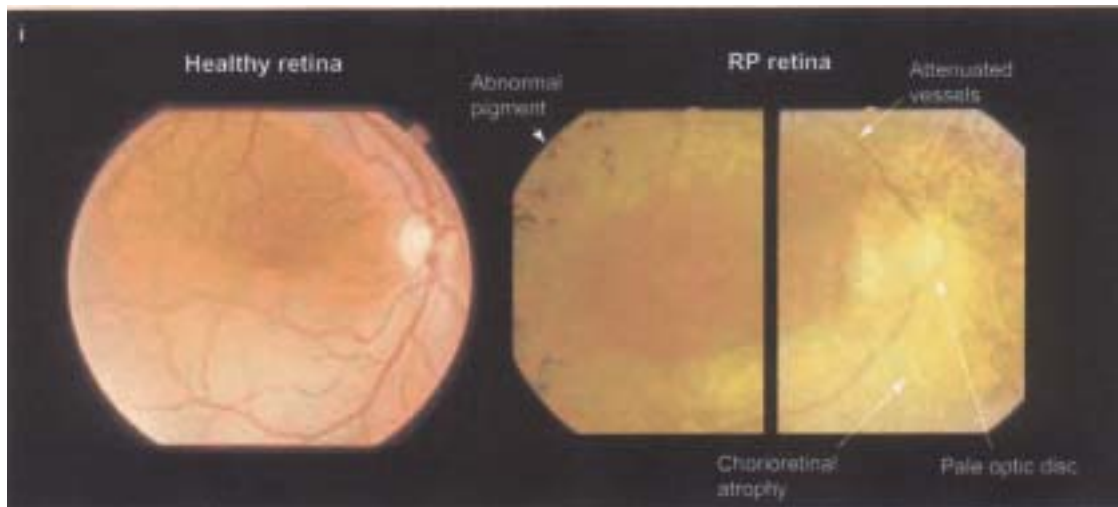


Figura 10. Comparació d'un fons d'ull d'un pacient normal amb el d'un afecte de RP. Les característiques típiques de RP són senyalades amb fletxes (Chapple i col., 2001).

El diagnòstic clínic ve definit per ERGs anormals en condicions escotòpiques mentre que els ERGs dels cons, en condicions fotòpiques, són normals. Això és degut a que el defecte inicial en aquests pacients es troba en els bastons de la retina, mentre que, al principi, la funció dels cons queda preservada. En estadis finals, però, els cons també queden afectats, la qual cosa provoca la ceguesa total. L'ERG pot revelar defectes en la retina fins i tot abans que els símptomes visuals de la malaltia siguin aparents i abans que apareguin els defectes característics en el fons d'ull. L'anàlisi del camp visual mitjançant el perímetre de Goldman permet detectar la presència d'escotomes a la perifèria de la retina. Amb la progressió de la malaltia són típics els escotomes en anell, que demostren que l'única visió possible és la macular.

La majoria de formes de RP afecten única i exclusivament la visió (RP aïllada), però existeixen una minoria de casos on defectes en la visió van acompanyats d'afectació d'altres òrgans, el que es coneix com a RP sindròmica. Un exemple és la síndrome d'Usher on la ceguesa va acompanyada de sordesa. Altres síndromes són la de Kearns-Sayre i la de Bardet-Biedl, que presenten polidactília i obesitat associades a la RP (Merin, 1991; Dryja i Berson, 1995c).

La RP aïllada pot ser transmesa de forma autosòmica dominant (adRP), autosòmica recessiva (arRP) o lligada al cromosoma X (xlRP). També ha estat descrita una forma digènica on els individus afectats són heterozigots dobles per a defectes a dos gens independents (Dryja i Li, 1995a). Les formes xlRP són les més severes clínicament i la majoria dels pacients són cecs als 45 anys. Per contra, en les formes arRP els pacients retenen part de visió fins als 60 anys aproximadament (Merin, 1991). La RP mostra una elevada heterogeneïtat genètica en la que diversos gens i loci són responsables de diferents casos de la malaltia (a l'apartat 4.1 es descriuen en detall aquest gens i loci). En aquest sentit cal remarcar que les formes sindròmiques de la malaltia també són heterogènies genèticament (veure RetNet). Però, tot i l'alt nombre de gens descrits avui dia, s'estima que aquests només expliquen entre un 35% i un 50% de tots els casos.

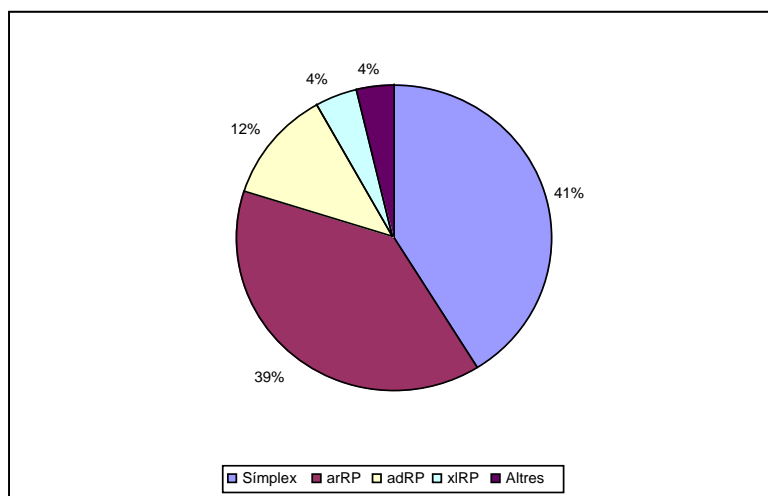


Figura 11. Prevalença dels diferents tipus d'herència de la RP espanyola (Ayuso i col., 1995).

un 35% i un 50% de tots els casos.

Quant a la prevalença dels diferents tipus d'herència de la RP (Figura 11), si bé les formes lligades a l'X i les dominants són poc freqüents (a Espanya no més del 5% i 10% respectivament), les formes recessives són les més abundants a la població i representen una fracció del

39%. El 41% restant correspon a casos esporàdics en què no s'ha establert el tipus d'herència (Bird, 1995; Ayuso i col., 1995).

2.2.2. Altres distròfies perifèriques

El món de les distròfies perifèriques no és menys complex que el de les maculars. A la Taula 3 es recullen altres distròfies retinianes perifèriques. La informació ha estat extreta de Scriver i col. (2001) i de la web RetNet.

Taula 3. Distròfies que cursen amb afectació perifèrica diferents de la RP. S'indiquen els gens responsables d'aquestes patologies i la localització cromosòmica.

Distròfia perifèrica	Localització cromosòmica/ locus	Gen
Amaurosi congènita de Leber	1p31/ LCA2	<i>RPE65</i>
	1q31-q32.1	<i>CRB1</i>
	6q11-q16/ LCA5	-
	14q11	<i>RPGRIP1</i>
	14q24/ LCA3	-
	17p13.1/ LCA4	<i>AIPL1</i>
	17p13.1/ LCA1	<i>GUCY2D-6 (retGC-1)</i>
Malaltia de Refsum	19q13.3	<i>CRX</i>
	7q21-q22	<i>PEX1</i>
Malaltia de Oguchi	10p15.3-p12.2	<i>PHYH</i>
	2q37.1	<i>SAG</i>
Malaltia de Nougaret	13q34	<i>RHOK</i>
	3p22	<i>GNAT1</i>
CSNB	3q21-q24/ CSNB4	<i>RHO</i>
	4p16.3/ CSNB3	<i>PDE6B</i>
	Xp11.4-11.3/ CSNB1	<i>NYX</i>
	Xp11.23/ CSNB2	<i>CACNA1F</i>
Coroïderèmia	Xq21.1-q21.3	<i>CHM</i>
Atròfia girata	10q26	<i>OAT</i>

Abreviatures: *CSNB*: ceguesa nocturna estacionària i congènita; *GUCY2D-6*: guanilat ciclasa; *RPE65*: *Retinal pigment epithelium protein 65*; *CRX*: *cone-rod otx-like photoreceptor homeobox transcription factor*; *AIPL1*: *arylhydrocarbon receptor interacting protein-like*; *RPGRIP1*: *Retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1*; *CRB1*: *crumbs homolog 1*; *PEX1*: *peroxisome biogenesis factor*; *PHYH*: *phytanoyl-CoA hydroxylase*; *SAG*: arrestina o antígen S; *RHOK*: rodopsina quinasa; *GNAT1*: subunitat α de la transducina de bastons; *NYX*: nictalopina; *CACNA1F*: *L-type voltage-gated calcium channel, alpha 1 subunit*; *PDE6B*: subunitat β de la fosfodieterasa del cGMP; *RHO*: rodopsina; *CHM*: *geranylgeranyl transferase Rab escort protein 1*; *OAT*: ornitina amino-transferasa.

3. HETEROGENEÏTAT AL·LÈLICA I VARIABILITAT FENOTÍPICA.

El gen *ABCA4* va ser descrit inicialment com el responsable de la malaltia de STGD (Allikmets i col., 1997a). Les més de 200 mutacions descrites fins avui junt amb els diferents fenotips que es poden explicar per alteracions en aquest gen posen de manifest la seva gran heterogeneïtat al·lèlica. Aquesta característica no és nova dins el conjunt de distròfies de la retina. Altres gens que intervenen en la cascada de fototransducció també presenten variants al·lèliques responsables de diferents patologies de la retina.

En aquest apartat es tractarà de l'heterogeneïtat al·lèlica dels gens de la rodopsina i la periferina/*RDS*, del gen *ABCA4* i del model de correlacions genotip-fenotip proposat per a poder explicar el ventall de fenotips associats a alteracions en aquest gen.

3.1. HETEROGENEÏTAT AL·LÈLICA EN GENS RESPONSABLES DE DISTRÒFIES RETINIQUES

3.1.1. Rodopsina

Tal com s'ha explicat en l'apartat 1.3.1., la rodopsina (RHO) és la proteïna que rep l'energia lluminosa en forma de fotó i que inicia el procés de fototransducció. Representa el 50% del contingut proteic total del segment extern del bastó, i un 80% de les proteïnes dels discs. Aquesta dada ja dóna idea de la importància d'aquesta proteïna en el procés de la visió i suggereix un paper estructural per la RHO (Hargrave i McDowell, 1992; Gregory-Evans i Bhattacharya, 1998). Actualment s'han descrit més de 100 mutacions en aquest gen, la majoria de les quals són responsables de fenotips adRP però també n'hi ha de responsables d'un nombre petit de casos recessius (Gal i col., 1997; Dryja i col., 1990; Rosenfeld i col., 1992; Kumaramanickavel i col., 1994). També s'hi han descrit mutacions dominants que donen lloc a la ceguesa nocturna estacionària congènita (CSNB) (Sieving i col., 1992; Dryja i col., 1993). Ambdues patologies són de bastons, fet que concorda amb que la RHO sigui específica d'aquests fotoreceptors. No hi ha diferència entre les mutacions dominants de la RP i les dominants de la CSNB. En ambdós casos són variants de canvi d'aminoàcid que provoquen un mal plegament del producte proteic (variant *missense*) i que enverinen la còpia silvestre. S'ha postulat igualment que el plegament incorrecte també pot interferir en el transport de la rodopsina cap al segment extern. Els pocs casos arRP descrits ho són per falta total de proteïna (al·lels *null*). En la CSNB, únicament han estat descrites dues mutacions dominants (Ala292Glu i Gly90Asp), que provoquen el trencament de l'estructura 3D de la rodopsina. Curiosament la Lys296 és el lloc d'unió de l'opsina a l'11-cis-retinal i canvis en la posició d'aquest residu poden donar lloc a activacions constitutives de la transducina, el que es coneix com el model de la llum constant equivalent (Dryja i Li, 1995a).

3.1.2. Periferina/RDS

La periferina és una proteïna transmembrana, abundant en els fotoreceptors, involucrada en el manteniment de l'estructura dels segments externs. Es creu que és una molècula d'adhesió que estabilitza els discs mitjançant interaccions homo i heterofíliques a través de l'espai interdiscal (Travis i col., 1991; Hoyng i col., 1996). En els bastons, la periferina/RDS forma heterotetràmers amb ROM-1, una altra proteïna abundant en els discs. Com que la periferina és específica dels bastons, en els cons s'hipotetitzen homotetràmers funcionals.

S'han descrit més de 40 mutacions diferents en el gen de la periferina/RDS humana responsables de fenotips tan diversos com les distròfies perifèriques i les maculars. En relació a les patologies maculars, s'ha descrit la seva contribució a FFM, a la distròfia macular viteliforme de l'adult i a distròfies en patró del RPE (Nichols i col., 1993; Weleber i col., 1993; Wells i col., 1993; Wroblewski i col., 1994). També s'han detectat mutacions que causen formes dominants de distròfia de cons i bastons (Farrar i col., 1991). Pel que fa a patologies perifèriques de la retina, també ha estat implicada en casos d'adRP [RP6] i retinitis punctata albescens (Kajiwara i col., 1993). La majoria de les mutacions detectades són del tipus de mutacions de canvi d'aminoàcid, i únicament s'han detectat delecions de 2 i 4 pb en dos casos de distròfia en patró dominants i en un de Retinitis punctata albescens també dominant (Kajiwara i col., 1993; Nichols i col., 1993; Kim i col., 1995). Es va observar una delecio tri-nucleotídica en una família mixta, amb individus afectats de RP, distròfia en patró i FFM (Weleber i col., 1993; Richards i Creel, 1995; Gorin i col., 1995). La gran variació fenotípica associada a mutacions en RDS, tant inter com intrafamiliar, ha suggerit la contribució d'altres factors modificadors tant genètics com ambientals (Weleber i col., 1993). Finalment, s'ha descrit un cas d'herència digènica de periferina/RDS amb *ROM-1* que posa de manifest l'alt grau d'interacció entre aquestes dues proteïnes (Kajiwara i col., 1994; Goldberg i Molday, 2000).

3.2. EL GEN *ABCA4* COM A RESPONSABLE DE LA MALALTIA DE STGD

El locus responsable de la malaltia de STGD (*STGD1*) va ser mapat al braç curt del cromosoma 1 per Kaplan i col. (1993). L'acotament posterior de la regió i l'exclusió de diferents gens candidats posicionals (Kaplan i col., 1993; Anderson i col., 1995; Weber i col., 1996; Hoyng i col., 1996), van permetre identificar *ABCA4* (1p21-p23) com a responsable d'aquesta distròfia macular (Allikmets i col., 1997a). Per l'estudi d'híbrids de radiació es va situar el gen entre els marcadors D1S236 i

D1S3361 i, mitjançant FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), va ser mapat a 1p21-p22.1 (Nasonkin i col., 1998).

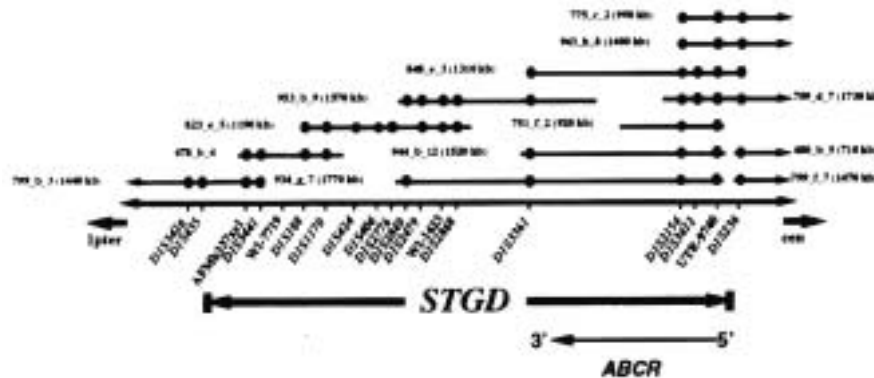


Figura 12. Mapatge físic del locus STGD i d'*ABCA4*. Mitjançant anàlisi genètica, es va situar el locus a una regió crítica de 4 cM entre D1S435 i D1S236. A la part superior de la figura es representa el còntig de YACs que cobreix la regió. S'assenyala la posició d'*ABCA4* i la direcció de transcripció (Allikmets i col., 1997a).

Aquest gen pertany a la superfamília ABC (*ATP-Binding Cassete*) formada per proteïnes transmembrana involucrades en el transport de diferents substrats dependent d'ATP (Allikmets i col., 1997a; Rozet i col., 1998; Nasonkin i col., 1998).

3.2.1. Estructura del gen i de la proteïna

Gerber i col. (1998) van ser els primers en caracteritzar l'estructura sencera d'*ABCA4*. El gen està orientat 5'→3' cap al telòmer. L'estructura genòmica i mides dels exons/introns es detallen a la Taula 4.

Taula 4. Seqüències d'*splicing* i nombre i mida dels exons i introns d'*ABCA4* (adaptat d'Allikmets i col., 1998).

Exo n	Size (bp)	Splice acceptor	Splice donor	Intron (kb)
1	5'		AAGGCAAAGGtaacagtactgtct	2
2	94	tgttttgtttccagATTCGCTTTG	CATCATGAATgtaagcatagcagggt	1.5
3	142	attttctgtttaaagGCCATTTCCC	ACAACTCCATgtaagtgttgatgcc	2
4	139	ggctttgtccttacagCTTGCAAGG	AGAATTGCAGgtaagcatgactgcag	>10
5	128	tcttattcatatgtagGAAGAGGAAT	TCCAGAGCAGgtaggggatgtcact	4.5
6	198	cctcttccctgcagTTCGCTCATG	CTCCGTGTGgtaaggagggtttg	>10
7	88	ttagtgcaattacagGTTCCACAC	AATCAAGAGgtgagtatctgatgg	3
8	238	ctttgccttgcctagTTTATCCATC	AGAAGAACAAGtaagtttctgagtc	1
9	139	cctgtctcctgcagCATCCTTTTG	ACTGAAGAATgtaagatcccactgg	1

10	117	cttctgtggttttagGCCAACTCAA	CATGATCAGAgtaaggggggttga	0.8
11	198	atttctctcccaagGATACCTGG	ATACCTGGAGgtaaggggctgcaacc	>10
12	206	ttgtgactctgcagTGCTTGGTCC	TAAAGACAGgtgatgtttcaggaag	0.4
13	177	ctctgtctctcagGTATTGGGAT	TGGACGATTCgtgagtctgaagttcg	2
14	223	tctcctttgcttagTTTCATGATC	ATTCATCATGgtaagccagatggaga	3.5
15	222	ggcctctggtttcagCATGGAAGAA	GAAGGCTGTGgtgagggccttgggct	1
16	205	ctccgcctcactgcagAGCTTACTGT	GTGTTCCAGgtaagcctcctcctct	3.5
17	65	ttgtctattttagGAGACTATGG	GGCGGTGAAGgtgagctcttaaac	2.5
18	90	cttctgattggtcagGGTGTCAAC	GGAATACACGgtaaaaccgataaag	1.5
19	175	ttttttctctccagACTCCTTCTT	CCACCACCTTgtgagtctgccagcag	2
20	132	cgctgtgtctgcagGTCCATCCTG	TGTTCCACCAgtaagcgacacaggaa	1
21	140	gtgccatcctcctagCCTCACGGTG	GACCTATCAGgtgctcanagctggat	0.8
22	138	cttctgtgcctccagGTGGCATGCA	TATCGCTCAGgtaacagctgctctc	1
23	194	ggccctacctgcagGCAGAACCT	AGGCAGTGAGgtaggtgtctgccac	0.5
24	85	catccatctgttcagGGACCTGCA	GTCTTGATGgtaaggaactggacggg	2.5
25	206	ttttttgtcatagGGGATGTAAA	CCTGGAAGAGgtaagtagagattcc	0.5
26	49	ttctctcttgacagATTTTCTGA	CTGTTTGGCGgtatggtgctggagcc	>10
27	266	caatctcaaaacagGTGGCGCTCA	CCTGGCGCAggtactattgctgctcg	1
28	125	gtctattctcccacagATCGTGCTCC	CCTTCTTCAGgtgctcgcgactcgggg	1
29	99	gtctcactgtctagCATGGATGAA	GGTGGCTTCCgtaagtcctacgcgc	0.8
30A	187	tctgtctccacagGGAGTACCCC	GCCCCCCCAGgtactgacctcaaaa	0
30B	73	cttccatectgcagGTGCAGCACC	GCCCCCCCAGgtactgacctcaaaa	3.5
31	95	gtctcattgcctcagAGAACACAGC	TAAGAAGCAGgtaagaagaaatcctt	1.5
32	33	ttatttggccttcagCTTAAAGAGC	ATGAACAGAGgtaagaactattttt	1.5
33	106	cctgttctctgcagGTATGGAGGA	TGTGAGCGGGgtatgtaaacagactg	0.13
34	75	ttacatggttttagGGCCCTATCA	CAACATTAAGgtacttgacctatgta	0.23
35	170	cctctcaacctctagGTGTGGTTTA	AGATTACAGTgtaagccaccacagcc	1.5
36	178	tctggcctgctgcagGCTGACCACT	CTGGGACATCgtaaggtcagtttacc	3.5
37	116	ctctctcttccgagATGAATTATT	TGCTGTATGGgtaagccgtttgggccc	1.2
38	158	gtctcattccacagATGGGCGGTC	TAATAACCGgtgagcataactttct	3.0
39	125	tactctctgtttcagACGCTGCTCA	GCCCCGTTTggtgggtggtaccgag	0.8
40	130	tctgtgtagcccagGTGAGGAGCA	TCTCCCAATGgtactgccaatccaca	1.5
41	121	cccttctctcctagGATTGCCGAG	ACTAACCAAGgtaagggaaatgggtat	0.4
42	63	tctcatacttcagATTTATCTGG	CCCTGGAGAGgtgggtactctcaga	0.495
43	107	ctgtgtttctcctagTGCTTTGGCC	CAGGCAAGAGgtgagtatccngctcc	2
44	142	acctttttctgcagTATTTTAACC	AATCGAAAAGgtgaaaaatgtttgt	3.5
45	135	tctttctctcctagGTTGCAAACCT	GGTGTGCTGgtaactcgggcttgg	1
46	104	ctntccacccccagGATGAGCCCA	CATCCCACAGgcaagagattcccagg	0.07
47	93	ctctctgccccacagCATGGAAGAA	TCAAGTCCAAGtaagcagatggtggg	2.5
48	250	gtgtgcatcccctagATTTGGAGAT	ACTGGACCAGgcaagttggcctggg	1.5
49	87	cttcttacccttagGTGTTTGTAA	ACAAGCCCAggtaccctgctgctta	2.5
50	3'	tgatctctccacagGACTGATCTT		

El gen conté 51 exons i comprèn unes 150 kb de DNA genòmic. Tots els exons són codificants, i la pauta de lectura oberta és de 6705 pb. Algun intró fa més de 10 kb de llargada, però amb les tècniques de *PCR* utilitzades és difícil precisar la seva longitud (Azarian i col., 1998; Allikmets i col., 1998). Un nou exó, el 30b, descrit amb posterioritat, ha afegit 114 pb a la seqüència inicial (pauta de lectura oberta de 6819 pb). La nova proteïna de 2273 aminoàcids té una massa molecular de 240 kD (Cremers i col., 1998).

S'han caracteritzat 870 pb del promotor, entre ells la caixa TATA a 27 pb a 5' de l'inici de transcripció (Souied i col., 1999). Aquesta regió està relativament conservada entre ratolí i humans, i conté diferents elements cis-reguladors, entre ells dos elements Ret-4, que confereixen l'expressió específica de fotoreceptor (Azarian i col., 1998).

ABCA4 presenta elevada homologia de seqüència amb els gens *ABCI* i *ABC2* humans, i també *Abc-1* i *Abc-2* de ratolí. A més, s'assembla a un altre gen humà anomenat *ABCC* que mapa a 16p13.3.

Tots aquests gens, incloent-hi *ABCA4*, pertanyen a una subfamília representada en tots els organismes multicel·lulars des de procariotes a humans (Dean i Allikmets, 1995; Allikmets i col., 1996). Un altre gen humà d'aquesta subfamília és *CFTR*, descrit com a gen responsable de la fibrosi quística (Dean i Allikmets, 1995) (Taula 5).

Taula 5. Gens de la família ABC i la seva funció en eucariotes i procariotes (adaptada de Dean i Allikmets, 1995).

Gen	Funció proteïna
Mamífers	
<i>CFTR</i>	Canal de clor
<i>PGP1</i>	Resistència a drogues
<i>PGP3</i>	Transportador de sals
<i>MRP</i>	Transportador de conjugats de glutatió
<i>TAP</i>	Transportador d'antigen HLA de classe I
<i>SUR</i>	Receptor de la sulfonilurea
<i>OAB</i>	Proteïna d'unió
<i>Drosophila</i>	
<i>w</i>	Locus white; transportador del precursor del pigment visual
Llevat	
<i>STE6</i>	Transportador de llevat
<i>PDR5/LEM1/STS1</i>	Transport d'esteroides, resistència a drogues
<i>PAX1</i>	Requerit per créixer en àcid oleic

En eucariotes, aquests gens codifiquen per 2 dominis d'unió a l'ATP i dos dominis transmembrana amb 6 segments cadascun (Figura 13). Els dominis d'unió a l'ATP contenen 2 seqüències conservades anomenades motius Walker A i B, separades per 90-120 aminoàcids. A més, el tercer motiu C, que precedeix al Walker B, diferencia aquesta família ABC d'altres proteïnes d'unió a l'ATP. La seqüència de la proteïna ABCR és totalment homòloga a la de *Xenopus* i bestiar boví descrita als anys 70 per Papermaster i col. anomenada *Photoreceptor Rim Protein (RmP)* (Illing i col., 1997; Azarian i Travis, 1997).

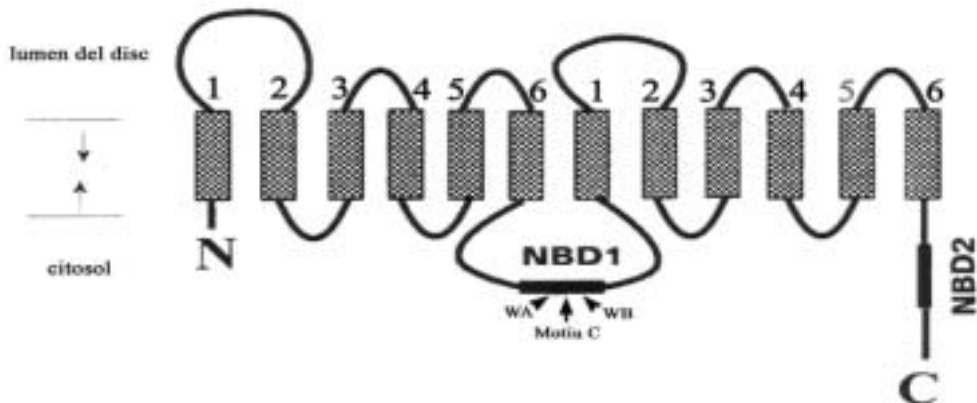


Figura 13. Estructura predita per la proteïna ABCR. NBD1/2: ATP-nucleotide binding domains1/2. Aquests dominis es troben orientats cap al citosol del fotoreceptor (adaptada de Biswas, 2001). WA: Domini Walker A; WB: Walker B

Walker B.

3.2.2. Localització

Per hibridacions *in situ* sobre teixits oculars de ratolins, rates, bovins i macacs, s'ha detectat el transcrit *ABCA4* exclusivament a la retina i, concretament, a la membrana de les vores dels discs, dins el segment extern dels fotoreceptors (Allikmets i col., 1997a). Si bé en un inici només es va detectar en bastons, actualment s'ha demostrat que també es troba als cons (Sun i Nathans, 1997; Molday i col., 2000). El nombre de molècules d'ABCR existents a la membrana dels discs dels bastons respecte a les molècules de rodopsina és 120 molècules de RHO per 1 d'ABCR. Davant la dificultat d'estudiar una proteïna específica de cèl.lules no cultivables *in vitro*, s'han fet estudis d'expressió en cèl.lules COS-1, on l'ABCR recombinant es detecta a la membrana plasmàtica. Després de purificar la proteïna, l'activitat ATPàsica és comparable a la de la proteïna silvestre. Aquests resultats aporten una eina de treball molt important per fer estudis d'expressió d'al.lels mutats (Ahn i col., 2000).

3.2.3. Funció

La deficiència en vitamina E en primats provoca acumulació de lipofuscina en el RPE i dona lloc a degeneració macular. Probablement, aquests acúmuls es donen per la incapacitat del RPE de degradar o reciclar els lípids resultants de la fotooxidació. Normalment aquesta vitamina es troba en concentració elevada en el segment extern dels fotoreceptors, i segurament juga un paper important en el restabliment del dany provocat per la fotooxidació després dels processos de fototransducció. Davant

la semblança fenotípica entre pacients STGD i els deficients en vitamina E, es va hipotetitzar que ABCR participaria en el transport lumen-citosol relacionat amb el reciclatge de lípids o els nivells de vitamina E (Allikmets i col., 1997a; Sun i col., 1999).

Els retinoids, i més concretament el retinal, són els substrats naturals de la proteïna ABCR, i s'ha demostrat que aquests són transportats a través de les membranes dels discs cap al citosol (Sun i col., 1999). S'ha proposat que ABCR està involucrat en el reciclatge dels retinoids per tal que la fotoactivació de la RHO en el cicle de la visió procedeixi en el temps adequat. ABCR actuaria com una flipasa, posteriorment una deshidrogenasa reduiria el tot-trans-retinal que seria traslladat al RPE per la seva oxidació a 11-cis-retinal (Figura 14). Encara no s'ha esbrinat si aquest procés tindria lloc en els cons, on els discs són oberts i les membranes contínues amb la membrana plasmàtica del segment extern del fotoreceptor.

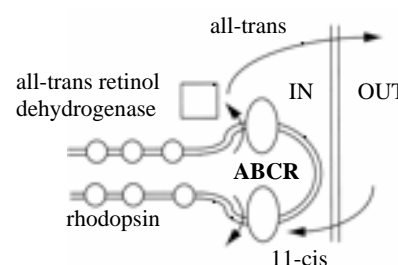


Figura 14. Funció d'ABCR. Transport del tot-trans-retinal fora del disc del fotoreceptor (Sun i col., 1999).

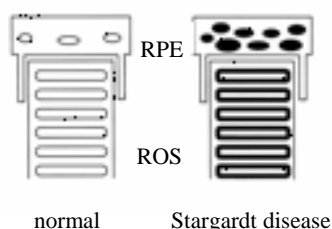


Figura 15. Possible model d'ABCR en la patogènesis de la malaltia de STGD (Sun i col., 1999). ROS: rod outer segment.

Weng i col. (1999) han construït un model de ratolí *knock out* per *RmP* que manifesta alteracions d'adaptació a la foscor. A nivell molecular s'observa un increment del tot-trans-retinal i nivells elevats de fosfatidil-etanolamides (PE) en els segments externs després de l'exposició a la llum, acumulació dels complexos PE-[tot-trans-retinal] i deposició del fluoròfor A2E de la lipofuscina en el RPE. Aquests resultats corroboren el que Sun i col. (1999) havien postulat sobre un enverinament degut a l'acumulació d'A2E en les cèl.lules del RPE, i una degeneració secundària dels fotoreceptors per pèrdua de funció d'aquest epitel·li (Figura 15). A baixes concentracions A2E pot induir apoptosi, però a nivells elevats pot fins i tot disoldre membranes, fet que suposaria la mort cel.lular.

3.2.3.1. ABCR, A2E i patologia

L'A2E (*N-retinylidene-N-retinylethanol-amine*) és un compost que s'acumula al RPE al llarg de la vida. És un derivat de les etanolamines (dues molècules de vitamina A i una molècula d'etanolamina) i és el principal fluoròfor de la lipofuscina. La lipofuscina és un potent generador per fotoinducció de

radicals lliures d'oxigen i és fototòxica sobre les cèl·lules del RPE. A més, és capaç de la peroxidació de lípids i pot inhibir activitats enzimàtiques del mateix RPE (Schutt i col., 2000). A2E es forma a partir de complexos de tot-trans-retinal amb fosfatidiletanolamines (2:1) en el segment extern dels fotoreceptors (Eldred i col., 1993). Com a resultat de l'activitat fagocítica del RPE, l'A2E passa a ser detectat en els lisosomes d'aquest teixit, produeix un augment de pH en les cèl·lules del RPE i això promou la seva degeneració. En un individu sa, poques molècules del tot-trans-retinal s'acomplexen amb aquests components lipídics perquè el tot-trans-retinal es regenera ràpidament a la forma 11-cis, però els pacients STGD presenten nivells molt elevats d'A2E en aquest epiteli (Delori i col., 1995). Experiments en cultius de cèl·lules del RPE amb nivells elevats d'A2E i exposició a la llum, han demostrat una reducció de l'activitat cel·lular a les 72h. Aquest fenomen no s'ha observat en condicions de foscor o a baixos nivells d'A2E (Schutt i col., 2000). Actualment creiem que l'increment dels nivells de tot-trans-retinal dins el fotoreceptor és conseqüència directa del bloqueig de l'activitat d'ABCR (Wang i col., 2000).

3.2.4. Mutacions que causen STGD/FFM

Des de 1997 fins l'actualitat s'han descrit més de 200 mutacions en *ABCA4*, distribuïdes al llarg de tot el gen però més freqüents en els dominis conservats (Lewis i col., 1999; Webster i col., 2001). Les més abundants són les mutacions de canvi d'aminoàcid, i les que introdueixen una aturada de la traducció (74%). També trobem alguna inserció o deleció de pocs nucleòtids (10'5%), i algunes mutacions que afecten l'*splicing* del RNA (11'2%) (dades de la web de l'HGMD: <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>).

En els pacients arSTGD amb mutacions a *ABCA4* s'ha detectat una freqüència de mutacions de canvi d'aminoàcid elevada, i en molts casos es tracta de transicions, degudes a la desaminació de residus citosina metilats (Allikmets i col., 1997a; Webster i col., 2001). S'ha suggerit que quan aquests canvis afecten l'extrem amino-terminal de la proteïna s'associen a patologies d'aparició primerenca, mentre que aquelles que afecten l'extrem més carboxi-terminal donen lloc a inicis de malaltia més tardans (Lewis i col., 1999). També s'ha posat de manifest que hi ha mutacions específiques associades a una determinada edat de manifestació de la malaltia. En els casos STGD/FFM tardans (35 anys o més) s'ha detectat un nombre considerable de mutacions de canvi d'aminoàcid fora dels putatius dominis proteics funcionals. A més, s'ha comprovat que existeix un nombre elevat d'alels complexes o cromosomes doble mutants, però no es coneix ni l'origen ni la causa per la qual apareixen més sovint associades a STGD respecte d'altres patologies causades per *ABCA4* (Lewis i col., 1999).

S'han desenvolupat anàlisis funcionals per a determinar els efectes d'algunes d'aquestes variants, ja siguin a nivell del plegament de la proteïna o de la seva estabilitat (Sun i col., 2000). S'ha observat que les petites delecions o els aminoàcids carregats situats en dominis transmembrana comporten una disminució en la quantitat de proteïna produïda. En són exemples: una delecio de tres aminoàcids (PAL) a la posició 176 de la proteïna i G1886E. D'altres mutacions que no afecten la síntesi de la proteïna, provoquen alteracions en la regió d'unió a l'ATP (Sun i col., 2000). També s'ha demostrat que algunes mutacions de canvi d'aminoàcid provoquen alteracions en el primer i segon lloc d'unió a l'ATP simultàniament, degut a què existeix una regulació alostèrica entre aquests dos centres (Biswas i Biswas, 2000; Biswas, 2001).

Els al·lels mutants més comuns d'*ABCA4* a Europa i Amèrica són G1961E, A1038V i 2588 G->C. La seva representació en població STGD és d'un 18.5, 18.5 i 6% respectivament (Allikmets i col., 1997a; Rozet i col., 1999a; Maugeri i col., 1999; Lewis i col., 1999; Fumagalli i col., 2001). A1038V es troba freqüentment associada en cis a L541P en població italiana (Fumagalli i col., 2001). D'algunes d'elles se'n parlarà posteriorment.

3.2.4.1. Altres gens i loci implicats en la malaltia STGD/ FFM

La majoria de casos recessius d'aquesta malaltia es poden explicar per mutacions en el gen *ABCA4*. Únicament existeixen tres famílies (dues de Canadà i una d'Alemanya) amb diagnòstic arSTGD que no estan lligades al locus *STGD1* (Weber i col., 1996). Aquests resultats han fet qüestionar la homogeneïtat genètica i han suggerit l'existència d'un locus minoritari que podria explicar aquestes tres famílies. A més a més, també s'ha descrit una mutació a la posició 15257 del DNA mitocondrial en dos pacients diagnosticats amb degeneració retiniana semblant a STGD (Heher i Johns, 1993). En qualsevol cas, no s'ha descrit cap més pacient STGD amb defectes en aquest DNA.

Pel que fa a l'herència dominant, s'han descrit alguns casos STGD (Cibis i col., 1980; Bither i Berns, 1988; Lopez i col., 1992; Mansour, 1992; Stone i col., 1994; Zhang i col., 1994; Kniazeva i col., 1999) i s'han vinculat a tres loci diferents: *STGD2* a 13q34 (Zhang i col., 1994), *STGD3* a 6q11-q15 (Stone i col., 1994) i *STGD4* a 4p (Kniazeva i col., 1999). La cerca de gens candidats a 6q ha permès excloure 3 gens com a responsables dels fenotips lligats a aquesta regió: el gen *CORD2*, el gen responsable de la malaltia de Best i el responsable d'una altra variant de distròfia macular (Griesinger i col., 2000). Finalment una delecio de 5pb ha estat descrita recentment en el gen *ELOVL4*, un receptor específic de retina, en les famílies STGD amb herència dominant lligades a *STGD3*, i en famílies amb

Introducció

distròfia macular autosòmica dominant (Zhang i col., 2001). Aquest gen presenta homologia a una família de proteïnes de llevat (*ELO gene family*) que

estan involucrades en la biosíntesi de cadenes llargues d'àcids grassos. L'estudi d'haplotips de 7 famílies més de Nord-Amèrica amb diagnòstic adSTGD ha demostrat que totes aquestes famílies pertanyen a diferents branques d'una gran família amb el gen responsable de la malaltia situat a 6q. Aquest fet facilita el consell genètic en aquelles famílies que presentin STGD dominant lligat a aquest locus ja que sembla que tots els casos poden provenir d'un ancestre comú (Donoso i col., 2001). Actualment el locus *STGD2* s'ha desestimat perquè la família que presentava lligament en aquesta regió ha estat remapada a 6q i presenta mutacions en el gen *ELOVL4*.

Finalment s'ha descrit algun cas dominant de FFM amb mutacions a la periferina (Weleber i col., 1993).

3.3. VARIANTS D'*ABCA4* ASSOCIADAES A D'ALTRES DISTRÒFIES RETINIQUES

Des del descobriment del rol d'*ABCA4* en STGD l'any 1997, el seu estudi en relació a d'altres retinopaties ha permès afirmar que aquest gen no és només responsable de STGD/FFM sinó que també pot explicar un ventall de patologies diferents que afecten la retina.

3.3.1. *ABCA4* i retinitis pigmentosa

ABCA4 va ésser el 5è gen descrit causant d'arRP. La caracterització d'un nou locus (*RP19*) a 1p13-p21 (Martínez-Mir i col., 1997), que coincidia amb el locus *STGDI*, i la posterior caracterització de mutacions en *ABCA4* en pacients arRP va permetre afegir aquest gen a la llista de gens i loci responsables de RP (Martínez-Mir i col., 1998; al capítol 1.1. de resultats s'inclou aquest article que constitueix un dels punt de partida d'aquesta tesi). Com la resta de gens vinculats a la RP, no és un gen major sinó un dels que explica uns pocs casos d'aquesta patologia.

A diferència del que s'ha detectat en població STGD, les mutacions d'*ABCA4* fins ara descrites en arRP són al.lels *null*. Si bé les primeres mutacions descrites eren clarament no funcionals - delecions grans, truncaments de la proteïna o defectes de l'*splicing* del mRNA (Cremers i col., 1998; Rozet i col., 1999a)-, les dues últimes són canvis d'aminoàcid -V767D i [W1408R; R1640W]- nuls funcionals comprovats per assaigs *in vitro* (Shroyer i col., 2001). Experiments d'expressió del mRNA i de la proteïna, així com westerns amb anticossos contra ABCR han revelat que si bé hi ha nivells normals de mRNA la quantitat de proteïna detectada és molt baixa.

3.3.2. ABCA4 i distròfia de cons i bastons

Malgrat que per anàlisi de lligament s'havien descrit diversos loci responsables de casos d'aquesta patologia, *ABCA4* és el primer gen descrit com a causant de la CRD recessiva (Taules 1 i 2 de l'apartat 2.1.3.2.).

Les mutacions d'*ABCA4* que corresponien al primer cas CRD descrit, eren relativament severes. Es tractava d'un pedigrí mixte amb individus CRD i RP. Els primers eren heterozigots compostos per dues mutacions d'*splicing*, una conduïa a un al·lel *null* i l'altra reduïa la funció d'un lloc acceptor d'*splicing* (Cremers i col., 1998). Estudis posteriors han demostrat que la contribució d'*ABCA4* a l'arCRD no és minoritària i en la població Nord-Europea, *ABCA4* explica un 80% dels casos d'arCRD (Cremers i col., 1998; Maugeri i col., 2000). Anàlisis posteriors d'*ABCA4* en població CRD han corroborat que les formes recessives d'aquesta malaltia són explicades en la seva majoria per defectes en el gen *ABCA4*.

3.3.3. ABCA4 i susceptibilitat genètica a la DMAE

Diversos autors van observar que algunes variants d'*ABCA4* (G1961E i D2177N) eren més freqüents en pacients DMAE que en població control (Allikmets i col., 1997a; Allikmets i col., 1997b; van Driel i col., 1998; Allikmets i col., 2000a). Malgrat les conclusions d'aquests primers treballs van ésser criticats en base a l'estratègia metodològica i al tractament estadístic de les mostres (Klaver i col., 1998; Stone i col., 1998; De la Paz i col., 1999; Kuroiwa i col., 1999; Rivera i col., 2000). Com que aquestes associacions són difícils de demostrar ja que depenen en gran mesura del nombre de pacients, el grau de variabilitat inter i intrapoblacional, el fons genètic de cada individu i l'ambient, en d'altres anàlisis el nombre i tipus de canvis nucleotídics en població control i DMAE no ha donat diferències significatives (Stone i col., 1998; Guymer i col., 2001). Així, doncs, existeix una gran controvèrsia quant a aquesta associació. Una possible causa és que en aquests estudis la variant exudativa i l'atròfica han estat considerades com una sola entitat, però en canvi, els pacients DMAE que presenten aquestes variants d'*ABCA4* són afectats principalment de la forma atròfica. Avui dia s'han realitzat estudis separant els dos grups de pacients i s'ha observat que *ABCA4* es troba rarament involucrat en les formes familiars exudatives de DMAE (Souied i col., 2000).

El model murí transgènic hemizigot per *ABCA4* (+/-) presenta un fenotip semblant a STGD, però la progressió de la patologia és molt més lenta, fet que l'apropa a la DMAE. També s'observen acumulacions d'A2E al RPE. Aquests resultats aporten el primer model animal per desenvolupar noves

intervencions terapèutiques que inhibeixin l'acumulació patològica de la lipofuscina (Mata i col., 2001).

3.3.4. Model de correlacions genotip-fenotip per *ABCA4*

S'ha proposat un model que relaciona les mutacions d'*ABCA4*, classificades d'acord amb la reducció de funció, amb un fenotip determinat, de forma que l'activitat d'ABCR es correlaciona inversament amb la severitat de la malaltia. Segons aquest model el fenotip més sever i progressiu, la RP, seria causat per mutacions de pèrdua total de funció de la proteïna ABCR; la CRD per una combinació d'un al.lel nul i un al.lel moderadament sever (ABCR mantindria una certa activitat residual); la malaltia de STGD per la combinació d'un al.lel greu i un al.lel lleu (l'activitat d'ABCR estaria lleugerament afectada) o per dues alteracions moderadament severes (cadascun dels al.lels ABCR donaria activitat baixa); FFM resultaria de combinar dues alteracions lleus (fet que explicaria que el fenotip es manifestés més tard en la vida) i finalment ésser portador d'un al.lel d'*ABCA4* podria predisposar a la DMAE (Martínez-Mir i col., 1998; Cremers i col., 1998; Rozet i col., 1998; van Driel i col., 1998; Allikmets i col., 2000a; Lewis i col., 1999; Maugeri i col., 1999; Shroyer i col., 1999; Lewis and Lupski, 2000)

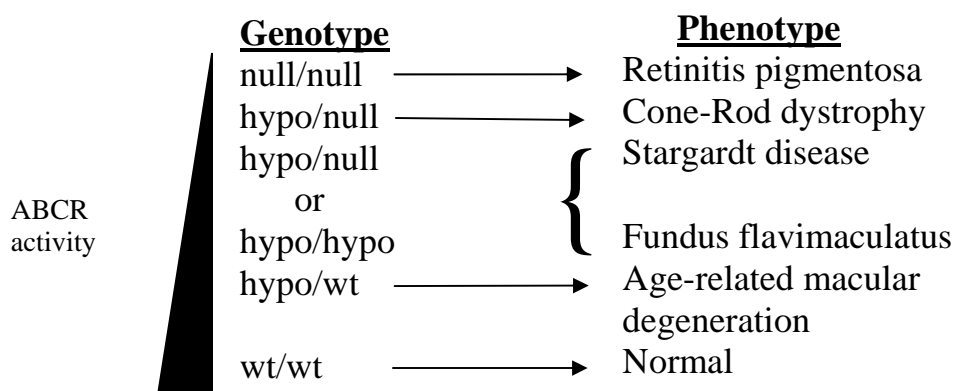


Figura 16. Fenotips associats a mutacions d'*ABCA4*. *Null*: Mutacions que donen lloc a una proteïna no funcional; *Hypo*: al.lels hipomòrfics, funció residual; *WT*: al.lels silvestres (Shroyer i col., 1999).

Aquest model, que en principi no precisava el concepte de mutació severa, moderadament severa o lleu, s'ha anat definint gràcies als nombrosos estudis realitzats. Mutació severa seria la que provoca una pèrdua total de funció de la proteïna, com per exemple mutacions que interrompen la pauta de lectura o les que afecten l'*splicing*. Aquest tipus d'alteracions s'associarien a malalties de progressió molt ràpida i que cursen amb pèrdua de fotoreceptors i defectes en el RPE. Mutacions

moderadament severes serien aquelles causades per canvis d'aminoàcid que afecten a dominis conservats, putativament rellevants a nivell funcional, per exemple les que afecten els dominis d'unió a l'ATP o a determinats segments transmembrana. Aquestes variacions alterarien el plegament d'ABCR però no anularien totalment la seva funció. Mutacions lleus serien aquelles que afectarien dominis no conservats i que probablement donarien lloc a canvis d'un aminoàcid per un altre del mateix grup. Tant les moderadament severes com les més lleus provocarien l'acumulació de substàncies en el RPE, amb posterior afectació dels fotoreceptors. Finalment en la DMAE, amb un únic al·lel afectat, la manifestació de la malaltia seria molt més tardana, l'acumulació d'agents tòxics al RPE gradual i la pèrdua de funció fotoreceptora molt més lenta (Shroyer i col., 1999). Segons aquest model, la variabilitat interfamiliar del fenotip STGD "clàssic", en relació a l'edat d'aparició de la malaltia o a la severitat, dependria de la combinació d'al·lels en un individu determinat (Lewis i col., 1999).

4. HETEROGENEÏTAT GENÈTICA I UNIFORMITAT CLÍNICA.

La retinitis pigmentosa pot ser causada per mutacions en molts gens diferents (apartat 2.2.1.). En aquest apartat, es parlarà dels gens i loci associats a les diferents formes de retinopatia hereditària, les estratègies utilitzades per a la seva identificació, la seva classificació i l'identificació de nous gens responsables de RP. Posteriorment, es consideraran les bases genètiques de l'arRP en el panell de 52 famílies epnyoles que s'han analitzat en aquest grup en els darrers 10 anys, per finalment presentar els gens i loci que s'han analitzat en aquest treball.

4.1. GENS I LOCI RESPONSABLES DE LA RP

4.1.1. Estratègies per a la identificació de nous gens i loci

Actualment, en les malalties monogèniques, la cerca i localització del gen es basa en l'anàlisi de lligament (Evans i Bird, 1996). Una característica de la RP, és que encara que hi hagi potencialment molts gens responsables, en cada família la patologia cosegrega amb un gen diferent.

Mitjançant l'anàlisi de lligament s'identifica la regió cromosòmica en la que hi ha el gen responsable de la patologia. L'existència de mapes genètics d'alta resolució que contenen marcadors polimòrfics de tipus microsatèl·lit distribuïts uniformament al llarg del genoma ha facilitat enormement aquesta tasca (Weissenbach, 1993). Actualment, es disposa de diferents bases de dades de marcadors polimòrfics per aquest tipus d'anàlisi a través d'Internet. Un exemple és el *Genéthon*, que ofereix una

base de dades de 9.900 marcadors de tipus microsatèl·lit, un 56% dels quals són altament polimòrfics, amb una heterozigositat mitjana del 70% (CEPH GENOTYPE DATABASE V9.0, Setembre 2000). Mitjançant l'anàlisi de lligament s'ha identificat més de 20 loci implicats en patologies de la retina i coroides en els darrers 10 anys.

Un cop s'identifica un locus, per aïllar el gen causant de la malaltia se segueix l'estratègia de **l'anàlisi de candidats posicionals**. D'acord amb els gens identificats o predits de les bases de dades del genoma humà, els models animals han ajudat en molts casos a la identificació de gens candidats potencials.

A més de l'anàlisi de lligament, alguns gens implicats en la RP s'han descobert fent estudis de **candidats funcionals**. En aquest cas, no es requereix disposar de famílies grans. Senzillament, es procedeix a l'anàlisi directe dels gens candidats per funció en individus afectats i població control.

4.1.2. Classificació dels gens i loci responsables de la RP

Actualment, els gens associats a la RP poden ser classificats tenint en compte diferents paràmetres. Si bé la distribució clàssica es basa en el tipus d'herència, es poden classificar en 6 grups funcionals d'acord amb la seva contribució a: 1) la cascada de fototransducció (incloent-hi els responsables del retorn a l'estat de foscor); 2) proteïnes estructurals dels discs; 3) metabolisme del retinol; 4) factors de transcripció; 5) un grup nou on s'inclouen dos gens descrits recentment que codifiquen per proteïnes que juguen un paper important en el fenomen d'splicing del mRNA; i 6) un grup de gens la funció dels quals no és clarament coneguda. El penúltim grup ha obert noves perspectives en la RP ja que són gens que s'expressen ubiquament però només provoquen defectes a nivell dels bastons, al contrari de tots els gens descrits fins ara que presenten expressió restringida a la retina (Baehr i Chen, 2001).

A la Taula 6 es recullen els loci implicats en RP en els que encara no s'ha identificat el gen. En aquesta taula la classificació està feta segons el tipus d'herència. A la Taula 7 es descriuen tots els gens RP caracteritzats fins avui. No s'inclouen les formes sindròmiques.

Taula 6. Loci responsables de RP en els que encara no s'ha descrit el gen corresponent (RetNet).

Posició cromosòmica	Locus	Referència
AD		
1q13-23	RP18	Xu i col.,1996
7p15.1-p13	RP9	Inglehearn i col.,1993
17q22	RP17	Bardien i col.,1995
AR		
2p11-16	RP28	Gu i col.,1998
2q31-q33	RP26	Bayés i col.,1998
4q32-q34	RP29	Payne i col.,2000
6q14-q21	RP25	Ruiz i col.,1998
14q11	RP16	Bruford,1994
16p12.1-p12.3	RP22	Finckh i col.,1998
LX		
Xp22	RP23	Hardcastle i col.,2000
Xq21.3-p21.2	RP6	Ott i col.,1990
Xq26-27	RP24	Gieser i col.,1998

AD: autosòmica dominant; AR: autosòmica recessiva; XL: lligada al cromosoma X.

Taula 7. Gens RP identificats fins avui dia (RetNet; Wang i col., 2001).

Gen (grups funcionals)	Posició crom.	Tipus d'herència	Referència
Fototransducció			
Rodopsina (<i>RHO</i>)	3q21-q24	AD/AR	Rosenfeld i col.,1992
Fosfodiesterasa GMPc α (<i>PDE6A</i>)	5q31.2-q34	AR	Huang i col.,1995
Fosfodiesterasa GMPc β (<i>PDE6B</i>)	4p16.3	AR	Huang i col.,1995
Canal catiónic GMPc α (<i>CNGA1</i>)	4p14-q13	AR	Dryja i col.,1995
Canal catiónic GMPc β (<i>CNGB1</i>)	16q13-q21	AR	Bareil i col.,2001
Arrestina (<i>SAG</i>)	2q37.1	AR	Nakazawa i col.,1998
Proteïnes estructurals			
Periferina (<i>RDS</i>)	6p21.1-cen	AD/ Dig	Kajiwara i col.,1991/1995
<i>ROM-1</i>	11q13	AD/ Dig	Kajiwara i col.,1995
Metabolisme del retinol			
<i>RLBP1</i>	15q26	AR	Maw i col.,1997
<i>RPE65</i>	1p31	AR	Morimura i col.,1998
<i>ABCA4</i>	1p21-p13	AR	Martínez-Mir i col.,1998
<i>RGR</i>	10q23	AD/AR	Morimura i col.,1999
Factors de transcripció			
<i>NRL</i>	14q11.1-11.2	AD	Bessant i col.,1999
<i>CRX</i>	19q13.3	AD	Sohocki i col.,1998
<i>NR2E3</i>	15q23	AR	Gerber i col.,2001
Factors d'splicing del mRNA			
<i>PRPC8</i>	17p13.3	AD	McKie i col.,2001
<i>PRPF31=PRKCG</i>	19q13.4	AD	Vithana i col.,2001
Proteïnes de membrana			
<i>USH2A</i>	7q31.3	AR	Rivolta i col.,2000
Proteïnes de funció desconeguda			
<i>CRB1</i>	1q31-q32.1	AR	den Hollander i col.,1999
<i>MERTK</i>	2q14.1	AR	Gal i col.,2000
<i>PROML1</i>	4p	AR	Maw i col.,2000
<i>TULP1</i>	6p21.3	AR	Hagstrom i col.,1998
<i>ORP1</i>	8p11-21	AD	Pierce i col.,1999
			Sullivan i col.,1999
<i>FSCN2</i>	17q25	AD	Wada i col.,2001
<i>RPGR</i>	Xp21.1	LX	Meindl i col.,1996
<i>RP2</i>	Xp11.3-p11.2	LX	Schwahn i col.,1998

Abreviatures: *RLBP1*: Retinal binding protein 1; *PRPC8*: precursor mRNA processing protein C8; *PRPF31*: precursor mRNA processing protein F31 (human homolog of yeast pre-mRNA splicing factor); *MERTK*: c-mer protooncogene receptor tyrosine kinase; *PROML1*: prominin (mouse)-like 1; *TULP1*: tubby-like protein-1; *ORP1*: oxygen-regulated photoreceptor-1; *RGR*: RPE-retinal G protein-coupled receptor; *NR2E3*: nuclear receptor subfamily 2 group E3; *FSCN2*: retinal fascin; *RP2*: Retinitis pigmentosa protein 2.

4.1.3. Estratègies per a la cerca de mutacions

Perquè un gen candidat sigui caracteritzat com a responsable o causant d'una patologia s'ha de demostrar que hi ha mutacions en aquest gen presents en els pacients i no detectades en població control. Per això, es disposa de diverses tècniques àmpliament descrites en la bibliografia. L'anàlisi de SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*), el DGGE (*Denaturing Gradient -Gel Electrophoresis*) i la detecció d'heterodúplex són tres estratègies metodològiques molt emprades en la dècada dels 90 (Orita, 1989; Cremonesi i col., 1997; Cremonesi i col., 1999). Cap d'elles, però, garanteix un 100% d'eficiència de detecció. La seqüenciació directe de les zones exòniques i de les regions intròniques flanquejants assegura una eficiència màxima i, per altra part, el desenvolupament d'equips nous de seqüenciació que permeten l'anàlisi d'un nombre elevat de mostres amb un temps d'execució molt reduït, ha facilitat el seu ús.

Les anàlisis de cosegregació i homozigotitat representen un primer pas per reduir el nombre de mostres a seqüenciar, ja que permeten excloure la implicació d'un determinat locus/gen patogènic en una família mitjançant l'anàlisi de marcadors polimòrfics flanquejants i/o intragènics. En les famílies consanguínies, a més, el criteri d'homozigotitat és una estratègia addicional, i a vegades l'única, que facilita l'exclusió del gen en una primera fase. Si l'al·lel és idèntic per descendència, esperarem que els individus afectats en una mateixa família siguin homozigots. La combinació d'ambdues estratègies ha permès detectar un gran nombre de variants en gens candidats associats a degeneracions de la retina.

4.2. ANÀLISI DE GENS I LOCI RESPONSABLES D'arRP

4.2.1. Antecedents

Els gens i loci descrits com a causants de les formes recessives no sindròmiques de la malaltia han estat descrits per anàlisi de lligament en famílies concretes, o per l'anàlisi de gens candidats posicionals o funcionals. S'han trobat mutacions recessives als gens *RPE65*, *ABCA4*, *CRB1*, *MERTK*,

SAG, RHO, PDE6B, CNGA1, PDE6A, TULP1, RGR, NR2E3, RLBP1, PROM1, CNGB1 (Taula 7, apartat 4.1.2.). Per lligament genètic s'han caracteritzat els loci següents: *RP28, RP26, RP29, RP25, RP16* i *RP22* (Taula 6, apartat 4.1.2.). La majoria d'aquests gens s'expressen en les cèl·lules fotoreceptores, alguns en el RPE, com *RPE65* i *RLBP1*, i fins i tot en les cèl·lules de Müller com és el cas de *RLBP1* (Wang i col., 2001).

4.2.2. Gens candidats i loci analitzats en 52 famílies espanyoles

Abans de l'inici d'aquesta tesi, s'havien analitzat diferents gens i loci de RP, la major part amb herència recessiva i algun cas símplex, en un grup de 52 famílies espanyoles. Un 61% d'aquestes famílies eren consanguínies. Nou gens candidats (*RHO, PDE6A, PDE6B, PDE6G* [subunitat γ inhibidora de la fosfodiesterasa del cGMP], *RDS, ROM-1, SAG, RCV, NRL*) havien estat assajats per cosegregació i homozigositat seguit de SSCP per tal de caracteritzar mutacions. A més, en dues famílies consanguínies d'aquesta col·lecció, es van mapar dos nous loci d'arRP (*RP19* i *RP26*) per anàlisi de lligament (Martínez-Mir i col., 1997; Bayés i col., 1998), i també es van analitzar per cosegregació els loci *RP12, RP14*, 6p i 1q. Amb tot, només es van trobar mutacions a *PDE6B*, on es van caracteritzar tres variants en homozigosi en tres famílies diferents (Bayés i col., 1995; Valverde i col., 1996a; Valverde i col., 1996b). En aquesta tesi s'ha proseguit el treball iniciat analitzant nous gens candidats d'arRP en el mateix panell de famílies.

4.2.3. Gens i loci analitzats en aquest treball

ABCA4 s'ha considerat en l'apartat 3 de la introducció (pàg. 27-32) pel fet que s'ha associat a d'altres retinopaties, malgrat ha estat objecte intens d'estudi com a gen candidat.

4.2.3.1. *TULP1*

El ratolí Tubby és un model animal natural d'un fenotip sindròmic que inclou RP, obesitat, resistència a la insulina i defectes sensorials que li provoquen sordesa. El gen responsable d'aquest fenotip és Tub, el primer membre d'una família anomenada TULP (*Tubby-like proteins*) present en plantes, invertebrats i vertebrats (Noben-Trauth i col., 1996). Les diverses proteïnes TULP difereixen en els extrems N-terminals però les seves regions C-terminals estan conservades i en aquest extrem es troben uns 260 aminoàcids que defineixen el domini Tubby. En els humans s'han descrit 4 membres d'aquesta família amb patrons d'expressió diferents: TUB s'expressa ubiquament; *TULP1* s'expressa

exclusivament a les cèl.lules fotoreceptores; *TULP2* es detecta a retina i a testicle, i finalment *TULP3* s'expressa a les neurones ganglionars de la retina i a la capa nuclear interna (North i col., 1997; Nishina i col., 1998; Ikeda i col., 1999).

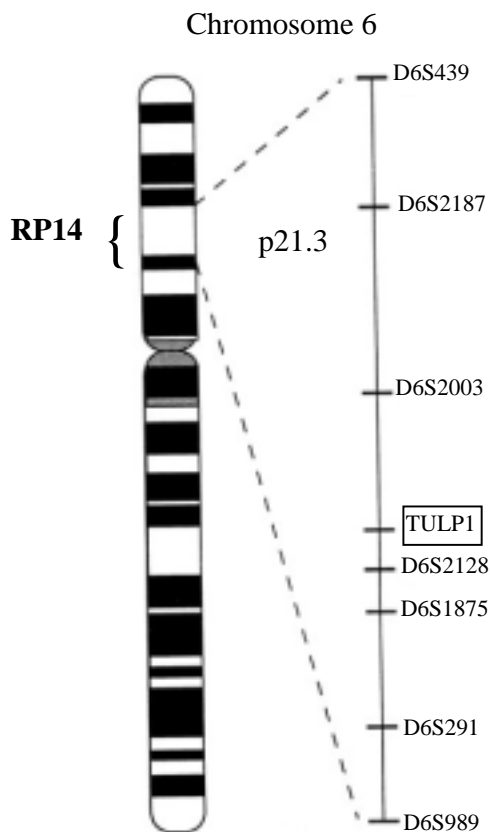


Figura 17. Localització del locus *RP14* i el gen *TULP1* en el braç curt del cromosoma 6 (adaptada de North i col., 1997).

TULP1 va ser clonat i mapat a 6p21.3 per hibridació *in situ* fluorescent (FISH) per North i col. El seu patró d'expressió i l'homologia de seqüència descrita amb el gen *Tub*, que afecta la visió del ratolí Tubby, van suggerir que podria ser un bon candidat pel locus *RP14* (Figura 17). Es va descriure lligament amb *RP14* en una extensa família arRP dominicana (Knowles i col., 1994).

TULP1 dicta la síntesi d'un cDNA de 2116 pb i codifica per una proteïna de 542 aminoàcids (North i col., 1997). Conté 15 exons i ocupa una regió genòmica de 11Kb (Banerjee i col., 1998). Per homologia de seqüència no s'ha pogut inferir la seva funció, i tampoc es coneix la funció de la resta de membres d'aquesta família. L'estudi fenotípic dels ratolins *Tulp1* *-/-* (Hagstrom i col., 1999; Ikeda i col., 1999), i els assaigs immunohistoquímics (Kikuchi i col., 2000) han suggerit que *TULP1* participaria en el transport de la rodopsina des del lloc de síntesi fins la seva correcta posició als segments externs. D'altra banda, *TUB* i *TULP1*, tot i pertànyer a la mateixa família i expressar-se al mateix teixit, no són

proteïnes intercanviables funcionalment. Si bé els ratolins heterozigots dobles per a mutacions a *TUB* i *TULP1* presenten un fenotip normal, en els homozigots per mutacions en qualsevol dels dos gens s'observa degeneració dels fotoreceptors (Hagstrom i col., 2001).

Durant el transcurs d'aquesta tesi tres grups van descriure mutacions en el gen *TULP1* (*RP14*) en pacients afectats d'arRP (Hagstrom i col, 1998; Banerjee i col, 1998; Gu i col., 1998). Totes les mutacions detectades afecten l'extrem C-terminal conservat. Els fenotips observats en aquests pacients són, comparativament amb els d'altres gens causants d'arRP, molt més severos. A més, no presenten cap símptoma relacionat amb sordesa o obesitat.

4.2.3.2. *CNGA1*

El gen *CNGA1* (4p14-q13) codifica per la subunitat α del canal catiònic dependent de cGMP situat a la membrana plasmàtica del segment extern dels bastons. Aquests canals juguen un paper important en el procés de fototransducció controlant l'entrada de cations de sodi i de calci al segment extern del fotoreceptor com a resposta a canvis en les nivells de cGMP (veure Figura 4 de l'apartat 1.2.2.) (Molday i Hsu, 1995). En humans, aquests canals són vies transportadores de ions formades per complexos heterotetramèrics de dues subunitats α (63KDa) i dues β (240KDa) (Chen i col., 1993; Chen i col., 1994). A més, s'ha descrit una subunitat γ de funció desconeguda que forma un complex amb la subunitat β . La clonació de les proteïnes del canal catiònic dels cons ha posat de manifest que bastons i cons expressen proteïnes diferents per aquests transportadors (Bonigk i col., 1996; Wissinger i col., 1997). Ambdues subunitats α i β presenten una regió central de 6 segments transmembrana, un domini d'unió al cGMP, un motiu de tipus sensor de voltatge i un porus (Dhallan i col., 1992; Pittler i col., 1992).

CNGA1 conté 10 exons, els dos primers no són codificants, i la unitat transcripcional abarca més de 40 Kb. El seu cDNA té 2082 pb, i la proteïna 686 aminoàcids (Dhallan i col., 1992; Pittler i col., 1992; Griffin i col., 1993).

S'han descrit 5 mutacions a *CNGA1*, totes elles *null*, associades a casos d'arRP (Dryja i col., 1995b). La subunitat codificada per *CNGA1* pot per ella mateixa formar un canal funcional, mentre que s'hipotetitza que la subunitat β tindria merament una activitat reguladora (Molday i col., 1999).

Recentment, s'ha descrit una mutació recessiva a la subunitat β dels bastons (*CNGB1*) localitzada a 16q13-q21, que en homozigosi causa arRP (Bareil i col., 2001).

4.2.3.3. *RPGRIP1*

RPGR (*Retinitis pigmentosa GTPase regulator*) correspon al locus RP3 situat al cromosoma X. La funció de *RPGR* és desconeguda, però es creu que interacciona amb la subunitat δ de la PDE (*PDE6D*) dels bastons (Linari i col., 1999). Si bé l'expressió de *RPGR* és ubiqua, mutacions en aquest gen donen un fenotip patològic restringit a la retina. La major part d'aquestes afecten el domini anomenat RHD, de *RCC1 homologous domain*, on *RCC1* codifica per un factor intercanviador de guanines de GTPases (GEF). La presència del domini RHD a *RPGR* suggereix una funció reguladora d'alguna proteïna G desconeguda (Vervoort i col., 2000). Quan el domini RHD es troba mutat, la unió de *RPGR* a les proteïnes diana queda bloquejada.

Mitjançant el sistema de dos-híbrids de llevat, s'ha tractat de caracteritzar proteïnes que interaccionin amb RPGR, i concretament al domini RHD (Boylan i Wright, 2000; Roepman i col., 2000). El crivellatge d'una llibreria de cDNA de retina bovina ha permès identificar **RPGRIP1** (*RPGR interacting protein 1*). El gen humà corresponent, amb 15 exons predits, ha estat mapat a 14q11, coincidint amb el locus *RP16*. Curiosament, *NRL* (*Neuronal Retina Leuzine zipper*), un factor de transcripció específic de retina també se situa a la mateixa regió cromosòmica. Pel que fa al patró d'expressió, *RPGRIP1* es detecta en molts teixits en bovins, mentre que en humans només s'ha detectat a testicle i retina (Boylan i Wright, 2000). S'han fet estudis de l'expressió de les mutacions descrites en el domini RHD de *RPGR* (descrites com a causants de xLRP) i s'ha pogut demostrar que bloquegen la unió RPGR-RPGRIP1. Pel que fa a la proteïna RPGRIP1, sembla estar relacionada amb el transport vesicular en els bastons (Roepman i col., 2000). Estudis immunohistoquímics han revelat que RPGRIP1 és un component del cili connector dels bastons i dels cons, i que una de les seves funcions és l'anclatge de RPGR al cili. Aquest fet suggereix un paper de *RPGRIP1* com a regulador del transport d'algunes proteïnes des del segment intern, on són sintetitzades, al segment extern on realitzen la seva funció. El gen *RPGRIP1* és un nou candidat per a la RP i pel locus *RP16* (Hong i col., 2001).

S'han dut a terme les primeres cerques de mutacions en *RPGRIP1* en pacients afectes de RP i de l'amaurosi congènita de Leber (LCA), una altra distròfia de retina responsable d'una ceguesa congènita (Dryja i col., 2001; Gerber i col., 2001). Si bé fins ara s'han descrit un total de 13 mutacions associades a la LCA, no s'ha detectat cap variant en pacients RP. Recentment s'han descrit 9 exons codificants a 5' del gen que s'han d'afegir als 15 exons inicialment predits (Figura 18).

Figura 18. Exons/introns de *RPGRIP1*. S'assenyalen els 9 exons predits recentment a 5' del gen (Gerber i col., 2001).

4.2.3.4. *MERTK*

MERTK codifica per un receptor tirosina-quinasa (Gal i col., 2000). Va ser descobert quan tractaven de caracteritzar el locus responsable del fenotip de pèrdua de visió de la rata RCS (Royal College of Surgeons) (Dowling i Sidman, 1962). Aquest animal és un model clàssic per a l'estudi de degeneracions de retina malgrat que no es coneixia el defecte genètic responsable d'aquest fenotip. A nivell patofisiològic, s'havia observat una alteració en el procés de fagocitosi dels fragments externs dels fotoreceptors i, en conseqüència, hi havia una pèrdua progressiva de bastons i cons (Bok i Hall, 1971).

Mitjançant clonació posicional es va identificar el defecte molecular subjacent (D'Cruz i col., 2000). Es tracta d'una deleció que afectava el lloc acceptor d'*splicing* del segon exó d'un receptor tirosina-quinasa anomenat *Mertk*. La unió dels exons 1 i 3 produïa un canvi en la pauta de lectura i es generava un codó d'aturada prematura de la traducció. L'ortòleg humà de *Mertk* s'ha situat al cromosoma 2q14.1.

Una cerca exhaustiva de mutacions al gen *MERTK* humà en tres pacients afectes de RP va permetre identificar 3 mutacions. Així es demostrava la relació entre un procés de fagocitosi dels segments externs defectuosos i la gènesi de distròfies de retina humanes (Gal i col., 2000).

El gen *MERTK* té un cDNA de 2195pb i està estructurat en 19 exons codificants (Figura 19). Dóna lloc a una proteïna de 984 aminoàcids i presenta dominis de tipus IG, fibronectina, transmembrana i tirosina-quinasa conservats (Gal i col., 2000).

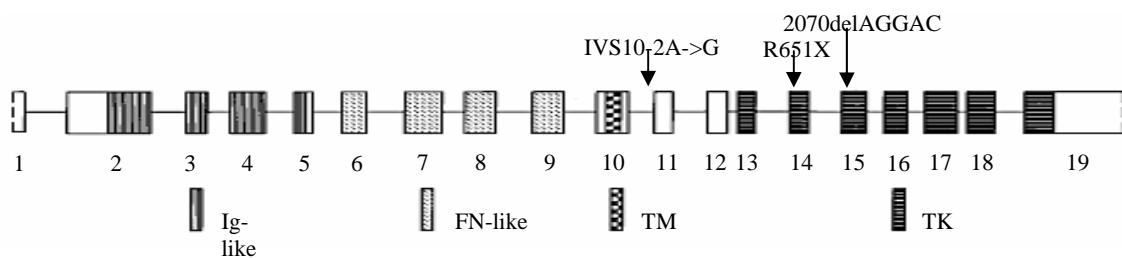


Figura 19. Estructura gènica de *MERTK* on se senyalen els dominis proteics coneguts i les tres mutacions identificades en aquest gen en pacients RP (Gal i col., 2001).

4.2.3.5. RPE65

RPE65 codifica una proteïna de 61 kD específica de l'epiteli pigmentari de la retina que representa més d'un 10% del contingut proteic d'aquest teixit. El gen es troba altament conservat en vertebrats i la seva funció està vinculada d'alguna manera al metabolisme de la vitamina A (Wright, 1997). D'una banda, s'ha establert que *RP65* s'associa amb l'11-cis-retinol deshidrogenasa. D'altra banda, s'ha proposat que sigui la fotoisomerasa que catalitza el pas del tot-trans-retinol a la forma 11-cis, ja que el ratolí deficient en *RPE65* acumula ésters de tot-trans-retinil i no produeix 11-cis-retinoids. A més a més, en aquest ratolí no s'observa rodopsina funcional malgrat que l'opsina està present a la membrana dels discs (Redmond i Hamel, 2000).

El gen *RPE65* va ser mapat a 1p31 (Hamel i col., 1994) i conté 14 exons codificants en una regió genòmica de 20 Kb. S'han descrit mutacions *null* que donen lloc a distròfies severes de la retina com són l'amaurosi congènita de Leber (LCA), casos recessius de la distròfia de retina severa de l'infantesa (arCSR) i també la arRP juvenil (Gu i col., 1997; Marlhens i col., 1997). Mutacions en *RPE65* explicarien un 16% dels casos de LCA, un 5% dels casos de arCSR i un 2% dels casos de arRP (Morimura i col., 1998).

4.2.3.6. El locus *RP25*

El mapatge de receptors de l'àcid γ -aminobutíric (GABA) -el neurotransmissor més important del sistema nerviós central- per la seva associació a la RP, va dur a la identificació d'una regió d'homozigositat al braç llarg del cromosoma 6, entre els marcadors D6S257 i D6S1644, que cosegregava amb la malaltia (Ruiz i col., 1998). En aquest nou locus de 16.1 cM, anomenat ***RP25***, es localitzen dues subunitats del receptor GABA [*GABRR1* i *GABRR2*] (Bormann i Feigenspan, 1995), i solapa amb els loci *CORD7* (responsable de la distròfia de cons i bastons) i *STGD3* (responsable de la malaltia de STGD amb herència dominant).

L'estudi del locus *RP25* en una família paquistaní va permetre reduir l'interval inicial de 16 a 2.4 cM, entre els marcadors D6S257 i D6S430 i, així, va quedar exclòs *CORD7* (Ruiz i col., 1998). Els candidats GABA d'aquesta regió també quedaven exclosos (Khaliq i col., 1999). Tot i això, es va realitzar la cerca de mutacions en els gens *GABRR1* i *GABRR2* en les famílies espanyoles, i no es va detectar cap variant (Marcos i col., 2000). El nou interval definit no conté candidats clars però s'hi han descrit ESTs de cervell i algunes d'elles d'expressió a la retina (Khaliq i col., 1999).

Recentment s'ha descrit un nou gen *ELOVL4* (Zhang i col., 2001) com a responsable del fenotip *STGD3* i també de la distròfia macular autosòmica dominant (ADMD). El fet que aquest gen es

localitzi dins l'interval d'homozigositat del locus *RP25* i la implicació d'aquest locus en l'arRP en famílies espanyoles ha portat a Li i col. (2001) a analitzar-lo. El resultat ha estat l'exclusió del gen *ELOVL4* com a causant del fenotip *RP25* i per tant *STGD3/ADMD* i *RP25* no estan causades per variants al·lèliques del mateix gen.

5. MODELS ANIMALS.

Els models animals han estat de gran ajuda per a descobrir gens responsables de diferents patologies de la retina. Els models naturals s'han descobert a través de fenotips concrets i posteriorment s'ha identificat la causa genètica de l'alteració. Els diferents tipus de models transgènics han permès conèixer alguns dels processos que es desencadenen a partir de variacions en un gen determinat. Aquest és un camp molt ampli que presenta grans perspectives de futur en relació a teràpies que posteriorment es podrien aplicar a l'home. En aquest apartat es parlarà de *Drosophila* com a organisme model i de models de vertebrats, tant naturals com transgènics, que han permès ampliar el coneixement de les retinopaties.

5.1. *Drosophila* COM A ORGANISME MODEL

Existeixen més semblances que no diferències entre els fotoreceptors de vertebrats i els d'invertebrats. Ambdós grups presenten una compartimentació específica on hi trobem la maquinària de fototransducció, ja sigui en forma de discs membranosos en els vertebrats o en forma de prolongacions membranoses dins una estructura cilíndrica com és el rabdòmer en *Drosophila*. El potencial genètic únic de *Drosophila* ha permès identificar els components de la cascada de fototransducció i també les anàlisis fisiològiques que han suposat la comprensió dels processos moleculars dins el fotoreceptor. Actualment s'han clonat més de 20 gens a *Drosophila* amb mutacions que generen defectes en la visió (Hardie i Raghu, 2001).

5.2. MODELS ANIMALS VERTEBRATS

La majoria dels models animals vertebrats de què disposem avui dia són models murins. Existeixen, però, diferents grups que treballen amb models transgènics canins i porcins, més propers als humans.

5.2.1. Models animals naturals

El **ratolí *rd*** presenta un fenotip de degeneració retiniana equivalent a la RP humana que s'hereta de manera autosòmica recessiva. A principi dels anys 90, es va determinar que aquest fenotip resultava de defectes al gen *Pdeb*, l'homòleg murí del gen *PDE6B* (Bowes i col., 1990; Bowes i col., 1993; Pittler and Baehr, 1991). Els estudis fisiopatològics realitzats en aquest ratolí han mostrat elevats nivells de cGMP a la retina, que comporten un augment de la conductància a través dels canals depenents de cGMP, i la conseqüent alteració dels gradients electroquímics que poden arribar a ser la causant de la mort cel·lular. A més a més, l'entrada massiva de ions de calci a la cèl·lula pot estimular l'apoptosi (Pierce, 2001).

El **ratolí *rds*** (*retinal degeneration slow*) amb fenotip similar a la RP humana, és homozigot per a una mutació *null* al gen de la periferina/*RDS* (Travis i col., 1989). Pel que fa a la patofisiologia aquest ratolí no pot desenvolupar correctament els segments externs dels fotoreceptors, incloent els discs, fet que demostra que la proteïna té una funció estructural essencial per a la correcta formació d'aquests. Encara no es coneix com les cèl·lules fotoreceptores del ratolí *rds* entren en apoptosi (Travis i col., 1989).

La **rata *RCS*** (*Royal College of Surgeons*) també presenta alteracions de la visió semblants a la RP humana. L'alteració fisiopatològica aparent en aquest animal està relacionada amb la fagocitosi correcta dels segments externs dels fotoreceptors per part del RPE i es va proposar que en la rata *RCS* potser mancava un receptor específic del RPE necessari pel reconeixement d'un lligant present al segment extern dels fotoreceptors (McLaughlin i col., 1994). Actualment aquesta hipòtesi ha estat validada amb la caracterització de *Mertk* (D'Cruz i col., 2000).

En un **gos deficient natural per *RPE65*** s'han detectat les disfuncions típiques de la malaltia de Leber humana. En aquest model s'ha introduït una còpia silvestre del gen i s'ha observat una total recuperació de la funció visual. Fins llavors, la transferència d'una còpia silvestre sols produïa un alentiment de la pèrdua de la funció visual sense promoure una recuperació total de la visió (Acland i col., 2001).

Aquests models naturals han servit posteriorment de base per a generar transgènics, en els que s'ha introduït la còpia silvestre del gen corresponent i, en tots els casos, s'ha observat una reversió parcial o total del fenotip.

5.2.2. Models transgènics

S'han utilitzat models animals per deleció per determinar la funció d'una proteïna en relació a malalties de la visió. També s'ha introduït una còpia silvestre d'un gen per tal de revertir un fenotip patològic, així com construccions amb mutacions concretes per assajar el paper patogènic de les variants. Són molts els exemples que existeixen avui dia en la literatura i l'esforç en aquest camp ha permès disposar de coneixements dirigits cap a l'establiment de teràpies gèniques (Kumar-Sharma i Ehinger, 1999; Dejneka i Bennet, 2001).

6. ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES.

Actualment no existeix cap tractament eficaç pels pacients amb distròfies de la retina. El coneixement adquirit darrerament sobre la base genètica d'aquestes malalties ha millorat en alguns casos el diagnòstic de les mateixes, però no ha aportat encara cap novetat terapèutica específica. Un exemple n'és l'estudi del gen *ABCA4*, relacionat amb algunes d'aquestes patologies. La gran informació obtinguda en els darrers anys, tant a nivell de la relació genotip-fenotip, com a nivell genètic i funcional, no ha quedat reflectida en una millora terapèutica. Actualment, els esforços s'encaminen cap a incrementar o millorar la funció de transport d'ABCR i prevenir l'acumulació de productes tòxics derivats d'un mal funcionament de la proteïna (Allikmets, 2000b).

6.1. TRACTAMENTS FARMACOLÒGICS, TRASPLANTAMENTS CEL·LULARS I ALTRES APROXIMACIONS

Els pocs **tractaments farmacològics** que s'estan desenvolupant estan relacionats amb els models animals, pels quals es coneixen detalls de la seva patofisiologia. Per exemple, en el ratolí *rd* la mort dels fotoreceptors de la retina és conseqüència de la manca de producte de *PDE6B*, i s'observa una pujada dels nivells de cGMP que provoca que els canals catiònics dependents de cGMP estiguin sempre oberts. El fàrmac D-cis-diltiazem és un bloquejador dels canals de calci i la seva administració provoca un rescat de fotoreceptors en el ratolí *rd*. Malauradament aquesta teràpia no és efectiva en altres models animals de RP amb defectes primaris en altres gens (Frasson i col., 1999). A part, l'ús de factors neurotròfics per a limitar o prevenir la degeneració de la retina sembla atractiva, però cal tenir present que determinats factors de creixement poden tant estimular com inhibir la diferenciació dels fotoreceptors i afectar la seva supervivència en les diferents espècies. Farmacològicament, s'ha pensat en la necessitat d'un compost més genèric que pogués corregir algun dels processos comuns que es

donen durant la mort dels fotoreceptors, com per exemple la via apoptòtica de mort cel·lular. El principal inconvenient d'aquesta estratègia és que molts dels senyals que porten a una cèl·lula a l'apoptosi estan íntimament relacionats amb els processos de divisió cel·lular, de manera que existeix un risc elevat d'activar processos de proliferació no desitjats (Adler i col., 1999).

S'han intentat fer **trasplantaments cel·lulars** del RPE en una rata que presentava defectes en un gen expressat en aquestes cèl·lules, i s'ha aconseguit endarrerir la mort cel·lular en aquest model (Sauve i col., 1998). El principal avantatge que té el trasplantament és que substitueix totes les cèl·lules mortes per d'altres de vives. Però els inconvenients d'aquest tipus d'experiments són la dificultat d'aconseguir que els fotoreceptors sobrevisquin, que els seus segments externs es mantinguin funcionals i que es restableixin les connexions sinàptiques d'unes neurones amb altres. Alguns grups han començat a pensar en el trasplantament de cèl·lules mare (*adult neural stem cells*) per a reconstituir la retina amb l'avantatge que poden ser obtingudes del mateix individu. També s'ha proposat l'ús d'implants artificials de retina, o fins i tot l'implant de xips electrònics que permetin la conversió de la llum en impulsos nerviosos en la retina interna (Young i col., 2000; Nadig, 1999; Eckmiller, 1997). Algunes d'aquestes aproximacions ja han estat assajades en pacients RP però cap d'ells ha experimentat una millora de la seva malaltia. Les dificultats que plantegen aquests tractaments en humans són moltes, entre elles l'obtenció molt limitada de cèl·lules de donants i les dificultats que comporta fer-les sobreviure a partir del cultiu primari. En canvi, un avantatge és que els mecanismes de rebuig del pacient són mínims (Kumar-Sharma i Ehinger, 1999; Lund i col., 2001).

Fora de l'àmbit dels trasplantaments, s'ha estudiat la possibilitat de realitzar **rotacions de la retina** en pacients que tenen defectes en la regió macular de l'ull però que presenten preservació de la retina perifèrica, com és el cas de la malaltia de STGD o la DMAE (Sun i Nathans, 2001). Amb aquesta tècnica la retina se separa momentàniament del RPE, es fa girar uns quants graus respecte de la seva posició inicial i es torna a unir a les cèl·lules del RPE. Si la fòvea (centre que facilita l'agudesa visual) és la zona alterada, ara aquesta se situarà sobre cèl·lules del RPE més cap a la perifèria que, per tant, no es troben afectades, facilitant així la recuperació de la seva funció. Aquesta aproximació presenta molts problemes, entre ells l'arribada de senyals oposats al cervell per part dels dos ulls i la pèrdua de la visió binocular, fet que la converteix en una estratègia molt arriscada.

Per últim, resta comentar quelcom evident referent a l'adquisició d'hàbits de vida que evitin l'exposició del pacient als factors de risc exògens que es van coneixent (llum, dèficit dietètic de vitamina A). Si bé això no constitueix una teràpia, sí que és una estratègia preventiva que probablement alenteixi el progrés de la malaltia.

6.2. TERÀPIA GÈNICA

L'accessibilitat de l'ull i la tendència que tenen els teixits oculars a un cert grau de privilegi immunològic, han afavorit el desenvolupament de la teràpia gènica ocular (Della, 1996). La correcció somàtica d'un defecte genètic aplicant alguna forma de teràpia gènica és un fet esperat. Qüestions ètiques, clíniques i tècniques fan que aquestes aproximacions siguin difícils de portar a terme però no inabordables, com s'ha pogut demostrar àmpliament en experiments realitzats amb models animals. Un dels avantatges de la teràpia gènica és que no és necessari conèixer a fons la funció del gen defectiu, únicament cal saber introduir una còpia correcte del gen o del seu producte gènic a un teixit ocular concret.

Avui dia hi ha dues estratègies de teràpia gènica en etapa d'experimentació. La primera va dirigida a corregir un defecte genètic, introduint gens "funcionals" en les cèl·lules afectades. Normalment aquestes cèl·lules són els fotoreceptors o les cèl·lules del RPE. En els casos recessius, on les mutacions suposen una pèrdua de funció, la introducció d'una còpia normal podria resoldre el problema. Però en els casos de dominància, aquests experiments serien més complexos. S'hauria d'introduir alguna molècula (RNA antisentit o ribozim) capaç de bloquejar la síntesi de la proteïna anòmala, i potser també seria necessari introduir al mateix temps una còpia silvestre del gen. La segona via va dirigida a minimitzar les conseqüències de l'alteració sense corregir el defecte genètic. Aquesta aproximació seria bona tant pels casos dominants com pels recessius (Bessant i col., 2001). Cal tenir en compte que la teràpia gènica no pot actuar sobre aquells fotoreceptors que ja han patit la mort cel·lular, però en canvi sí que podria endarrerir la pèrdua de nous fotoreceptors i, per tant, mantenir la visió durant més temps. Si comparem les dues aproximacions, la primera requereix formes més específiques de tractament, mentre que la segona podria ser utilitzada, si no en tots, en la majoria dels pacients amb degeneració de la retina i podria millorar la qualitat de vida a un grup més nombrós de població.

S'han realitzat proves d'injecció intraocular de factors neurotròfics recombinants (anti-apoptòtics) per endarrerir la degeneració dels fotoreceptors en diferents models animals de distròfia de retina (LaVail i col., 1998). Però els beneficis d'aquesta administració no duren gaire possiblement perquè la vida mitjana de les proteïnes recombinants és bastant curta. Actualment, el problema principal és que els processos cel·lulars que donen lloc a la mort per apoptosi dels fotoreceptors no són ben coneguts, i no depenen d'un defecte genètic concret sinó que les interaccions cel·lulars hi juguen un paper important.

Un aspecte clau de les estratègies de teràpia gènica ocular és garantir l'eficiència i seguretat del procés de transferència gènica. S'està investigant intensament en aquest camp, també sobre els models animals, i s'ha demostrat que els vectors vírics més efectius per a introduir un determinat gen a un

determinat nivell de la retina o directament a un fotoreceptor adult són els virus adeno-associats (Ali i col., 1996; Flannery i col., 1997; Kumar-Singh i Farber, 1998). Un exemple és la utilització de vectors vírics adeno-associats units a ribozims per a tractar rates amb defectes a la RHO, que són models d'adRP. Els autors han demostrat la reversió de la mort cel.lular dels fotoreceptors (LaVail i col., 2000). Estratègies amb aquest tipus d'enzims ja s'han utilitzat en models porcins de adRP demostrant així que aquest tipus d'aproximació pot ser viable en humans en un futur proper (Lynn i col., 2001).

7. EL DIA A DIA DELS PACIENTS AMB DISTRÒFIA DE RETINA: COM HI VEUEN I QUÈ PODEN FER PER FER FRONT A LA PÈRDUA PROGRESSIVA DE VISIÓ.

7.1. COM HI VEUEN



Figura 20. Tres imatges que simulen com hi veuen els pacients afectats de les malalties estudiades. A: visió normal, B: visió amb defecte a la regió macular de la retina (com és el cas de la malaltia de Stargardt o la DMAE) i C: visió amb defecte a la retina perifèrica (per exemple la RP).

7.2. QUÈ PODEN FER

El dia a dia dels pacients afectats de les malalties esmentades és una realitat. La principal ajuda que poden rebre els pacients de STGD, durant els 2 o 3 primers anys de malaltia, és l'ús d'ulleres que els facilitin la visió d'aprop, com els pacients que manifesten la DMAE (Merin, 1991). Gerber i col. van suggerir la protecció contra els raigs ultraviolats amb ulleres fosques pels pacients STGD. Aquest suggeriment es basava en què el tot-trans-retinal només s'obté com a resultat de l'activació de la RHO. Si estem en condicions de foscor, l'acumulació de A2E no es donarà o quedarà reduïda, i hi haurà una preservació o un retard en la progressió de la pèrdua de visió en els pacients. Tant pels pacients STGD com pels RP s'ha postulat que l'exposició directe a la llum pot accelerar el procés de degeneració en la retina i a tots ells se'ls recomana la utilització d'ulleres fosques. D'altra banda en els pacients RP, la ceguesa nocturna i la pèrdua de visió perifèrica comporten que la conducció sigui perillosa. Tot i que en estadis inicials els pacients encara condueixen, ràpidament són aconsellats a deixar de fer-ho.

Aquesta tesi s'emmarca dins una línia de treball, iniciada ara fa quinze anys, que tenia com a objectiu l'anàlisi genètica i molecular de les formes autosòmiques recessives de la Retinitis pigmentosa. Una de les estratègies emprades per a l'estudi d'un grup de famílies espanyoles va ésser l'anàlisi de lligament. Així vàrem identificar *ABCA4* - prèviament associat a la degeneració macular de Stargardt - com a responsable de la RP en una de les nostres famílies. Aquest fet suggeria una heterogeneïtat al·lèlica que vàrem voler aprofundir. D'altra banda, els nostres estudis, juntament amb els d'altres autors, avalaven l'estratègia dels gens candidats per determinar les bases genètiques de la Retinitis pigmentosa i d'altres distròfies retinianes. Basant-nos en aquests treballs previs vàrem plantejar-nos els següents objectius:

1. Estudi de l'heterogeneïtat al·lèlica d'*ABCA4*, mitjançant l'anàlisi de les variants genètiques associades a diverses distròfies retinianes, i entre elles la RP.

2. Anàlisi de nous gens i loci candidats d'arRP - *TULP1*, *CNGA1*, *RPGRIP1*, *RPE65*, *MERTK* i *RP25* - en el panell de 52 famílies espanyoles, per tal de determinar les bases genètiques de la patologia en aquelles famílies que no havien estat caracteritzades en treballs anteriors.

Introducció als resultats

Els resultats d'aquest treball es recullen en dos capítols. En el capítol 1 es presenten els estudis realitzats sobre *ABCA4* i la seva associació amb diferents distròfies retinianes. Aquest capítol es subdivideix en dos grans blocs. El primer correspon a l'anàlisi d'aquest gen en un grup de pacients espanyols afectats de distròfies retinianes autosòmiques recessives. En l'apartat 1.1.1 es presenten els resultats de la cerca de mutacions en una família afectada d'arRP. Es demostra que mutacions en aquest gen, inicialment descrit com a responsable de la malaltia de Stargardt, poden ser la causa d'aquesta altra patologia retiniana d'afectació perifèrica. A més, l'estudi de les correlacions genotip-fenotip en un grup de pacients afectes de diferents distròfies maculars demostra la gran heterogeneïtat al·lèlica d'*ABCA4* (apartat 1.1.2.). En els apartats 1.1.3 i 1.1.4 es descriuen els estudis d'altres famílies analitzades en relació a aquest gen. El segon bloc correspon a dues col.laboracions multicèntriques amb l'objectiu d'esbrinar: 1) la possible associació de variants d'*ABCA4* amb la degeneració macular associada a l'edat (apartat 1.2.1); i 2) l'origen de la mutació 2588G->C (apartat 1.2.2).

En el capítol 2 es presenta l'anàlisi de diversos gens i loci en un grup de 52 famílies espanyoles afectades d'arRP. Els apartats 2.1 i 2.2 recullen els resultats de la cerca de mutacions en els gens *TULP1* i *CNGA1* respectivament, ja en format article i en l'apartat 2.3 es presenten les anàlisis de *RPE65*, *MERTK*, *RPGRIP1* i el locus *RP25* en el mateix grup de pacients.

L'ordre i distàncies genètiques de tots els marcadors analitzats en aquest treball han estat actualitzats amb l'última versió del projecte genoma humà que es pot consultar a la web UCSC Human Genome Working Draft [<http://genome.cse.ucsc.edu/>](Kent i Haussler, 2001).

Durant el desenvolupament d'aquest treball s'han utilitzat dades de mapatge genètic d'alguns gens i loci obtingudes anteriorment pel mateix equip, i altres dades que provenen del mapa de Marshfield [<http://research.marshfieldclinic.org>]. Els marcadors emprats en les anàlisis de cosegregació i homozigositat es presenten seguint l'ordre i les distàncies actuals, tot i que en algun cas la situació d'aquests ha variat substancialment respecte la coneguda en el moment de portar a terme les anàlisis. En aquests casos, s'indica endemés l'ordre i distàncies inicials.

Capítol 1

Heterogeneïtat al·lèlica

1.1. ANÀLISI DEL GEN *ABCA4* EN UN GRUP DE FAMÍLIES I PACIENTS ESPANYOLS AFECTATS DE DIFERENTS DISTRÒFIES DE LA RETINA

1.1.1. *ABCA4* i la retinitis pigmentosa

Treballs anteriors d'aquest grup havien descrit en una família RP, la M-33, un nou locus per arRP (*RP19*) a la posició 1p13-p21. La posició física dels marcadors emprats coincidia amb la del locus responsable de la malaltia de Stargardt i fundus flavimaculatus (*STGD1*). Seguidament, altres autors van caracteritzar el gen *ABCA4* en aquesta regió cromosòmica i es va demostrar que era el causant de la major part dels casos de Stargardt analitzats. Com que el lligament indicava que ens trobàvem en la mateixa regió cromosòmica, vam analitzar aquest gen en els individus afectes de la família M-33. Vam trobar que els pacients presentaven la mutació 1847delA en homozigosi. Aquesta deleció generava un codó prematur d'aturada de la traducció. La mare i el fill sa eren portadors de la mateixa. En canvi, les mutacions de Stargardt descrites fins aleshores eren "lleus", del tipus de substitucions nucleotídiques que generaven canvis d'aminoàcid. En el treball que segueix es descriu la mutació esmentada i es proposa un model que correlaciona el tipus de mutació d'*ABCA4* amb la severitat de la patologia. Substitucions nucleotídiques associades a una pèrdua parcial de funció causarien Stargardt, mentre que una absència total de funcionalitat seria responsable de RP.

Els resultats esmentats es presenten en el treball següent: "*Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR*".

1.1.2. ABCA4 i les distròfies maculars

La caracterització d'*ABCA4* com a responsable de la malaltia de Stargardt (Kaplan i col., 1993), la localització de la proteïna ABCR en els fotoreceptors (Sun i Nathans, 1997) i el fet que moltes distròfies retinianes presentin clíniques semblants va ampliar el rang de candidat d'*ABCA4* a d'altres distròfies maculars. L'objectiu d'aquest treball ha estat la cerca de mutacions en aquest gen en pacients espanyols afectats de distròfies maculars diverses i, l'estudi de correlacions genotip-fenotip. S'han detectat variants d'*ABCA4* associades a Stargardt, fundus flavimaculatus i distròfia de cons i bastons. L'estudi de les correlacions genotip-fenotip ha permès refinar el model anteriorment proposat i caracteritzar nous al·lels patogènics.

Els resultats de l'estudi del gen *ABCA4* en dues famílies CRD, 8 famílies STGD i 4 famílies FFM es presenten en el treball: "*Spectrum of ABCA4 (ABCR) gene mutations in Spanish patients with autosomal recessive macular dystrophies*".

1.1.3. ABCA4 en famílies mixtes

Fins l'actualitat, l'estudi de mutacions en *ABCA4* s'ha dut a terme en pacients aïllats i famílies homogènies, en les que sols segrega una patologia retiniana (Lewis i col., 1999; Fishman i col., 1999; Maugeri i col., 1999; Zhang i col., 1999; Papaionnau i col., 2000; Simonelli i col., 2000; Rivera i col., 2000; Briggs i col., 2001; Fumagalli i col., 2001; Paloma i col., 2001; Webster i col., 2001). Hi ha però pedigrís mixtos, en els que dins una mateixa família hi ha individus afectats de patologies de la retina clínicament diferenciades (Cremers i col., 1998; Klevering i col., 1999; Rozet i col., 1999a; Shroyer i col., 2001). Aquests són una eina interessant per a la valoració de les correlacions genotip-fenotip d'*ABCA4*.

En aquest apartat es presenta l'anàlisi d'haplotips i mutacions d'*ABCA4* en tres pedigrís mixtes amb individus RP, STGD, FFM, i distròfia en patró de l'epiteli pigmentari de la retina. D'una banda, es confirma la correlació entre diferents tipus de mutacions en *ABCA4* i la severitat de la patologia. De l'altra, es descriu per primer cop una combinació de mutacions en un pacient de la família I, F553L i R1097C, associades a una alteració macular considerada més lleu que STGD, la distròfia macular en patró. L'estudi d'haplotips en les altres famílies també ha revelat dades d'interès. *ABCA4* en la família II sembla ser el responsable de STGD, però no pot explicar la RP. En canvi, el gen involucrat en les patologies de STGD i RP de la família III és altre que *ABCA4*. En contraposició amb la RP s'havia considerat que la malaltia de STGD tenia una base genètica molt més homogènia, ja que la major part dels casos descrits podien explicar-se per mutacions en *ABCA4*. La família III correspondria a la petita fracció que depèn d'un altre gen, fins ara desconegut.

Els resultats d'aquesta anàlisi es presenten en el treball: "*Mutation and haplotype analysis of ABCA4 in mixed Spanish families segregating different retinal dystrophies; implication of this gene in a pattern dystrophy phenotype*".

1.1.4. Altres resultats no publicats sobre l'anàlisi d'*ABCA4*

1.1.4.1. La família SP3

En la família SP3, tipificada clínicament com un cas de Stargardt clàssic (Figura 1), la seqüenciació completa dels 50 exons i seqüències intròniques flanquejants d'*ABCA4* en la pacient II.2, va permetre detectar tres variants en aquest gen. El canvi R212H (635G->A), localitzat a l'exó 6, va ésser confirmat mitjançant anàlisi de restricció amb l'enzim *HhaI*. Aquesta substitució nucleotídica havia estat descrita en un nombre elevat d'individus sans arreu del món, arribant a assolir una freqüència d'un 7% a la població alemanya, raó per la qual ha estat considerada una variant polimòrfica neutra (Rivera i col., 2000). La substitució G1961E (5882G->A), a l'exó 43, va ésser confirmada per digestió amb *TaqI*. Aquesta és una de les primeres variants implicades amb STGD i considerada un factor de predisposició a la DMAE (Allikmets i col., 1997b). Estudis de l'activitat d'aquest mutant, expressat en cèl.lules embrionàries de ronyó humà, han demostrat un descens de l'activitat ATPàsica associada a ABCR i, per tant, es considera una variant patogènica (Sun i col., 2000). El canvi R1640W (4919G->A), a l'exó 35, havia estat prèviament descrit com a mutació patogènica (Rozet i col., 1998; Webster i col., 2001). En aquest cas, no es modifica cap diana de restricció i s'ha hagut de verificar per seqüenciació. L'efecte que aquest canvi produeix sobre l'activitat de la proteïna és encara desconegut. Endemés, s'han analitzat 100 cromosomes control i cap d'ells ha resultat ser portador d'aquesta variant. En els pacients de la família SP3, els tres canvis esmentats es presenten en heterozigosi. L'estudi de l'haplotip en la resta de membres ha posat de manifest que R212H i G1961E s'hereten juntament, ja que formen un al·lel doble mutant. Els dos canvis suposadament patogènics, G1961E i R1640W, afecten residus conservats en la seqüència homòloga murina.

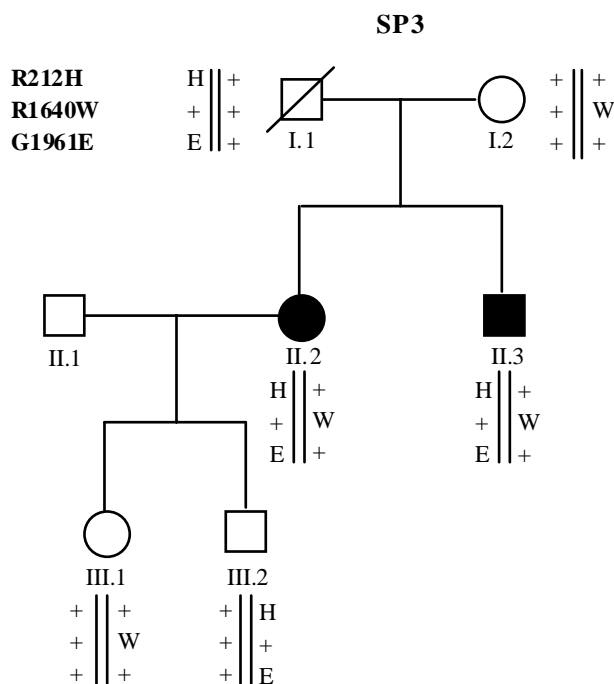


Figura 1. Segregació de les dues mutacions, G1961E i R1640W, i el polimorfisme R212H a la família SP3. Els haplotips de l'individu I.1 s'han deduït. +, al·lel silvestre.

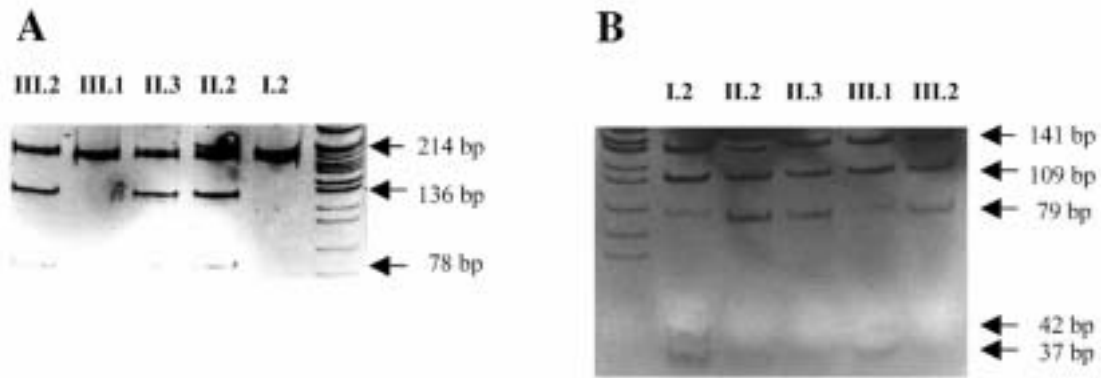


Figura 2. Separació electroforètica en 12% d'acrilamida dels fragments que contenen les variants G1961E i R212H de la família SP3 analitzades per restricció amb *TaqI* (A) i *HhaI* (B).

1.1.4.2. La família SZ5

Els individus afectats de la família SZ5 (Figura 3) varen ésser diagnosticats de STGD. No es va poder disposar de DNA dels individus I.1 i I.2 per fer un anàlisi d'*ABCA4*. L'individu I.1 havia presentat símptomes d'afectació visual, però no existien dades que permetessin la confirmació d'un diagnòstic clínic. L'anàlisi del pedigrí permetia inferir dos tipus d'herència: 1) dominant amb la suposada afectació de l'individu I.1, o 2) recessiva entenent que els individus I.1, I.2 i II.5 eren portadors d'algunes variants patogèniques en el mateix gen. Donat que *ABCA4* és el gen principal de la malaltia de Stargardt, es varen seqüenciar els 50 exons d'aquest gen dels individus II.4 i III.1, i es varen detectar dues variants. Una, R212H (635G->A) a l'exó 6, era la variant polimòrfica ja detectada en la família SP3, i l'altra, N1868I (5603A->T), verificada per restricció amb *Tsp509I*, havia estat descrita per primera vegada per Maugeri i col. (1999). Aquesta darrera havia aparegut en un elevat nombre de controls en diferents grups d'estudi, raó per la qual va ésser considerada com variant neutre. Posteriorment, assatjos de l'activitat ATPàsica d'aquesta variant han permès descriure un descens d'activitat, lleuger però reproduïble, respecte l'al·lel silvestre (Sun i col., 2000). A més d'aquestes substitucions no s'ha pogut detectar cap altre canvi en els individus afectes d'aquesta família. També s'ha analitzat una col·lecció de marcadors de tipus microsatèl·lit propers a *ABCA4* en els individus II.2, II.5 i III.2. L'ordre i distàncies genètiques entre els marcadors utilitzats és el següent:

D1S188- 0'3cM -D1S2868- 1'17cM -*ABCA4*- 2'91cM -D1S1163- 1'72cM -D1S415- 0cM -D1S420

Aquesta anàlisi va demostrar que els dos canvis estan en fase i que en l'individu III.2 hi ha hagut una recombinació en el cromosoma patern entre D1S2868 i D1S1163. No disposem de dades

suficients que ens permetin avaluar la patogenicitat de N1868I, ni tampoc hi ha hagut cap cas descrit de STGD dominant amb mutacions a *ABCA4*.

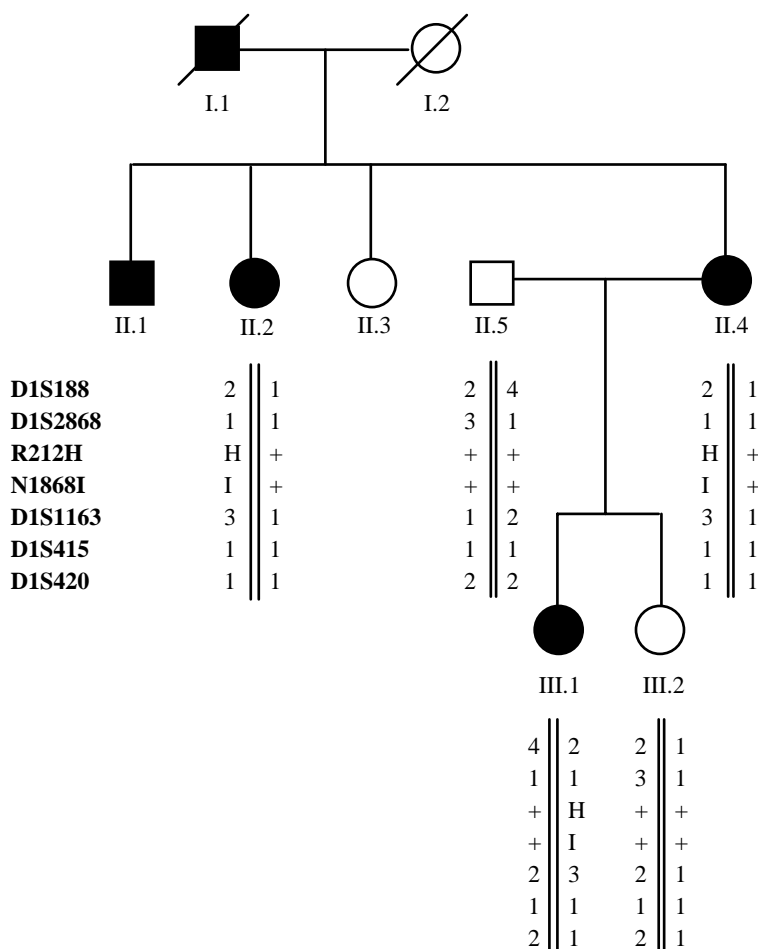


Figura 3. Família SZ5. Cerca de mutacions en el gen *ABCA4*, estudi de cosegregació de les variants R212H i N1868I, i anàlisi d'altres marcadors propers a *ABCA4*.

Seguidament, ens vam proposar analitzar en aquesta família la cosegregació de la malaltia amb els dos loci de Stargardt dominant, *STGD3* a 6q i *STGD4* a 4p (Stone i col., 1994; Kniazeva i col., 1999). Pel locus *STGD3*, vam utilitzar els marcadors D6S313 (6q13) i D6S252 (6q16) separats per 18'82 cM. Pel locus *STGD4*, els marcadors D4S1582 i D4S2397, situats ambdós a 4pter i separats per 14'7 cM. El resultat d'aquesta anàlisi es resumeix a la Figura 4. No es va observar cosegregació entre locus i malaltia per *STGD3*, ja que els individus II.2 i II.4 no compartien cap dels dos al·lels. En canvi, *STGD4* sí que podria explicar l'herència de la malaltia, però malauradament no es coneix cap gen candidat en aquesta regió.

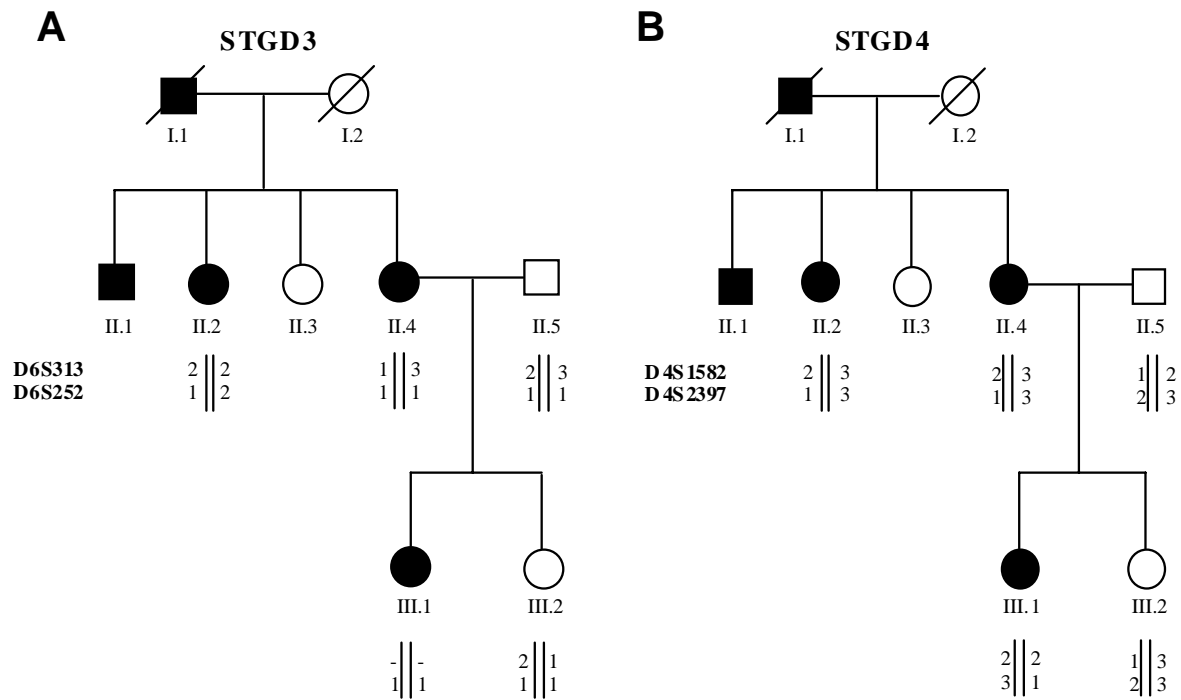


Figura 4. Família SZ5. Anàlisi de cosegregació amb marcadors que flanquegen els loci *STGD3* (A) i *STGD4* (B).

1.1.4.3. Les famílies SZ6 i MC

En ambdues famílies (Figura 5) hi ha un únic membre afecte que no té predecessors coneguts amb alteracions de la visió (casos símplex). La família SZ6 presenta un fenotip STGD. La família MC ha estat diagnosticada de distròfia de bastons i cons, patologia que s'inicia amb afectació de la retina perifèrica, i progressa cap a la regió macular.

En les dues famílies, s'ha realitzat un anàlisi de cosegregació amb els microsatèl·lits D1S2868, D1S2804 i D1S1163 per tal de determinar la possible implicació d'*ABCA4*. L'ordre i distàncies genètiques entre aquests marcadors i *ABCA4* són les següents:

$$D1S2804- 0'24cM -D1S2868- 1'17cM -ABCA4- 2'91cM -D1S1163$$

D'acord amb les dades obtingudes (Figura 5) en cap de les dues famílies s'ha pogut excloure *ABCA4* en relació a la patologia. La seqüenciació completa dels 50 exons en els afectes de les famílies SZ6 i MC no va revelar cap variant en la família MC. Contràriament, el pacient de la família SZ6 era portador de la substitució nucleotídica H423H (1269C->T) en heterozigosi a l'exó 10. Es tractava d'un canvi sinònim que no hauria d'afectar la funció de la proteïna. Per tal de determinar si aquesta substitució activava una seqüència de maduració del RNA (*splicing*) es va aplicar la fórmula de Shapiro i Senapathy (1987) que assigna valors numèrics (CV) a la seqüència

silvestre i a la mutada. Aquests valors van ésser comparats amb els de la seqüència consens de l'acceptor de *splicing* de l'exó 10 (Figura 6). En tots els casos, els CVs obtinguts van ésser inferiors als de l'acceptor real de l'exó 10. Aquestes dades reforçaven la hipòtesi que la substitució 1269C->T no era patogènica. Aquesta mateixa variant havia estat descrita en dos pacients STGD i dos pacients DMAE (Webster i col., 2001). L'absència d'altres variants d'*ABCA4* en aquesta família no va permetre establir cap tipus de correlació genotip-fenotip.

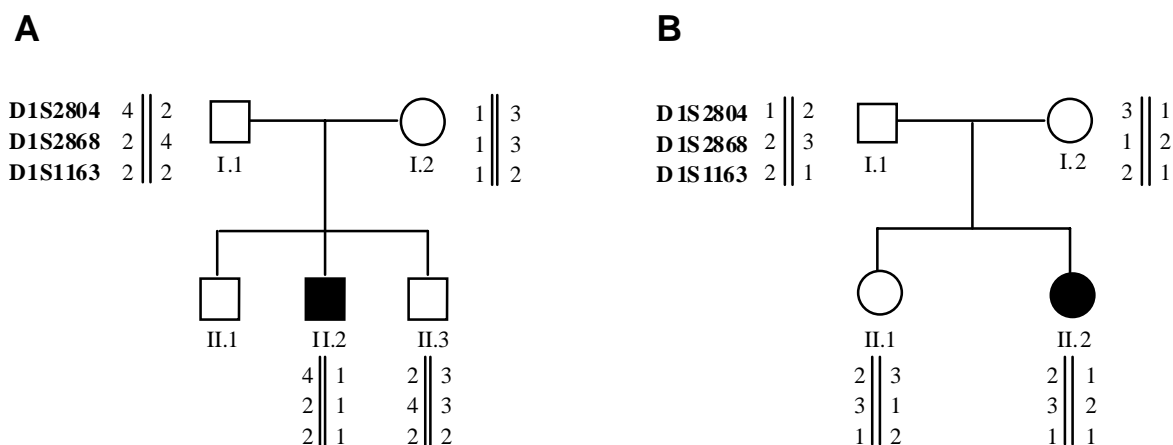


Figura 5. Famílies SZ6 (A) i MC (B). Anàlisi de cosegregació entre el locus *STGD1* i la patologia.

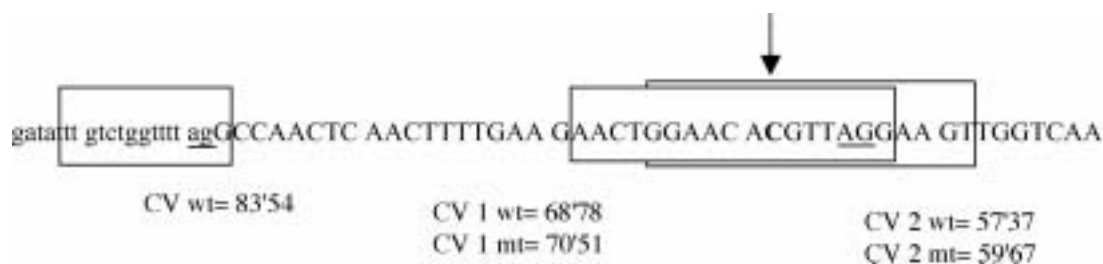


Figura 6. Valor consens de *splicing*, segons Shapiro i Senapathy (1987), predit per a les seqüències properes a la posició 1269 d'*ABCA4* i a la seqüència acceptora de l'exó 10. CV wt: CV de la seqüència d'acceptora funcional de l'exó 10; CV n wt: CV de les seqüències críptiques de *splicing*; CV n mt: CV de les seqüències críptiques amb la variant 1269C->T. La posició substituïda s'assenyala en negreta i amb una fletxa. Els càlculs s'han realitzat considerant la seqüència nnnnnnnnnnagN, on n assenyala posició intrònica, i N posició exònica.

1.1.4.4. La mutació L1940P

La mutació L1940P va ésser detectada per primera vegada en heterozigosi en dues famílies STGD provinents de Saragossa (apartat 1.1.2 de resultats). En ambdós casos el progenitor patern era el portador de l'al·lel mutat. Posteriorment, la mateixa variant va ésser caracteritzada en homozigosi en una pacient diagnosticada de CRD amb afectació severa de la perifèria de la retina. Alguns trets simptomàtics típics de l'arRP, com són la ceguesa nocturna i l'atenuació dels vasos sanguinis de la retina també eren presents en la pacient (apartat 1.3 de resultats). El fet que aquesta mutació no hagués estat descrita anteriorment en cap de les poblacions analitzades permetia hipotetitzar un origen únic d'aquesta variant a la població espanyola. En aquest sentit, les famílies SZ1 i SZ2 provenien de la mateixa regió geogràfica sense que s'hagués documentat una possible consanguinitat. En la família L-H, tampoc es va poder documentar la suposada consanguinitat que expliqués l'estat d'homozigosi en la pacient, i encara menys un parentiu d'aquesta família amb les altres dues.

Per tal de determinar l'origen de la mutació L1940P es va dur a terme una anàlisi d'haplotips amb l'ordre i distàncies entre marcadors:

D1S435- 0'95cM -D1S188- 0'3cM -D1S2868- 1'17cM -ABCA4- 4'63cM -D1S415

Els resultats es presenten a la Figura 7. Alguns microsatèl·lits no es van amplificar, possiblement degut a què alguns DNAs estaven degradats. Els resultats obtinguts a partir de l'anàlisi d'haplotips reforçarien la hipòtesi d'un origen únic d'aquesta mutació en les tres famílies espanyoles, tot i que caldria analitzar més marcadors per confirmar-ho.

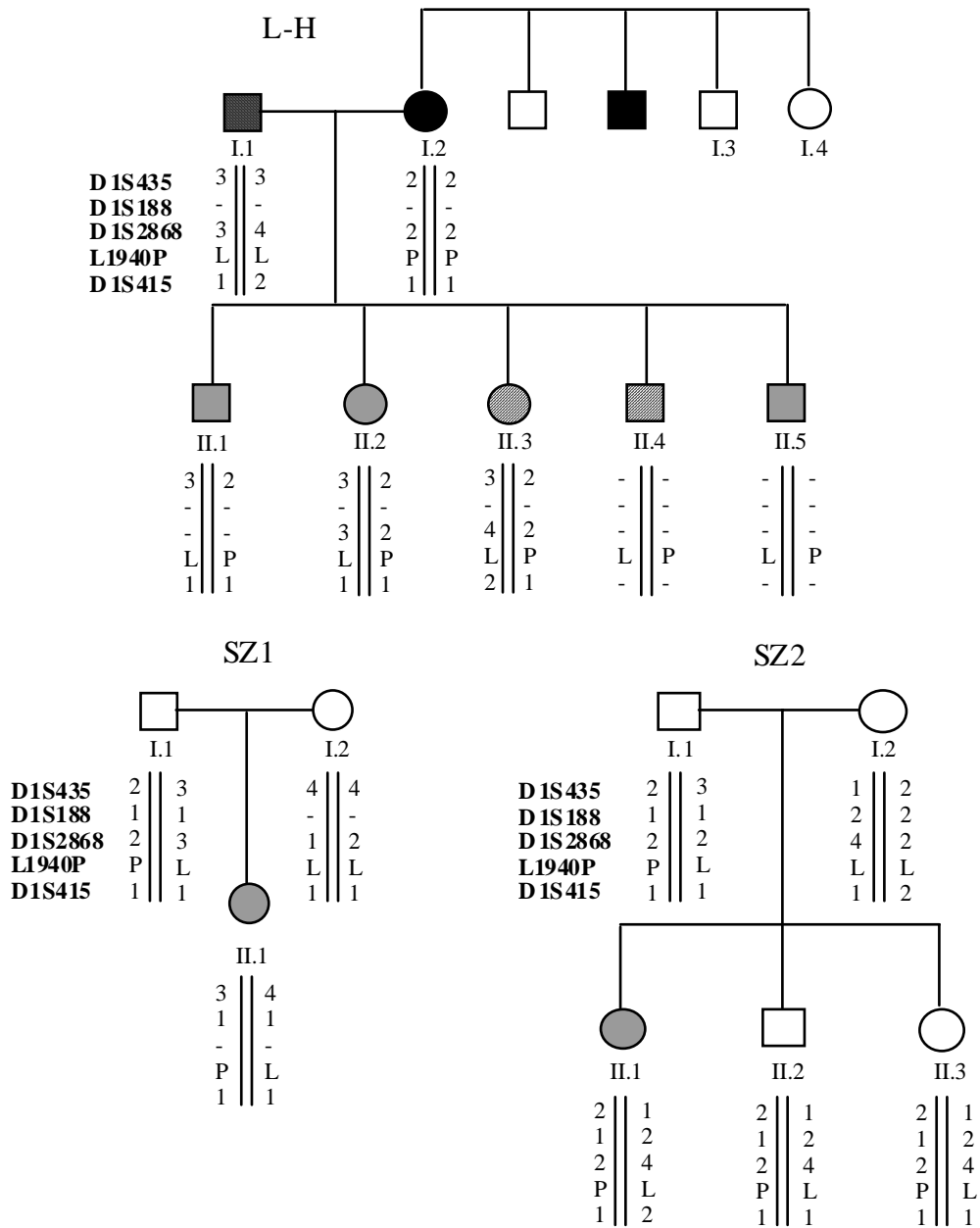


Figura 7. Segregació dels marcadors assenyalats del cromosoma 1 en les 3 famílies que presenten la mutació L1940P.

1.2. COL·LABORACIONS EN TREBALLS MULTICÈNTRICS

1.2.1. ABCA4 i la susceptibilitat a la degeneració macular associada a l'edat

En treballs anteriors s'ha demostrat que mutacions en *ABCA4* causen RP (Martínez-Mir i col., 1998; Cremers i col., 1998). A més, aquest gen havia estat anteriorment descrit com a responsable principal de la malaltia de Stargardt/FFM (Allikmets i col., 1997a) i també és el responsable de casos de CRD i de distròfia en patró (Maugeri i col., 2000). Probablement dins la heterogeneïtat al·lèlica descrita es podrien incorporar altres distròfies maculars i, en aquest sentit, *ABCA4* és un bon candidat per explicar la DMAE. Es tracta d'una patologia complexa d'afectació macular molt freqüent a la tercera edat, causada per factors tant genètics com ambientals.

Hem contribuït a un treball multicèntric coordinat per R. Allikmets de la Universitat de Columbia (USA) que tenia com a objectiu investigar l'associació entre dos variants genètiques d'*ABCA4* (G1961E i D2177N) i la DMAE en un grup de pacients nombrosos, d'àmplia distribució geogràfica i clínicament ben caracteritzat. Hem analitzat les variants G1961E i D2177N en 36 pacients DMAE espanyols, dels quals 10 presentaven la variant seca o atròfica mentre els 26 restants corresponien a la variant exudativa. També hem analitzat 34 individus control, tots ells d'edats avançades. Les variants s'han identificat per SSCP, seguida de seqüenciació. Els nostres resultats, juntament amb els dels grups implicats, semblen demostrar que els portadors d'aquestes mutacions presenten un risc més elevat, d'entre 3 i 5 vegades, de patir aquesta malaltia.

Els resultats d'aquesta anàlisi han estat inclosos en el treball: "*Further evidence for an association of ABCR alleles with age-related macular degeneration*".

1.2.2. Origen de la variant 2588G->C d'ABCA4

La variant 2588G->C, localitzada a l'exó 17 d'ABCA4, ha estat àmpliament estudiada per dos motius. Primer, perquè segons la maduració del transcrit, pot donar lloc a dos productes proteics diferents (apartat 3.2.4.de la introducció). Segon, i més important, pel fet que estudis de correlació genotip-fenotip i d'expressió han evidenciat un possible caràcter patogènic d'aquest canvi. Estudis poblacionals van demostrar que es tractava d'una variant relativament freqüent en algunes poblacions malgrat que la seva freqüència era sorprenentment baixa en la població d'Estats Units. Estudis a nivell europeu van suggerir un gradient de freqüències per aquest canvi, que creixia des del sud-oest al nord-est d'Europa. La detecció d'un desequilibri de lligament entre el polimorfisme R943Q (2828G->A) i 2588G->C semblava indicar un possible efecte fundador d'aquesta mutació en poblacions europees.

Per tal d'esbrinar aquesta hipòtesi hem participat en un projecte multicèntric de la variant 2588G>C a Europa. Els nostres resultats han demostrat que: 1) aquesta variant és una de les mutacions autosòmiques recessives més freqüents en població europea; 2) existeix un gradient de més a menys entre nord-est/sud-oest respectivament; i 3) l'estudi dels haplotips en 16 famílies portadores de 2588G->C ha suggerit un origen únic per aquesta mutació. La variant 2588G->C s'ha analitzat mitjançant ASOH (*Allele Specific Oligonucleotide Hybridization*) i detecció radioactiva dels al.lels per a cadascun de 209 individus de població control espanyola. El resultat ha estat un únic heterozigot per 2588G->C.

Els resultats d'aquesta anàlisi han estat inclosos en el treball: "*The ABCA4 2588G->C Stargardt mutation: single origin and increasing carrier frequency from South-West to North-East Europe*".

2.2. ANÀLISI DEL GEN *CNGA1* EN EL MATEIX PANELL DE FAMÍLIES arRP

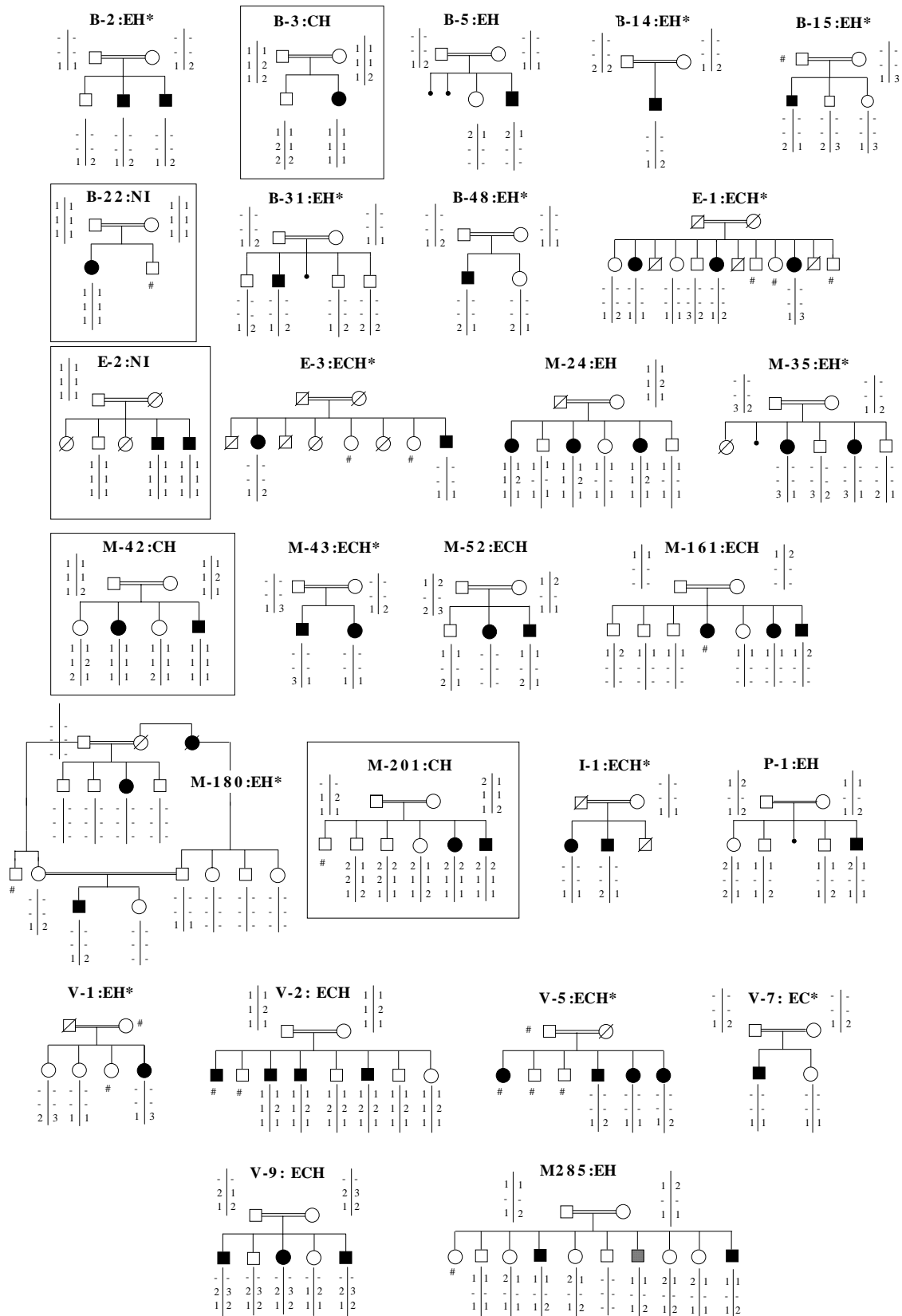
El gen *CNGA1* codifica la subunitat α del canal catiònic depenent de cGMP de la membrana plasmàtica dels segments externs dels bastons. Aquest canal controla l'entrada de cations de sodi i calci a l'interior del fotoreceptor en resposta als senyals derivats de la captació de la llum. Per aquesta raó va ser considerat un bon candidat per explicar alguns casos d'arRP. L'any 1995, Dryja i col. van demostrar que diferents tipus de mutacions a *CNGA1* estaven realment associades a arRP en 4 famílies.

En aquest treball es presenten els resultats de: 1) l'anàlisi de cosegregació i homozigotitat amb marcadors propers al gen *CNGA1* en un grup de 46 famílies arRP espanyoles; i 2) la cerca de mutacions en les famílies que no han pogut ser excloses. Com a marcadors moleculars s'han emprat dos microsatèl·lits flanquejants i un polimorfisme intern situat a l'exó 4 del gen. De les 46 famílies analitzades, 36 han estat excloses. De les 10 restants, en 7 s'ha detectat cosegregació mentre tres eren no informatives pels marcadors utilitzats. La cerca de mutacions ha revelat la mutació R28X a l'exó 3 de *CNGA1* en la família M-68. Els afectes són homozigots per aquesta substitució. A més a més, en la família M-71 s'ha detectat una variant no patogènica en la mateixa posició aminoacídica, R28Q, que ja havia estat descrita (Dryja i col., 1995).

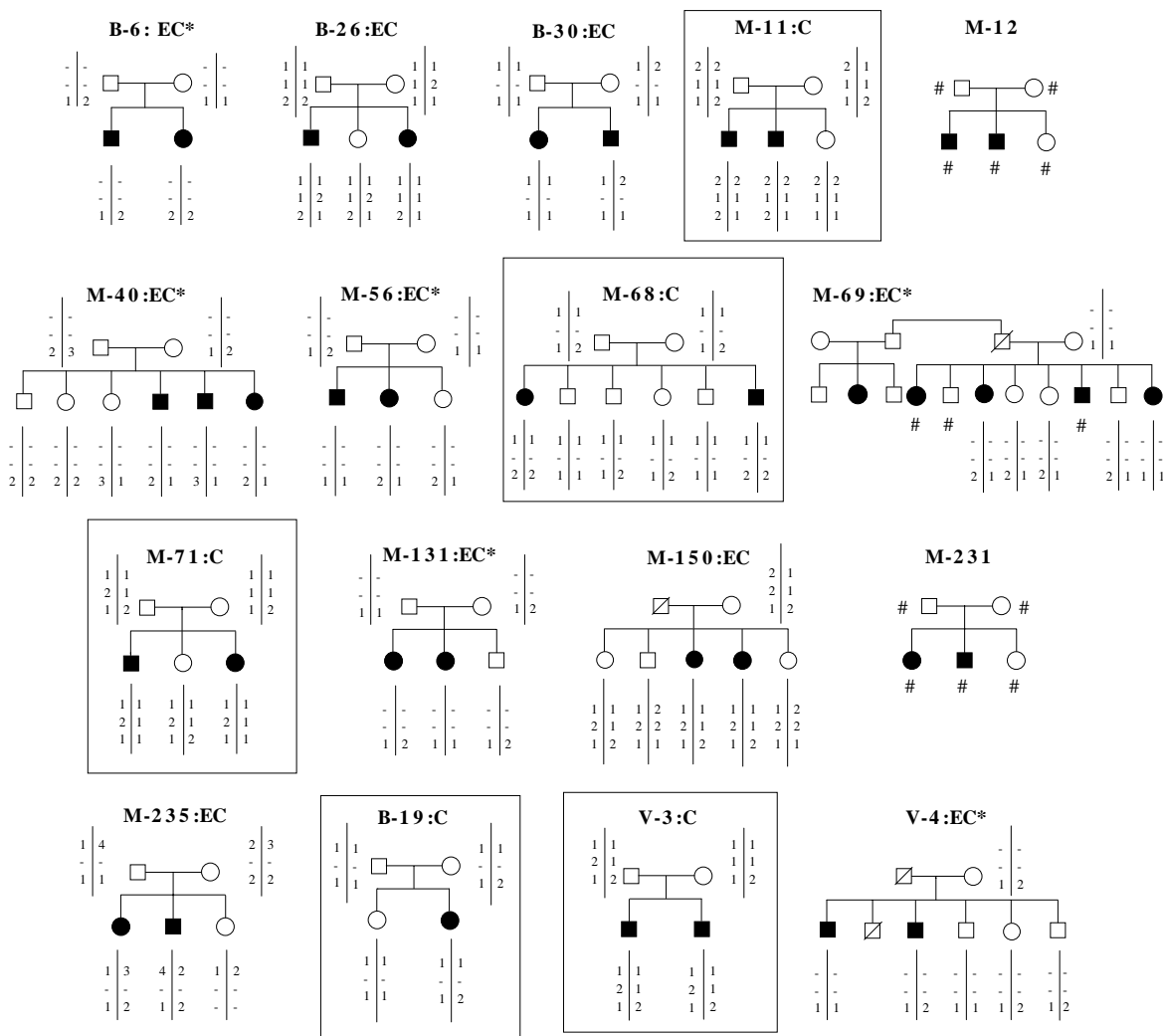
Els resultats de l'anàlisi del gen *CNGA1* en el panell de famílies espanyoles es presenten en el treball: "*Novel homozygous mutation in the alpha subunit of the rod cGMP-gated channel (CNGA1) in two Spanish sibs affected of autosomal recessive Retinitis pigmentosa*".

CNGA1 : D4S1536- A813T- D4S1577

Famílies consanguínes



Famílies no consanguínies



Casos particulars

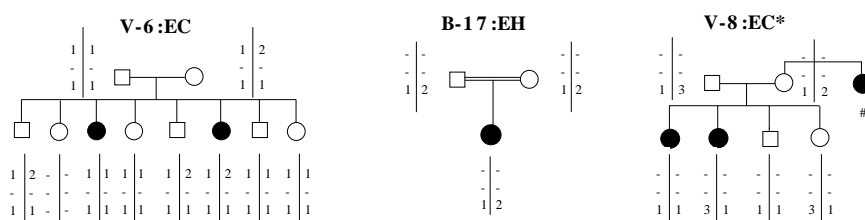


Figura 9. Anàlisi de cosegregació i homozigotitat entre el gen *CNGA1* i la malaltia realitzades en les 46 famílies arRP espanyoles. L'ordre i distàncies genètiques dels marcadors analitzats en 28 famílies consanguínies i 17 no consanguínies són les següents: D4S1536- 1'5cM -*CNGA1*(A813T)- 4'9cM -D4S1577. Amb un asterisc, se senyalen les famílies que han estat excloses a partir de les dades del marcador extern D4S1577. Les famílies que no han pogut ser excloses o no són informatives per aquests marcadors són senyalades amb un requadre. Quan aquest anàlisi es va dur a terme, l'ordre i les distàncies genètiques entre els marcadors externs eren les següents: D4S1536-0'63cM-D4S1577.

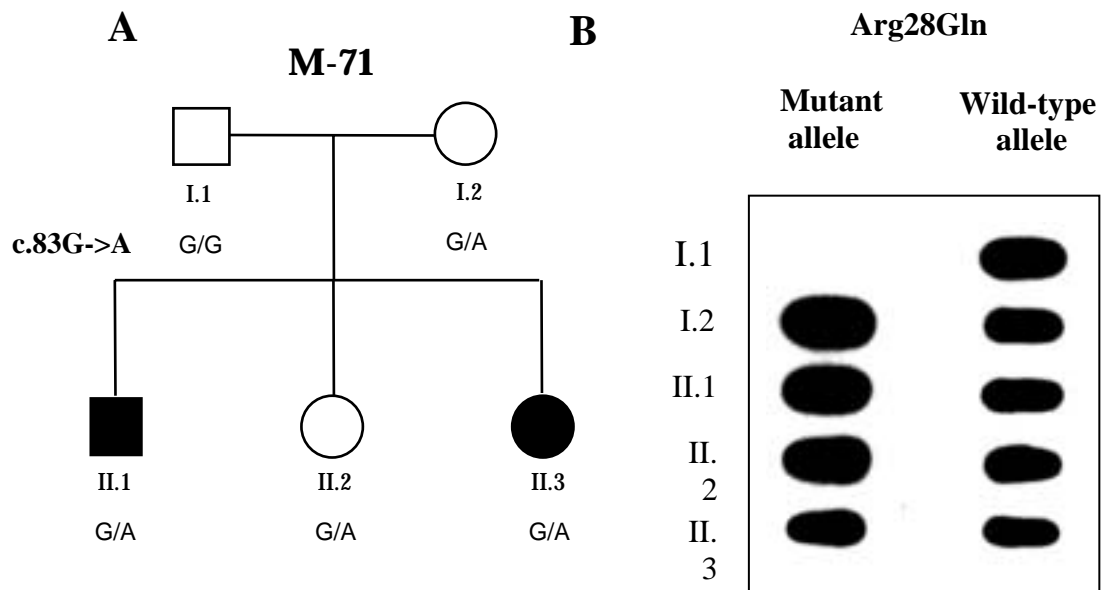


Figura 10. A) Pedigrí de la família M-71 on s'indica el genotip dels diferents membres per a la variant c.83G->A de *CNGA1*; B) Detecció de la variant per anàlisi ASOH.

2.3. RESULTATS NO PUBLICATS SOBRE L'ANÀLISI D'ALTRES GENS I LOCI

2.3.1. Anàlisi dels gens i loci *RPE65*, *RP25*, *MERTK* i *NRL/ RPGRIP1*

Es van dur a terme anàlisis de cosegregació i homozigositat amb d'altres gens i loci en el panell de 52 famílies arRP. Les famílies en les que ja s'havia caracteritzat el gen responsable de la patologia van ésser excloses d'estudis posteriors. És el cas de B-4, B-27 i M-9 que presentaven mutacions a *PDE6B*. També es va excloure la família M-33, la patologia de la qual s'havia pogut explicar per mutacions en *ABCA4* i la M-266 que havia estat diagnosticada de nou com a afectada de distròfia de cons i bastons i també presentava mutacions a *ABCA4*. A més a més, la família M-141 presentava mutacions en *TULP1* i la M-68 en *CNGA1* (apartats 2.1 i 2.2 de resultats). Cal assenyalar que V-8 era portadora d'una variant en *ROM-1* (apartat 2.3.4. de resultats) i que la família B-17 va ésser diagnosticada per segon cop i va resultar ésser afecta de la síndrome de Bardet-Biedl. Per aquesta raó, tant la família V-8 com la B-17 han estat tractades com a casos particulars en les anàlisis de cosegregació i homozigositat. La família M-285 (consanguínia), amb un individu RP i dos STGD, és un altre cas particular ja que no s'han trobat mutacions en el gen esperat, *ABCA4*. En resum, en aquest apartat s'analitzen 28 famílies consanguínies i 17 famílies no consanguínies. Les famílies M-12 i M-231 no van poder ser analitzades perquè no es va disposar de mostres suficients.

Taula 1. Marcadors utilitzats per a les anàlisis de cosegregació i homozigositat de gens i loci candidats d'arRP. A) Ordre i distàncies genètiques considerades en el moment de realitzar les anàlisis (Mapa de Marshfield [<http://research.marshfieldclinic.org/>]; B) Ordre i distàncies genètiques actuals (UCSC Human Genome Working Draft [<http://genome.cse.ucsc.edu/>]).

A

Gen/locus	Ordre i distàncies entre marcadors
RPE65	D1S1665-7'02cM-D1S1728
RP25	D6S257-0'53cM-D6S1275-0'54cM-D6S1711
MERTK	D2S1790-D2S442 (ref. Gal i col., 2000)
NRL/ RPGRIP1*	D14S50-2'14cM-MYH7-8'06cM-D14S264-0cM-D14S64-3'93cM-D14S80-1'42cM-D14S275-3'74cM-D14S54

B

Gen/locus	Ordre i distàncies entre marcadors
RPE65	D1S1728-1'8cM- RPE65 -5'22cM-D1S1665
RP25	D6S1711-5'3cM-D6S1275
MERTK	D2S1790-21'51cM- MERTK -26'1cM-D2S442
NRL/ RPGRIP1*	RPGRIP1 -0'38cM-D14S50-1'4cM-MYH7-0'5cM-D14S64-0cM- NRL -0'5cM-D14S264-1'21cM-D14S275-1cM-D14S80-4'9cM-D14S54

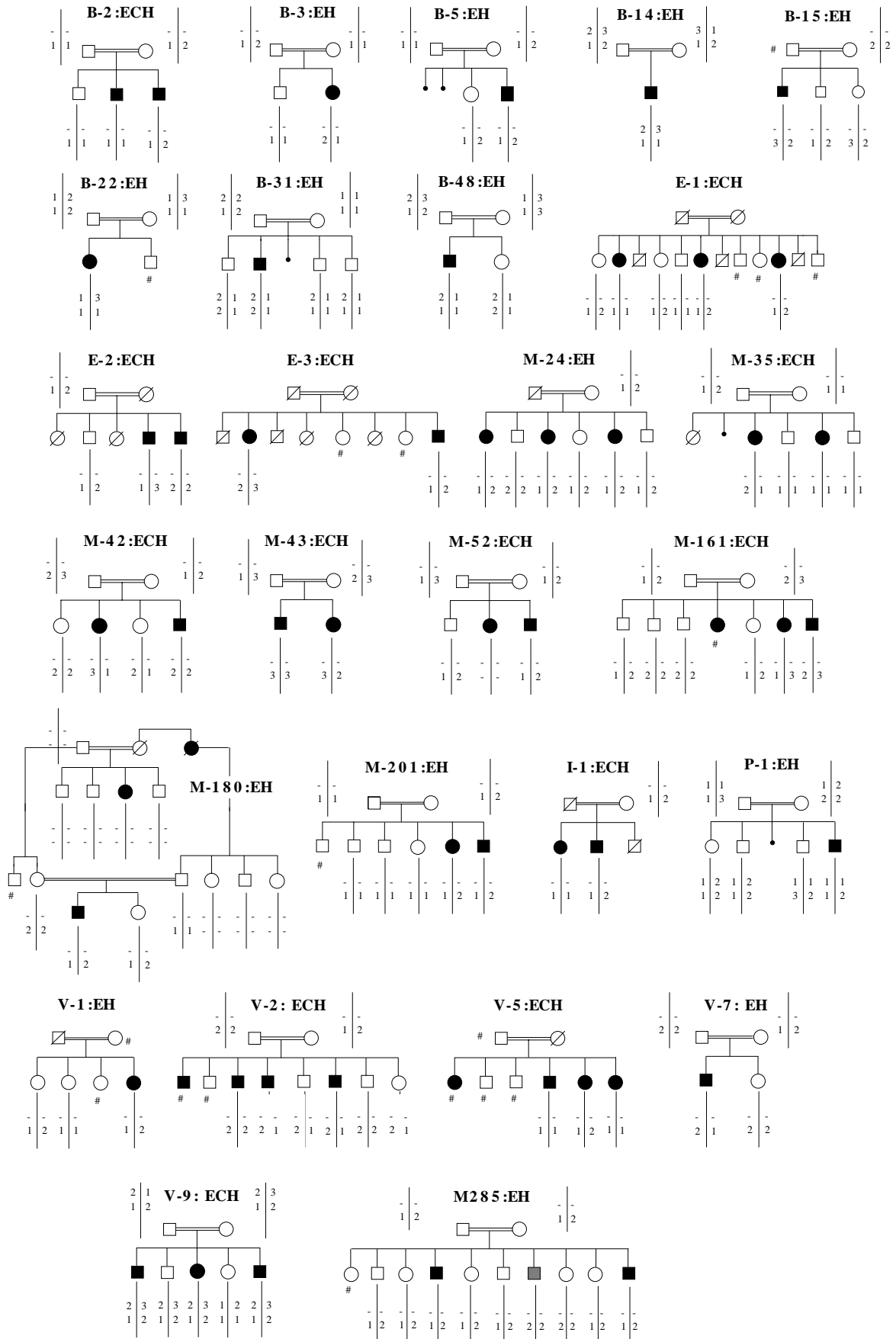
* En els estudis de cosegregació i homozigositat realitzats amb *NRL* previs a aquesta tesi realitzats sobre el panell de famílies arRP espanyoles, es van emprar els marcadors flanquejants D14S50 i D14S54. De les 43 famílies, 3 no van poder ser excloses i van ser seguidament analitzades per SSCP. Aquest treball no va revelar cap variant patogènica de *NRL* en cap família.

Posteriorment, es va localitzar *RPGRIP1* entre els marcadors D14S264 i D14S275 com figura en el mapa del Whitehead Institute (Boylan i Wright, 2000). Aleshores vam deduir que la cosegregació amb *NRL* era també vàlida per *RPGRIP1*. Noves famílies com B-30, B-48, M-69, V-6, V-7 i V-9, que en el seu moment no havien estat analitzades per cosegregació, van ésser incloses en aquest treball.

A continuació es presenten tots els haplotips construïts amb les dades dels marcadors analitzats per a cada gen o locus.

RPE65: D1S1728- D1S1665

Famílies consanguínies



Famílies no consanguínies

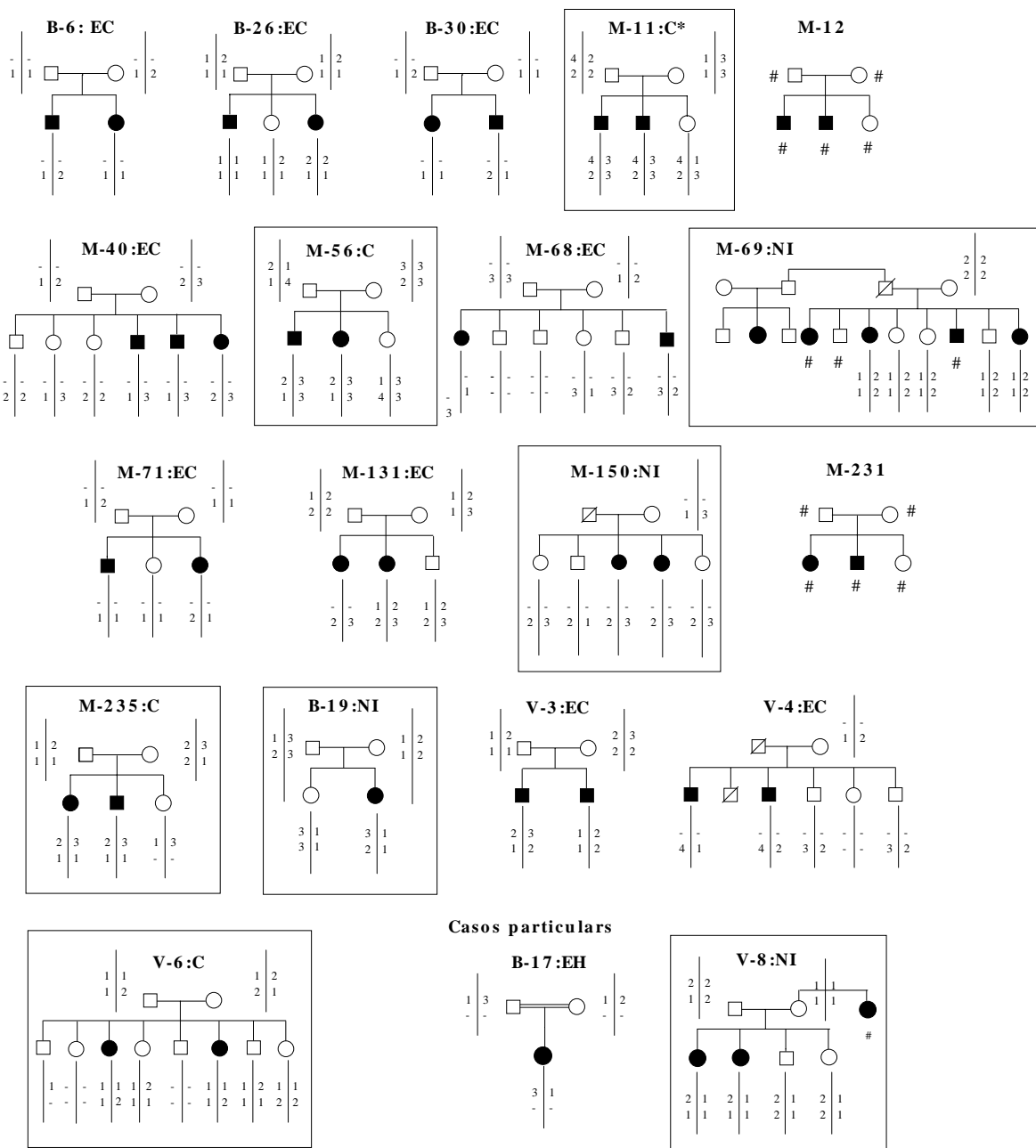
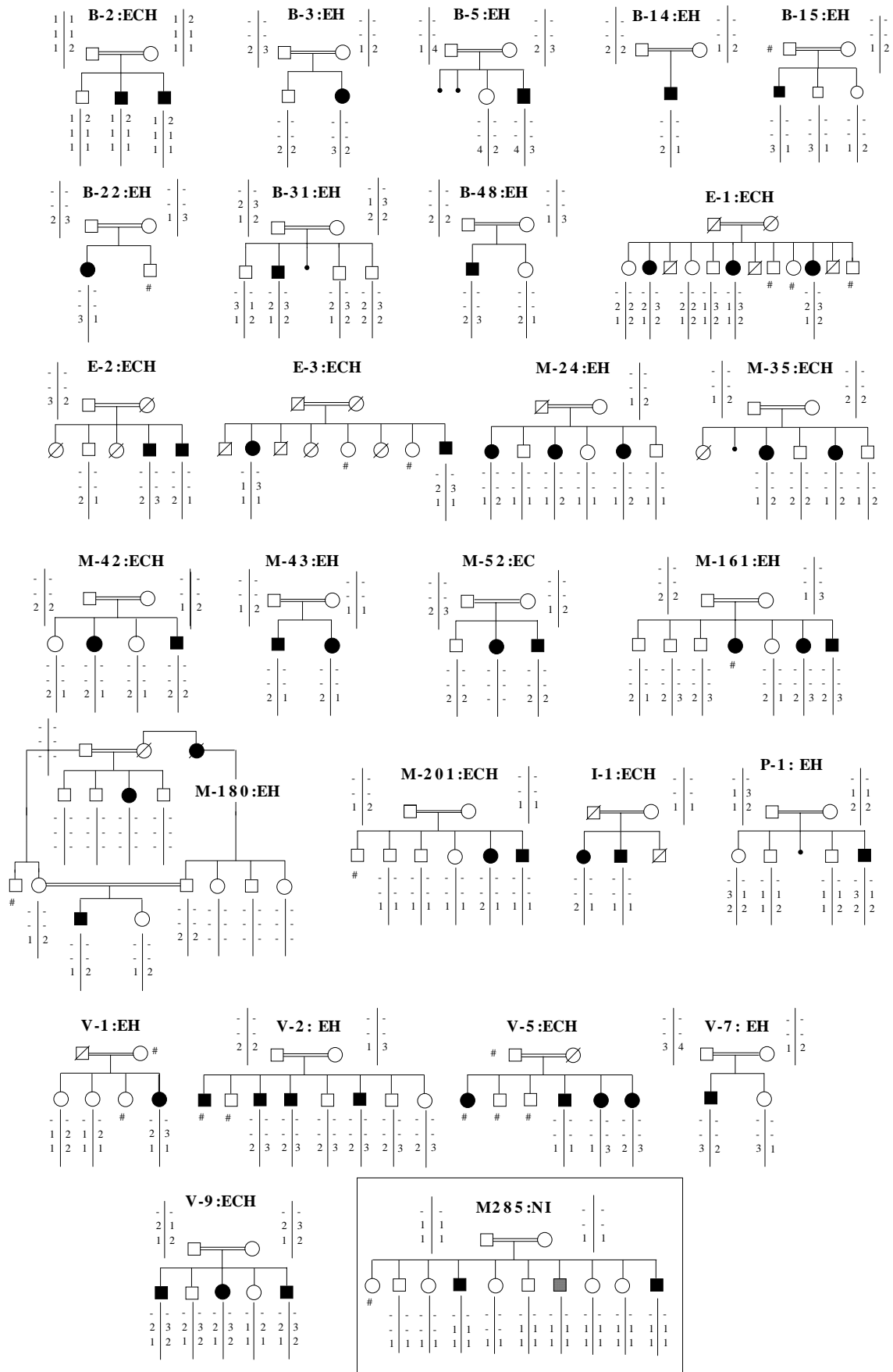


Figura 11. Anàlisi de cosegregació i homozigotitat entre el gen *RPE65* i la malaltia en el panell de famílies arRP. Els marcadors s'assenyalen en l'ordre següent: D1S1728/D1S1665. S'assenyalen amb un requadre les famílies que no han pogut ser excloses o no són informatives. L'asterisc en la família M-11 indica que no ha pogut ésser exclosa segons les dades del marcador més proper al gen.

Locus RP25 : D6S257 - D6S1711 - D6S1275

Famílies consanguínies



Famílies no consanguínies

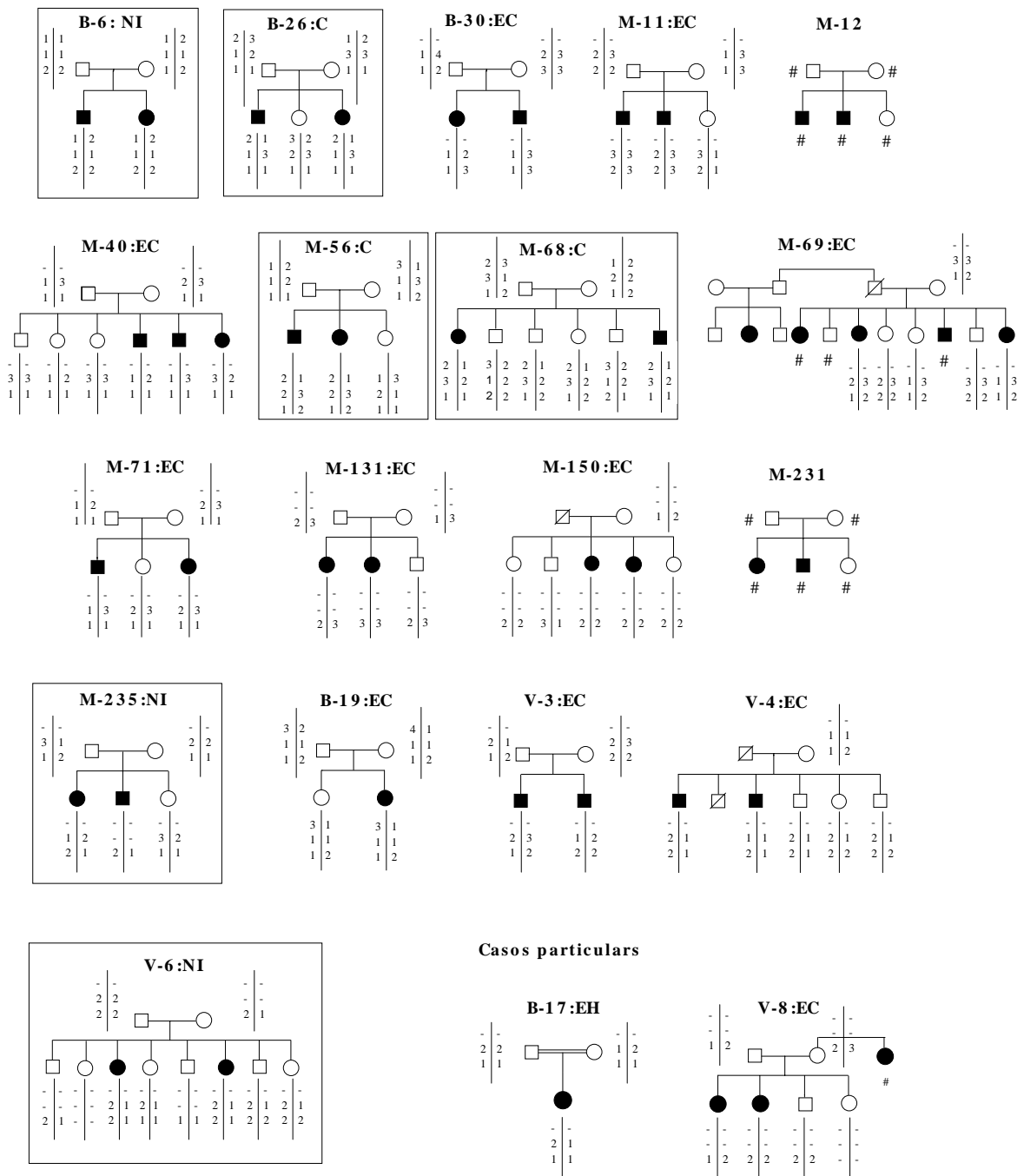
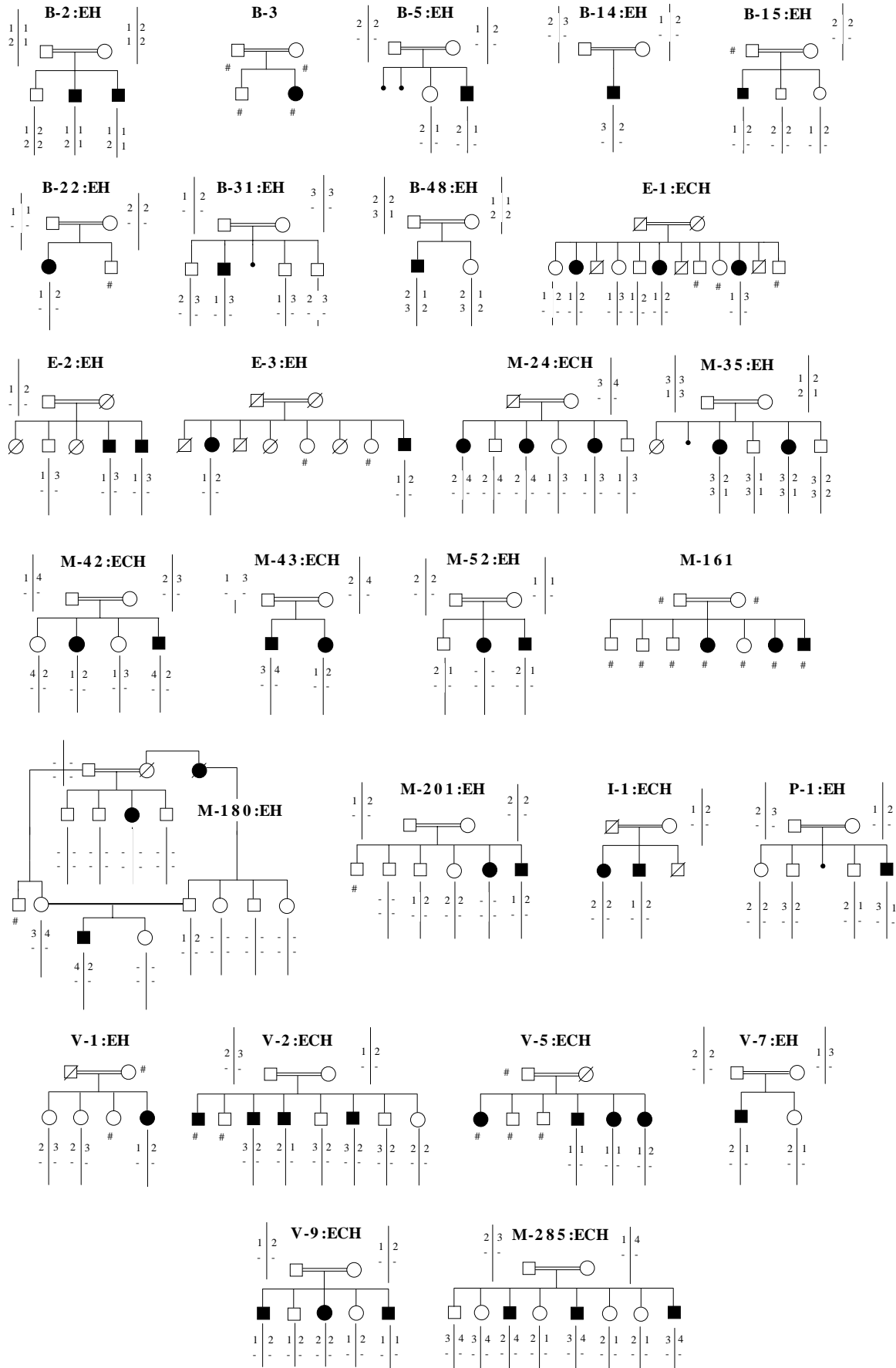


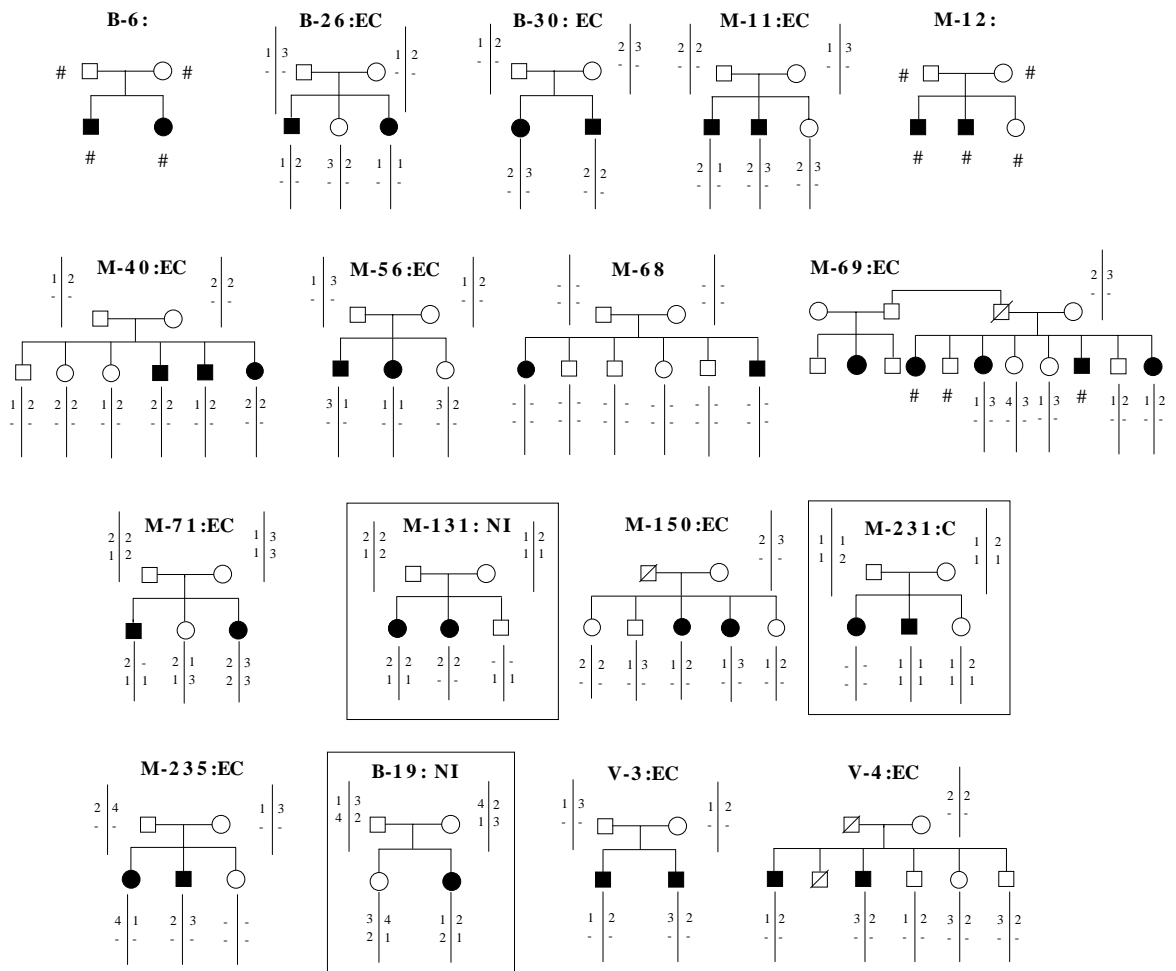
Figura 12. Anàlisi de cosegregació i homocigotitat entre el locus *RP25* i la malaltia en el panell de famílies arRP. L'ordre dels marcadors és: D6S257/D6S1711/D6S1275. Les famílies no excloses o no informatives apareixen assenyalades amb un requadre.

MERTK: D2S1790 - D2S442

Famílies consanguínies



Famílies no-consanguínies



Casos particulars

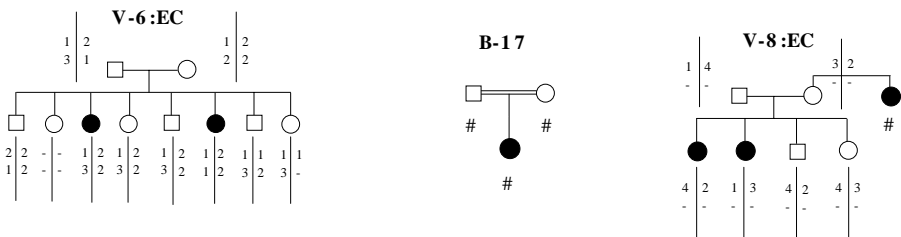
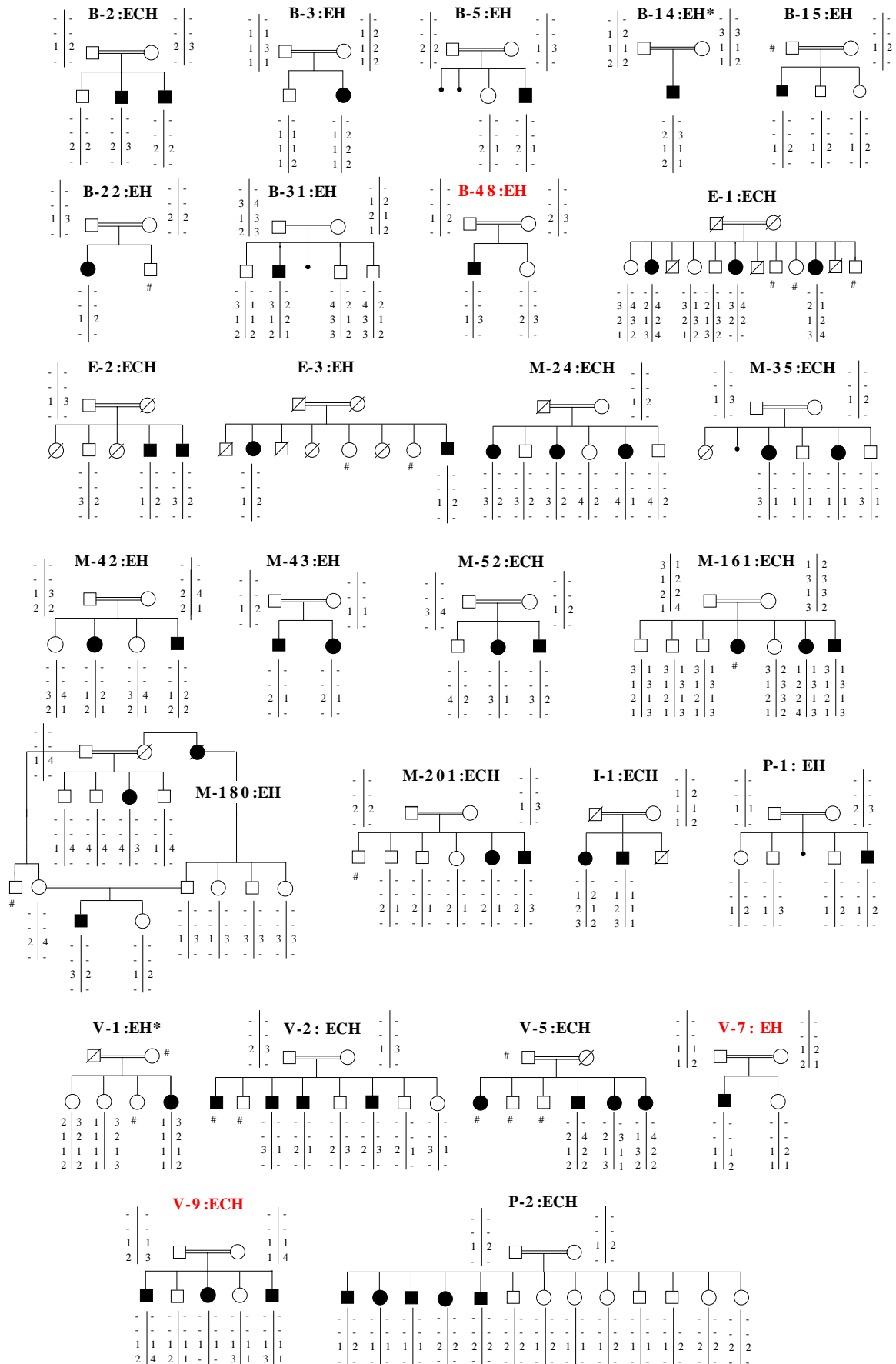


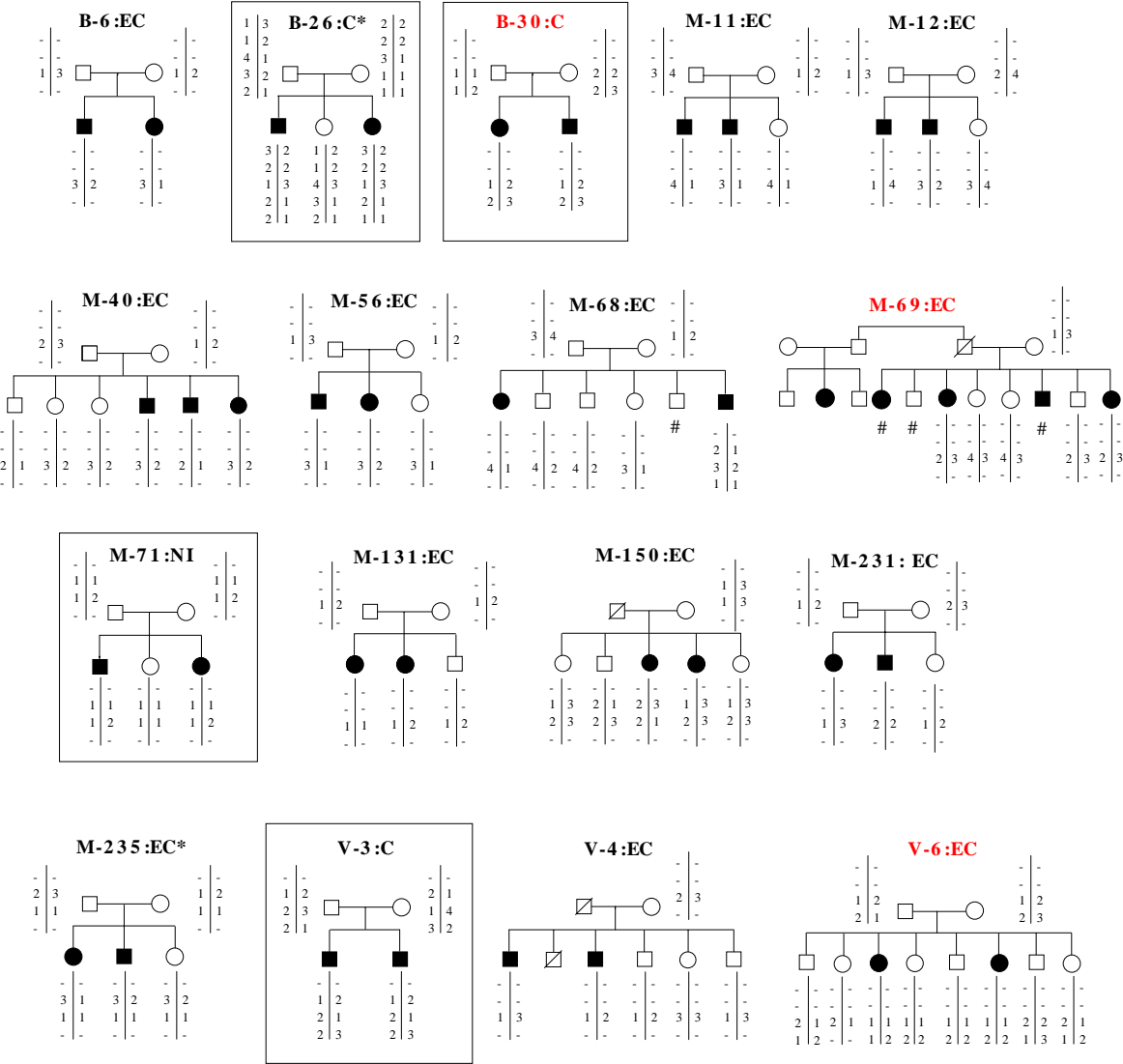
Figura 13. Anàlisi de cosegregació i homozigotitat entre *MERTK* i la malaltia en el panell de famílies arRP. Els marcadors s'indiquen en el següent ordre: D2S1790/D2S442 i corresponen a l'interval que flanqueja el gen (Gal i col.,2000). Les famílies no excloses o no informatives s'indiquen amb un requadre.

Gens NRL i RPGRIP1: D14S50 - MYH7 - D14S64 - D14S80 - D14S54

Famílies consanguínies



Famílies no consanguínies



Casos particulars

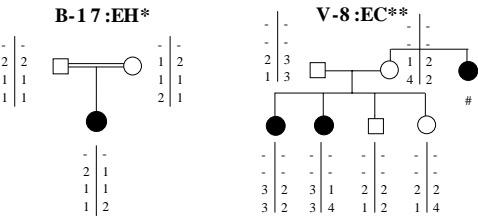


Figura 14. Anàlisi de cosegregació i homozigositat entre *NREL* i la malaltia en el panell de famílies arRP. Els marcadors emprats s'indiquen ordenats: D14S50/MYH7/D14S64/D14S80. Per la família B-26, s'ha analitzat un marcador més, D14S54, assenyalat en darrera posició. Es presenten en color vermell, els pedigrís analitzats en aquest treball. L'asterisc assenjala els pedigrís en els que *NREL* ha estat exclòs a partir de les dades dels marcadors externs. Les famílies no excloses o no informatives apareixen amb un requadre. El doble asterisc de V-8 indica que no pot ser exclosa si es presuposa herència digènica amb *ROM-1* (veure apartat 2.3.4. de resultats).

2.3.2. Cerca de mutacions al gen *RPGRIP1*

La cerca de mutacions en *RPGRIP1* es va dur a terme en 4 pacients de les famílies B26, B30, M71 i V3 no excloses en les anàlisis de cosegregació i homozigotitat amb marcadors de les regions flanquejants a *NRL* i *RPGRIP1* del cromosoma 14 (Figura 15).

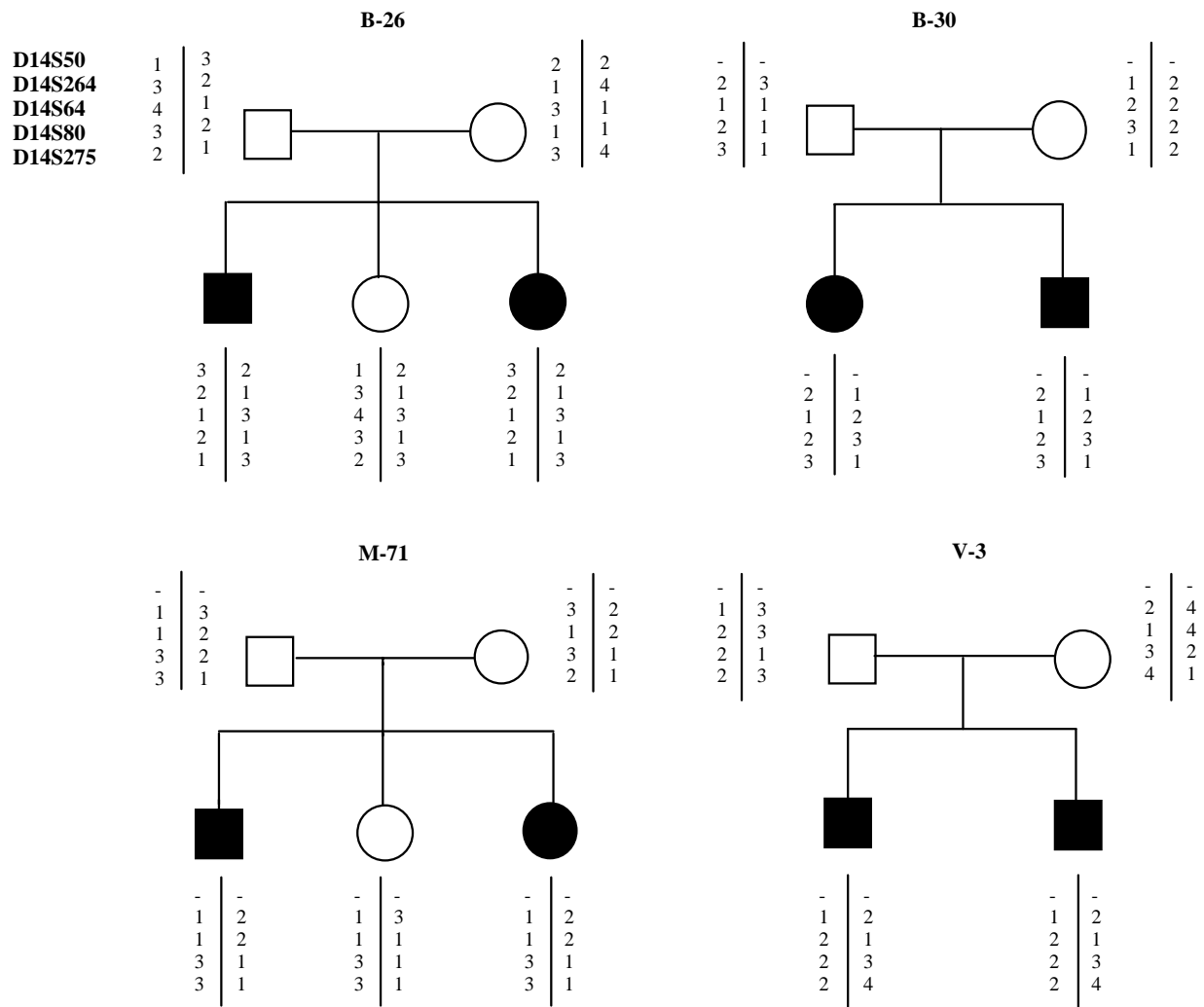


Figura 15. Haplotips pels marcadors de la regió *NRL-RPGRIP1* (Taula 1, apartat 2.3.1 de resultats) en les 4 famílies en què s'ha dut a terme la cerca de mutacions en *RPGRIP1*.

La cerca de mutacions es va dur a terme per seqüenciació directa dels productes de PCR que corresponen als 15 exons descrits inicialment per aquest gen. La seqüència genòmica no havia estat publicada a l'inici d'aquest treball. Partint de la seqüència de cDNA (GenBank AF260257: Boylan i Wright, 2000) es va fer un BLAST contra el Highthroughput per tal de cercar la seqüència dels exons/introns. A partir de la seqüència genòmica es varen dissenyar els oligonuclèotids que

ens han permès amplificar i seqüenciar el gen. Els exons 5, 7 i 15 s'han dividit en 3, 3 i 2 fragments respectivament, degut a la seva grandària.

Taula 2. Amplificació dels exons i zones intròniques flanquejants (unes 50 pb a banda i banda de cada exó) de *RPGRIP1*. Actualment s'han descrit 9 exons més a 5' del gen, de manera que el que va ésser considerat exó 1 ha resultat ser l'exó 10 del gen.

Exó suposat (exó real)	Oligonucleòtids	Mida amplicons (pb)	T ^a anellament PCR (C°)
5' (part de l'intró 9)	F- TTCCAAGGCACTTGGTAAATG R- GCTGACTGGAGCTGTCCTG	198	55
1 (10)	F- TGGGGTATCCATCTGAGAGC R- TCCCAAACCAGAGGTAGAGG	250	55
2 (11)	F- TTTCACATTTCTGGATTATTTTTCCC R- TCTGCAGAGTGGACTAGTTTGTTT	228	55
3 (12)	F- TCCCTTTTACCAATGCGTTT R- TTCCCACGTTCCCTGTTATCC	224	55
4 (13)	F- CTTTGGTTTTAGGCCACTGAGA R- CCCGAAGTGAGGAGAACAAA	236	55
5a (14)	F- CCTTTAACGGATAGGCAGCTT R- GTTGGGTATCTCCAGCCTGA	190	54
5b (14)	F- TTGAACTGCACATCCACCAG R- RTGAAGGTAGTGTAAGAAAAGCGAAT	202	55
5c (14)	F- CCTCCCAGTATGTGATGGAGA R- GGAAATTCTGCATTGGTGCT	230	55
6 (15)	F- TATTCCCCCTGCTTTCACAC R- ATGCCTCGGCACATCTTTT	212	55
7a (16)	F- CACCACAGATCCTAGGCCTTC R- TGAAGAAGCGGTACACAGCA	197	55
7b (16)	F- GGGAACCAACCCAGTCCAT R- CCAGGCTCTAAGTCTTCATCATC	201	55
7c (16)	F- TGCTTGTGACCTCTGACCTG R- GGGAGACAACACTGGGAAGA	200	55
8 (17)	F- TGCTCACTTGCTTATTTTCATGT R- GCTCCATAGGATTGGCAGAG	292	55
9 (18)	F- CCAGCTTGTAATGCTATCTCTGA R- GGGGACACTACAACCCACAA	290	55
10 (19)	F- GAAGGCAGGAAGGAAGGAA R- CCTCCCAAAGTGCTAGGAAA	261	55
11 (20)	F- TGGGTCTTTTCTTGGGCTAA R- TCGTCTTATCTCGTATGCAATG	206	55
12 (21)	F- GATGGCGTATAAGCACTTGGA R- CTCCTCACCCAGTAACCA	293	55
13 (22)	F- TGCAACAGTATATGATTCTTTGCTTT R- TCAAACCTTTTGAATTTCTGTCTCAA	194	52
14 (23)	F- GAAGCATTAAGAGTATCAACAGTGC R- TTCACTATTAGGATGATTTCTTGG	288	55
15a (24)	F- TGTTCAACTGAGTGATGCTGTTT R- TGGTCCCTCAGAGACTTTTAGA	197	54
15b (25)	F- GCTGCTGTCCCTCCATGCTAT R- GGTACTGGAGAAAATGCCTTTAG	247	55

Taula 3. Variants nucleotídiques de *RPGRIP1*, prenent com a referència la seqüència de cDNA del gen (25 exons) descrit per Gerber i col. (2001) (Genbank AJ417067). Freqüència de les variants en població control: Ala547Ser ->4/6 (heterozigots); Glu1023Gln->1/3(homozigot C/C).

Exó/ Intró	Canvi nucleòtid	Canvi aminoàcid	Pacient (família)	DNA pacient	DNA control	cDNA referència	DNA genòmic referència
intró 9	1152-65G->A		M71	homozigot A	homozigot G	-	A
			V3	heterozigot G/A			
			B26	homozigot A			
exó 13	1639G->T	Ala547Ser	B30	heterozigot G/T	heterozigot G/T	G	G
exó 15	2284C->T	Leu762Leu	V3	heterozigot C/T	homozigot C	C	C
exó 18	3097G->C	Glu1033Gln	V3	heterozigot G/C	homozigot G	C	G

No vam detectar cap canvi patogènic putatiu en la seqüència codificant dels 4 pacients. En canvi, vàrem descriure noves variants polimòrfiques neutres (Taula 3). Per tal d'estudiar un possible efecte patogènic de la substitució Leu762Leu (2284C->T) es van analitzar les possibles seqüències críptiques de *splicing* al voltant de la variant i no se'n va trobar cap. L'efecte final d'aquesta variant sobre el fenotip hauria d'ésser valorat en un assaig d'expressió. El canvi Ala547Ser es troba amb freqüència elevada en la població control. En relació a la substitució Glu1033Gln, les seqüències genòmiques i de cDNA diferien. Comparant la seqüència de tots els individus de V3 (Bayés i col., 1996) i de 3 controls, sembla més probable que la genòmica (3097G) sigui la més freqüent. La mare hauria estat portadora de la variant 3097G->C i l'hauria transmès als seus dos fills. La substitució 3097G->C és present en homozigosi en 1 de 3 individus control seqüenciats, el que suggereix que es tracta d'un polimorfisme neutre. Durant l'escriptura d'aquesta memòria, s'han descrit 9 exons més a la regió 5' del gen (apartat 4.2.3.3 de la introducció). No ha estat possible d'analitzar-los, de manera que queda oberta la possibilitat que els pacients d'alguna d'aquestes famílies puguin presentar algun tipus d'alteració patogènica en aquesta regió.

2.3.3. ABCA4 i altres gens RP en la família M-280

L'anàlisi d'aquesta família es va iniciar en un treball previ a aquesta tesi. Es tracta d'una família mixta amb un pacient Stargardt (apartat 1.2 de resultats), i una pacient RP. El pacient STGD és portador de la variant 5413A->G (N1805D) en homozigosi a l'exó 39 d'*ABCA4*, mentre que el mateix canvi en heterozigosi ha estat detectat en la pacient II.4 afectada de RP (Figura 16). En aquest treball s'ha procedit a la seqüenciació completa d'*ABCA4* en la pacient II.4 però el resultat de la seqüenciació no ha posat de manifest cap més variant.

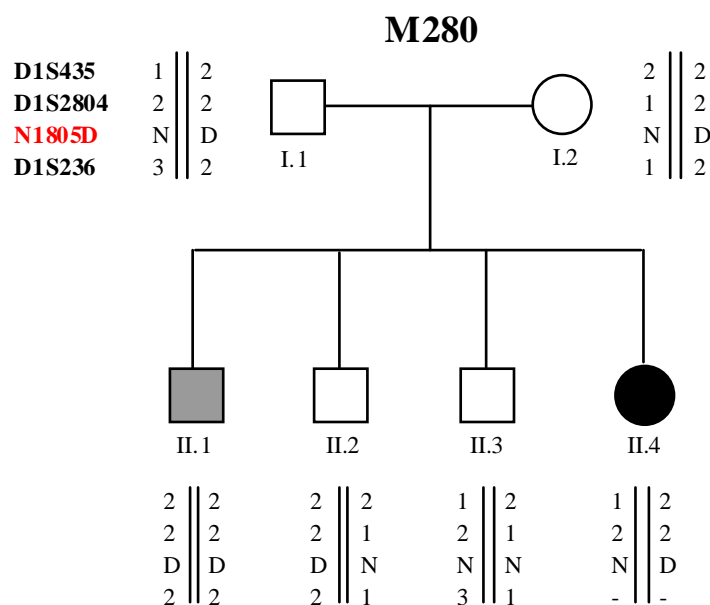


Figura 16. Segregació de la variant N1805D i de diferents marcadors flanquejants a *ABCA4* en la família M-280. En gris s'indica el pacient STGD i en negre la pacient RP.

Davant la hipòtesi que l'arRP en la pacient II.4 pogués ser explicada per algun altre dels gens responsables d'aquesta malaltia, i suposant una possible consanguinitat, es va fer una anàlisi de cosegregació i homozigositat amb 7 gens i 3 loci RP, i es va seqüenciar *ROM1*. Els marcadors utilitzats en aquest estudi, així com l'ordre i distàncies genètiques són les següents:

- **PDE6A:** D5S2013 a 0'14cM cap a 3' del gen *PDE6A*
- **PDE6B:** D4S127 - 17cM - PDEB [(CA)_n a 3' no traduïda del gen] (Weber i col.1993)
- **Rodopsina:** D3S1238 - 5cM - RHO [(CA)_n a l'intró 1 del gen] (Buetow i col.1994)
- **Periferina/RDS:** RDS [(T)_n a la regió 3' no traduïda del gen] (Kumar-Singh i col.1991)- 0'74cM-D6S451- 0'02cM- D6S1604
- **Antigen S (SAG):** D2S130 - 7'7cM - D2S172 - 4'5cM - SAG
- **TULP1:** D6S439 - 0'21cM - TULP1 - 0'68cM - D6S291
- **CNGA1:** D4S1536 - 1'5cM - CNGA1 - 4'9cM - D4S1577
- **RPE65:** D1S1728 - 1'8cM - RPE65 - 5'2cM - D1S1665
- **RP25:** D6S1711 - 5'1cM - D6S1275
- **RP26:** D2S118 - 0cM - D2S389
- **RP12:** D1S158 - 13'5cM - F13B (Leuelt i col.1995)

Les distàncies genètiques han estat actualitzades segons la web UCSC Human Genome Working Draft [<http://genome.cse.ucsc.edu/>] però els marcadors utilitzats han estat seleccionats

d'entre la col·lecció de marcadors disponibles en el laboratori. L'ordre i distàncies entre els marcadors era lleugerament diferent a l'inici del treball. Cal tenir en compte, però, que alguns dels marcadors que actualment es troben allunyats del gen, en el moment d'aquesta anàlisi van ésser descrits com a flanquejants o molt propers.

S'han exclòs tots els gens i loci analitzats com a causants de la patologia en la pacient RP. La majoria pel criteri d'homozigositat.

El gen *ROM1* està format per tres exons, el primer dels quals s'ha amplificat en 4 fragments degut a la seva longitud. S'han seqüenciat directament 6 fragments de PCR que cobreixen tota la regió codificant. No s'ha detectat cap alteració respecte la seqüència dipositada en el GenBank (M96759; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ni respecte a un individu control seqüenciat. Els oligonucleòtids que es varen utilitzar per l'amplificació dels diferents fragments són els descrits a Bayés i col. (1996).

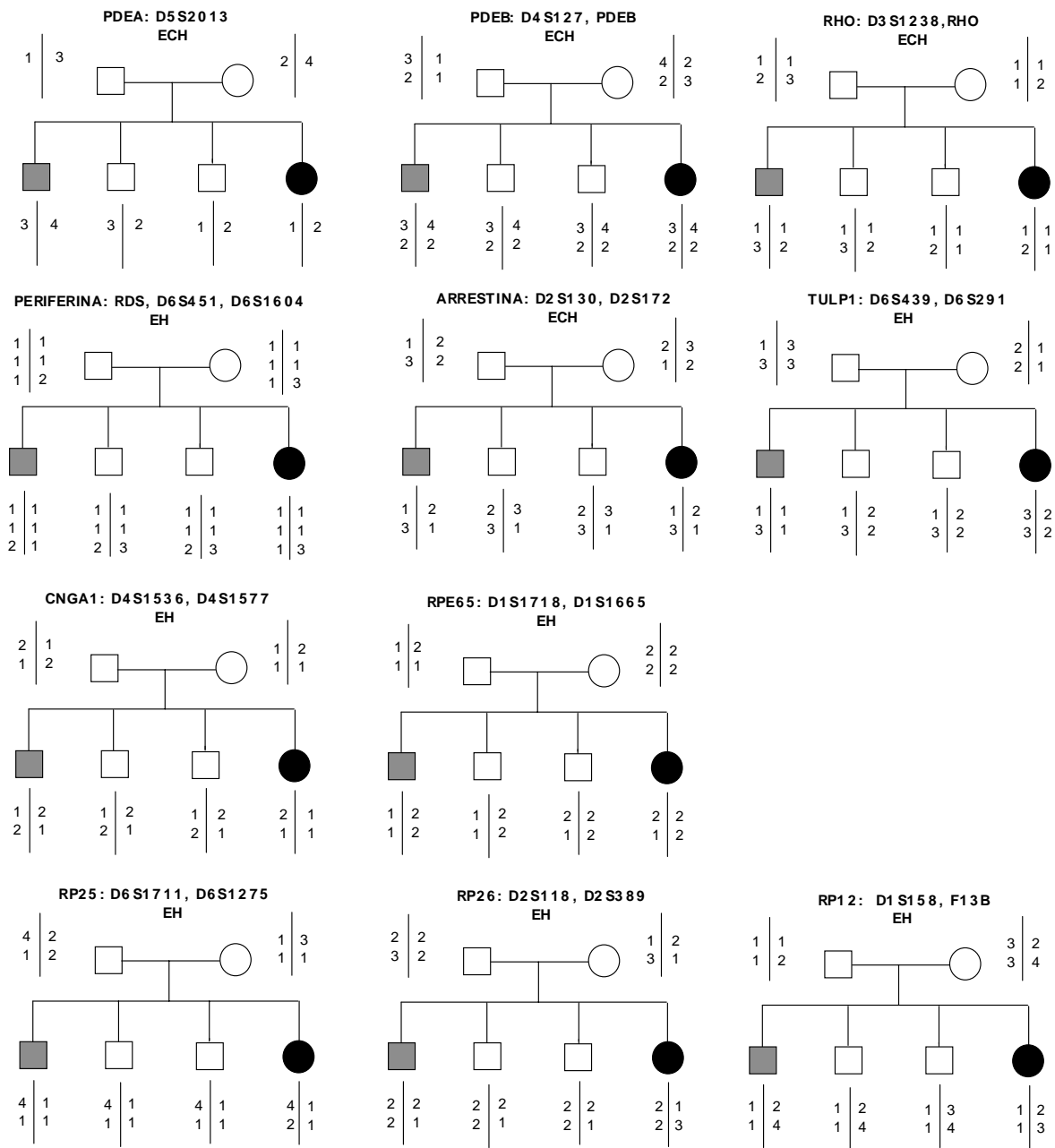


Figura 17. Anàlisi de cosegregació i homozigotitat en la família M-280. Amb gris se senyala al pacient STGD i amb negra la pacient RP. L'ordre dels marcadors s'indica sobre cada pedigrí. EH: exclosa pel criteri d'homozigotitat; ECH: exclosa per cosegregació i homozigotitat.

2.3.4. ROM-1 i altres gens RP en la família V-8

S'ha considerat aquesta família com un cas particular en les anàlisis de cosegregació perquè el seu patró d'herència encara no és del tot clar i perquè diversos membres d'aquesta família són portadors d'un al·lel doble mutant en heterozigosi en el gen *ROM1* que conté les variants P60T i T108M (Martínez-Mir i col., 1997). L'afectació de la germana de la mare (I.3) suggeriria un patró d'herència dominant, però en aquest cas hauríem de suposar penetrància incompleta per a l'individu I.2. El fet que I.2 i I.3 siguin filles d'un matrimoni consanguini i que I.1 i I.2 provenguin del mateix poble indicarien més aviat un patró d'herència recessiu. En canvi, la presència de l'al·lel [P60T; T108M] en heterozigosi en les dos germanes afectes (II.1 i II.2) i en la mare (I.2) i d'acord amb el tipus d'herència proposat per altres autors (Bascom i col., 1995) aniria a favor d'una possible dominància. Tant els 2 membres afectes com els 2 no afectes (la mare, I.2 i un germà, II.3) presenten aquest al·lel que no es troba en cap de 76 cromosomes control analitzats (Martínez-Mir i col., 1997). Vam concloure que o bé es tractava d'una variant patogènica dominant amb penetrància incompleta o, alternativament, d'una herència digènica de *ROM1* amb algun altre gen RP. La hipòtesi d'herència digènica de *ROM1* amb periferina/*RDS* ja havia estat descartada a partir de l'anàlisi de cosegregació amb 2 polimorfismes de *RDS* (Martínez-Mir i col., 1997). En aquest treball s'ha assajat la implicació del gen de la rodopsina, que codifica per una proteïna abundant en els discs dels segments externs dels bastons i per tant propera físicament a *ROM1*. Per abordar aquest punt hem realitzat anàlisi de cosegregació de la patologia amb els marcadors D3S1238 i RHO. L'ordre i distàncies genètiques entre els dos marcadors estan descrits a l'apartat 2.3.3. de resultats. Els resultats demostren que les dues filles afectes hereten un cromosoma patern diferent (Figura 18). Per tant, l'herència digènica de *ROM1* amb la rodopsina va ésser descartada.

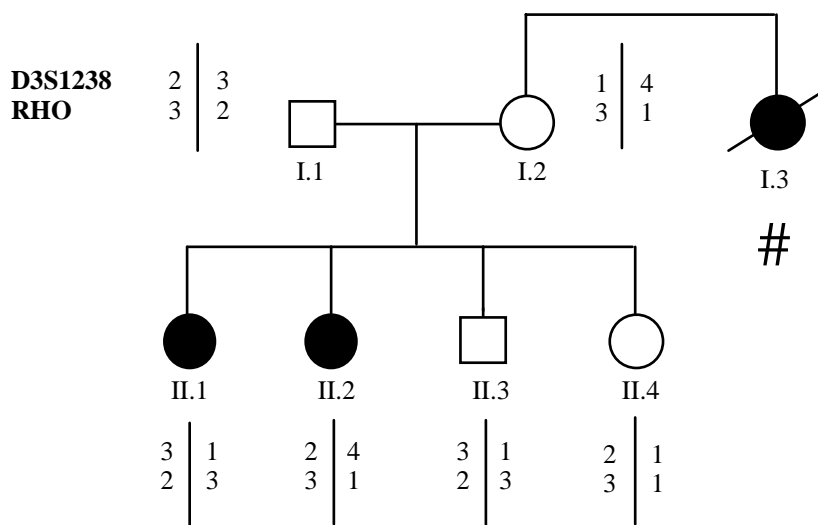


Figura 18. Anàlisi de cosegregació en la família V-8 amb els marcadors D3S1238 i RHO [(CA)_n a l'intró 1 del gen].

2.3.5. Resum de l'anàlisi de gens i loci d'arRP en el panell de famílies espanyoles

A les Taules 4 i 5 es presenten les dades obtingudes de l'anàlisi de cosegregació i homozigotitat, i de la cerca de mutacions en els gens i loci analitzats en les famílies espanyoles.

Taula 4. Anàlisi de cosegregació i homozigotitat, i cerca de mutacions en el conjunt de famílies arRP espanyoles analitzades en aquest treball.

Gens/loci analitzats	Famílies excloses per manca de cosegregació i/o homozigotitat	Mutacions identificades (famílies)
<i>ABCA4</i>	92%	1 (1)
<i>TULP1 (RP14)</i>	83%	2 (1)
<i>CNGA1</i>	76%	1 (1)
<i>RPE65</i>	83%	-
<i>RPGRIPI (NRL)</i>	92%	0
<i>MERTK</i>	95%	-
<i>RP25</i>	82%	-

Taula 5. Resultats de la cerca de mutacions, ja sigui per SSCP o per seqüenciació, en els gens analitzats en el panell de famílies arRP. S'indiquen únicament les variants que cosegreguen amb la malaltia i que es consideren patogèniques.

Gen	Família	Exó	Canvi nucleotídic	Canvi proteic	Detecció	Freqüència cromosomes control
<i>ABCA4</i>	M33	13	1847delA	canvi pauta de lectura	- <i>MboII</i>	0/92
<i>TULP1</i>	M141	5	IVS4-2delAGA	eliminació lloc acceptor d' <i>splicing</i>	+ <i>MspI</i>	0/200
	M141	10	c.937delC	canvi pauta de lectura	Seqüenciació	0/200
<i>CNGA1</i>	M68	3	c.82C->T	R28X	ASOH	0/100

La discussió està organitzada en 4 apartats. El primer i el segon corresponen pròpiament a la discussió dels resultats que es presenten en aquest treball. En el tercer, s'aborden les perspectives de futur referides al diagnòstic, prevenció i teràpia. El darrer apartat recull qüestions no resoltes que es desprenen dels avenços realitzats en aquest camp.

1. LA COMPLEXITAT D'*ABCA4*

1.1. UN NOU GEN RESPONSABLE DEL FENOTIP arRP

L'anàlisi d'*ABCA4* en la família M-33 ha demostrat que un mateix gen és responsable de la malaltia de Stargardt i de la RP, una entitat clínica clarament diferenciada que cursa amb afectació perifèrica de la retina. Es considera que la deleció 1847delA, present en homozigosi en tots els membres afectats de la família, és una variant "greu". El fet que la proteïna codificada per aquest gen hagi estat localitzada a les membranes dels discs dels bastons de la retina, les cèl.lules que apareixen afectades en la RP, ajuda a entendre el fenotip de la família M-33. S'ha descrit que *ABCR* és present tant als bastons com als cons (Molday i col., 2000), fet que explicaria els trets d'afectació macular d'aquests pacients, com ho demostra la disminució de l'agudesia visual i la presència d'espícules de pigment a la màcula. Però, per què si *ABCR* es troba en ambdós tipus de cèl.lules, la malaltia s'inicia en un sol tipus cel.lular? Qui o què determina que mutacions en *ABCA4* causin un inici de disfunció via bastons o via cons? D'acord amb el model de correlació genotip-fenotip que hem proposat, mutacions de tipus *null* en *ABCA4* serien responsables de fenotips severos, com és el cas de la RP. En aquest cas s'acumularien derivats lipídics en els fotoreceptors que, amb el temps, provocarien la pèrdua de funció del RPE i per tant conduirien a una aturada del procés de renovació de les cèl.lules neuronals, fet que activaria l'apoptosi. L'acumulació d'aquests derivats es produiria de forma progressiva i explicaria que la patologia es manifestés al llarg del temps en els pacients.

Després d'aquest estudi han aparegut més casos de RP explicats per mutacions en *ABCA4* (Cremers i col., 1998; Rozet i col., 1999), i s'ha suggerit que aquest gen explicaria aproximadament un 8% dels casos arRP (Maugeri i col., 1999; Maugeri i col., 2000), valor més elevat que el total de casos explicats per qualsevol dels gens identificats com a causants d'aquesta patologia. En relació a aquest punt, *ABCA4* explicaria 1 de les 51 famílies (2%) del panell estudiat en aquesta tesi, valor clarament inferior al hipotetitzat. Per tal d'assolir una estima més precisa s'hauria d'analitzar un nombre més elevat de pacients. De fet, quan es consideren totes les dades recollides fins l'actualitat, la contribució d'*ABCA4* a la RP estaria d'acord amb els nostres resultats (Cremers i col., 1998; Rozet i col., 1999a; Shroyer i col., 2001).

1.2. UN GEN CLAU PER A LES DISTRÒFIES DE LA RETINA

Gens candidats de distròfies retinianes han estat mapats a més de 120 loci en el genoma humà, i menys de la meitat dels gens han estat identificats (RetNet). Això no vol dir que no hagi existit un elevat progrés en la base genètica de les patologies retinianes, però els gens nous descrits expliquen un nombre molt reduït de pacients. *ABCA4* presenta un tret diferencial: es continuen descrivint mutacions noves en aquest gen cinc anys més tard de la seva caracterització i aquestes apareixen associades a patologies de la retina força diferents, que impliquen un marge molt ampli de severitat patològica. Actualment *ABCA4* no sols és el gen principal d'arSTGD-FFM i d'altres patologies més severes com és l'arCRD, sinó que també ha estat proposat com a factor de susceptibilitat per la DMAE. Però la gran heterogeneïtat clínica associada a *ABCA4* complica l'anàlisi de les correlacions genotip-fenotip i el mecanisme que permet donar lloc a aquesta variabilitat encara no és del tot conegut.

1.3. LA BASE GENÈTICA DE LA MALALTIA DE STGD

L'homogeneïtat genètica hipotetitzada inicialment per a la malaltia de STGD ha perdut força amb l'aparició d'uns pocs casos en què *ABCA4* ha estat exclòs. Aquest és el cas de la família mixta consanguínia M-285, amb dos fills RP i un fill STGD (apartat 1.1.3 de resultats). Després d'excloure *ABCA4* es van dur a terme anàlisis de cosegregació i homozigositat amb diferents candidats d'arRP (*CNGA1*, *RPE65*, *RP25* i *MERTK*). Tots ells van ser exclosos, excepte el locus *RP25*, on hi havia manca d'informativitat dels marcadors. La causa genètica de la patologia de la família SZ6, amb un individu STGD, tampoc ha pogut ésser determinada. La naturalesa del canvi H423H, detectat en heterozigosi en el pacient II.2, i el fet que no sembli afectar cap seqüència críptica d'*splicing* reforçaria la no patogenicitat d'aquesta variant. Per tant, tot i que les anàlisis de cosegregació són compatibles amb què *ABCA4* sigui el gen responsable de la malaltia (apartat 1.1.4.3. de resultats), i admetent que podria haver-hi mutacions patogèniques fora de la regió codificant, sembla que aquesta podria ser causada per un altre gen.

O fins i tot, podríem trobar-nos davant fenocòpies? Fins a quin punt els diagnòstics clínics poden estar confonent una patologia amb una altra? Aquestes són algunes de les qüestions que actualment es proposen per continuar defensant la homogeneïtat genètica en la malaltia de Stargardt autosòmica recessiva.

1.4. VARIANTS AL·LÈLIQUES D'*ABCA4* EN LES DISTRÒFIES MACULARS

S'han descrit més de 300 variants d'*ABCA4*. Entre elles hi trobem tots els tipus mutacions, des de petites delecions/insercions nucleotídiques, canvis d'aminoàcid, variants que afecten l'*splicing*,

triplets d'aturada prematura de la traducció i, únicament, una deleció de dos exons del gen. El ventall de mutacions detectades en els pacients espanyols afectats de patologies de la retina reflecteix aquesta gran variabilitat al·lèlica. En absència d'un assaig d'expressió, la valoració de la patogenicitat d'una determinada variant s'ha fet d'acord amb els criteris següents: 1) la naturalesa del canvi. Els canvis d'aminoàcid no conservatius s'han considerat patogènics mentre que substitucions aminoacídiques conservatives i les que no afecten cap seqüència d'*splicing* no s'han considerat patogèniques. Les variants que provoquen un canvi en la pauta de lectura solen generar codons d'aturada prematura de la traducció i, per tant, la proteïna és incompleta i la major part de vegades, no funcional; 2) cosegregació de la mutació amb la malaltia i si hi ha consanguinitat s'ha de trobar en homozigosi en tots els afectes; 3) no s'ha de trobar en la població sana, generalment s'analitzen 100 cromosomes control; i 4) la localització del residu afectat pot ajudar a definir la seva patogenicitat, especialment si aquesta es troba en els dominis funcionals predits.

L'anàlisi d'*ABCA4* en pacients espanyols afectats de distròfies maculars també ha revelat una elevada freqüència de substitucions aminoacídiques i un baix nombre d'insercions i delecions. La correlació genotip-fenotip segueix les pautes del model que vam proposar. La descripció de noves mutacions associades a una clínica ben definida ha permès completar les relacions establertes inicialment. A més de les substitucions d'aminoàcid - probablement es manté una funció residual i per tant afectació relativament lleu - i truncaments de la proteïna - absència de funció, afectació severa - hi ha tot un ventall de substitucions aminoacídiques, l'efecte de les quals és difícil de predir, ja sigui per la seva localització o perquè es troben acompanyades d'altres variants en un mateix al·lel. Darrerament s'ha descrit un assaig d'expressió *in vitro* per ABCR (Sun i col., 2000). Així s'ha demostrat que substitucions d'aminoàcid poden comprometre totalment la funcionalitat (Shroyer i col., 2001). Aquest fet qüestiona el model perquè molts dels al·lells de canvi de sentit identificats en població STGD podrien ésser més severos que el que s'havia hipotetitzat. També s'ha demostrat que existeixen efectes sinèrgics entre variants. Dues mutacions que analitzades per separat tenen un efecte lleu sobre la proteïna, quan es troben juntes en un mateix al·lel incrementen la severitat del seu efecte. Un exemple és l'al·lel doble mutant [W1408R; R1640W] detectat en una família amb afectes de STGD i RP que afecta severament la quantitat de proteïna produïda essent considerat un al·lel *null*, mentre que l'estudi de les dues variants per separat no tenen aquest efecte tan sever (Shroyer i col., 2001). En aquest sentit, l'elevada presència d'al·lells doble mutants en *ABCA4* podria reflectir, en part, aquests efectes. Curiosament en el gen responsable de la fibrosi quística, *CFTR*, es dona aquesta elevada freqüència d'al·lells doble mutants i aquest gen també pertany a la superfamília de transportadors ABC.

Per tant, tot i el model de correlacions genotip-fenotip inicialment predit, hem de considerar que allò realment important no és sols el tipus de mutació sinó l'activitat de la proteïna sintetitzada. Segurament, existeixen llandars d'activitat d'ABCR i segons la quantitat de proteïna funcional que un pacient presenti, manifestarà patologies més o menys severes.

Els canvis intrònics no detectats en la població control han estat analitzats a un altre nivell, mesurant si la substitució pot activar llocs críptics d'*splicing*. Una d'aquestes variants, c.1356+11delG afecta a una seqüència donadora d'*splicing* críptica a l'intró 10 d'*ABCA4* (Figura 1). L'hem analitzada en profunditat perquè s'ha trobat en el pacient de la família SP2, en el qual no s'ha detectat cap altra variant que pogués explicar la patologia. Aquest al·lel era present en 7/140 (5%) cromosomes control, i va fer pensar que no era patogènic. Malgrat tot, la utilització d'una seqüència críptica d'*splicing* situada en la regió de la deleció, donaria lloc a la síntesi d'una proteïna amb 3 aminoàcids addicionals que quedarien en pauta. En aquest cas, però, el valor CV de la seqüència críptica mutada és clarament inferior (Cv SC Mt= 49'45) al valor de la silvestre (CV SC Wt= 74.27).

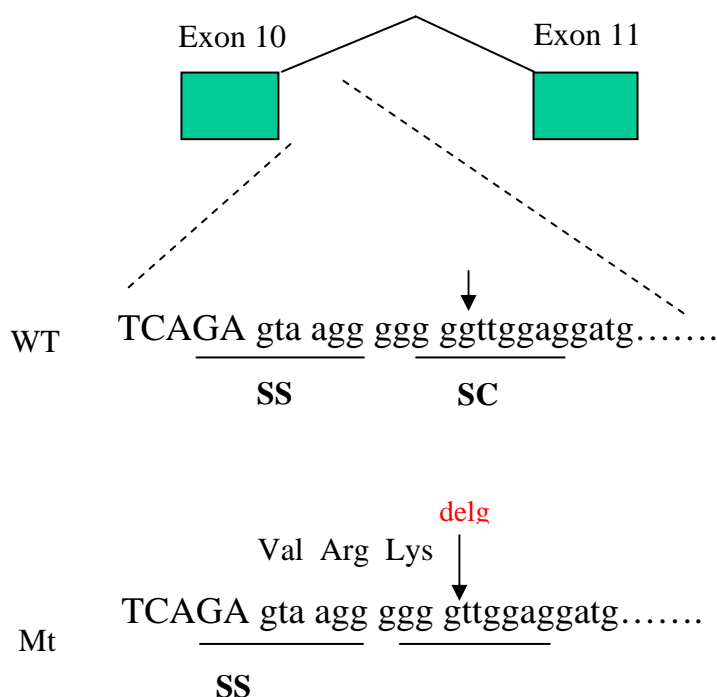


Figura 1. Seqüència a 3' de l'exó 10 on s'indica la seqüència consens de *splicing* (SS) i la seqüència críptica (SC) en l'al·lel silvestre (WT) i en el mutant (Mt) per la variant c.1356+11delG.

SC

1.5. EFICIÈNCIA EN LA DETECCIÓ DE VARIANTS PATOGENIQUES EN ELS INDIVIDUS STGD

Una de les principals dificultats en l'anàlisi de la contribució d'*ABCA4* a les diferents patologies retinianes és l'elevat grau de polimorfisme en la població control. S'ha comparat la

diversitat nucleotídica d'*ABCA4* amb *VMD2* i *EFEMP1*, dos gens responsables d'altres alteracions de la retina. El resultat ha estat que *ABCA4* presenta un valor entre 9 i 400 vegades superior al d'aquests gens (Webster i col., 2001). Un 75% de la població porta com a mínim una diferència respecte la seqüència consens del gen (Fumagalli i col., 2001). Tot i l'elevat grau de diversitat al·lèlica, un nombre significatiu de variants patogèniques s'escapa a les tècniques de detecció de mutacions, la majoria de les quals es basen en la metodologia de la PCR. La taxa de detecció de variants patogèniques en població STGD es troba entre un 57 i un 60% en les anàlisis realitzades per molts grups diferents (Lewis i col., 1999; Fishman i col., 1999; Maugeri i col., 1999; Papaionnau i col., 2000; Simonelli i col., 2000; Rivera i col., 2000). En el nostre cas ens trobem davant una eficiència de detecció del 57%. Aquest baix percentatge, inicialment atribuït a limitacions metodològiques no s'ha incrementat després d'optimitzar els nivells de detecció combinant l'SSCP amb detecció d'heterodúplex i DGGE amb cromatografia desnaturalitzant d'alta pressió. Actualment es tendeix a la seqüenciació directa del gen. Malgrat això, els percentatges de detecció no han millorat. No hi ha dades que expliquin aquest fet. Una hipòtesi recurrent és que una variant freqüent estigués associada a una reorganització d'aquesta regió del genoma i que inclogués el promotor. S'ha descrit mitjançant una anàlisi *Southern* una deleció de dos exons en heterozigosi en un únic pacient (Maugeri i col., 1999). Posar a punt les condicions de *Southern* amb un gen de 50 exons i 150 Kb és una feina difícil i que requereix elevades quantitats de DNA no degradat, i sovint és la limitació més important. D'altra banda, no hem reeixit l'aproximació mitjançant *long-range PCR* per a detectar deleccions o insercions en diferents exons.

Front aquests resultats queden obertes diferents possibilitats:

a) L'elevada freqüència de variants neutres enriquides en població STGD seria deguda a que, de fet detectem variants en desequilibri de lligament amb la mutació patogènica. Això només seria acceptable si aquestes variants es trobessin en molt baixa freqüència en la població control.

b) S'haurien subestimat les variants neutres, és a dir, aquestes no serien tant polimòrfiques. En el gen de la fibrosi quística (*CFTR*) s'ha suggerit que determinades variants presents en població control poden afectar a l'expressió d'altres variants en el mateix gen, tot i que els mecanismes que podrien explicar aquest fet són encara desconeguts (Cuppens i col., 1998).

c) Alguns canvis silenciosos introduïrien llocs d'*splicing* ectòpics i afectarien els nivells de mRNA. Aquesta hipòtesi ha estat analitzada en el nostre treball.

d) No podem descartar que algunes patologies siguin fenocòpies no causades per *ABCA4*, sinó degudes a altres factors, entre ells, els ambientals.

e) Malgrat que no es pot descartar microheterogeneïtat genètica en la regió 1p22.2, és a dir, l'existència de dos gens propers en aquesta regió, no sembla probable, ja que: 1) altres gens candidats en aquesta regió han estat posteriorment exclòsos; 2) aquesta regió està quasi totalment seqüenciada i no hi ha discontinuïtats grans per completar; i finalment 3) el fet que detectem un

35% d'individus heterozigots front 18% d'homozigots per a mutacions en *ABCA4* reforça la hipòtesi d'un únic gen.

1.6. AMPLIACIÓ DEL MODEL DE CORRELACIONS GENOTIP-FENOTIP: LA FAMÍLIA L-H

L'anàlisi de la família L-H (apartat 1.1.3 de resultats) ha suggerit l'ampliació del model inicialment proposat per explicar les correlacions genotip-fenotip (Figura 2). Les **distròfies en patró de l'epiteli pigmentari de la retina** comprenen un grup de patologies hereditàries que afecten l'epiteli pigmentari, l'àrea macular i el pol posterior de l'ull. Són distròfies lleus amb poca o nul·la alteració de l'agudesa visual. S'observen diferents patrons reticulars en el fons d'ull, en forma de línies pigmentades que s'inicien durant la infància i progressen amb el temps. L'EOG, amb resposta disminuïda, és l'únic tret diferencial en el diagnòstic. Inicialment es considerava que els diferents patrons de pigmentació descrits corresponien a entitats clíniques diferents, però el fet que els dos ulls d'un mateix pacient presentessin patrons diferents, i que en diferents membres d'una mateixa família s'observessin patrons reticulars diferents, ho ha fet reconsiderar. La confirmació resta pendent de l'estudi genètic dels fenotips. I, de moment, sols s'han descrit mutacions dominants en el gen de la periferina/*RDS* i en *ELOVL4* (Nichols i col., 1993; Kim i col., 1995; Lagali i col., 2000; Bernstein i col., 2001).

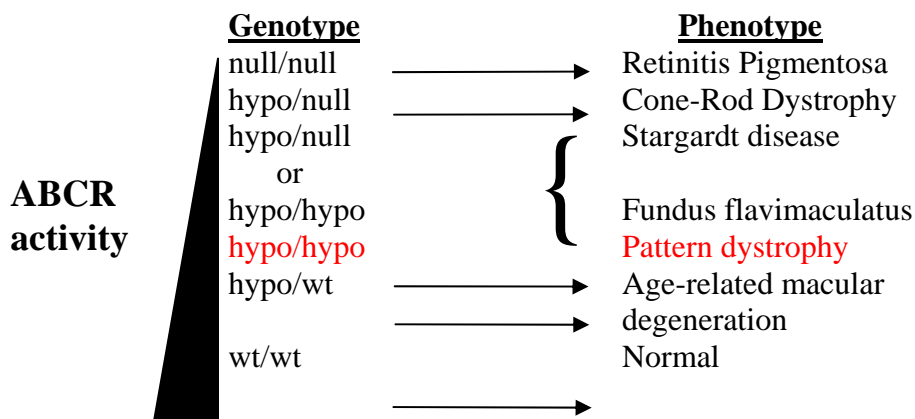


Figura 2. *ABCA4*, ampliació del model de correlacions genotip-fenotip. Les distròfies en patró, causades per dues variants "lleus", se situarien entre el FFM i la DMAE (adaptat de Shroyer i col., 1999).

En la família L-H no disposem de dades oftalmològiques dels progenitors del pare, i els fills no presenten cap característica clínica que recordi a la distròfia en patró. Una possible hipòtesi és que es tracta d'un patró d'herència recessiu i les dues variants detectades en el pacient I.1 de la

família I són patogèniques (apartat 1.1.3 de resultats). També podríem considerar que la combinació d'al·lels d'*ABCA4* dels fills seria la causa d'altres distròfies que emmascararien el patró reticular. Tenint en compte el model que relaciona les patologies retinianes amb combinacions al·lèliques diferents per *ABCA4*, i que les distròfies en patró són clínicament més lleus que STGD o que FFM, la causa de la patologia seria deguda a la presència de dues mutacions "lleus" en *ABCA4*, i per tant, les dues mutacions detectades en aquest pacient s'haurien de classificar com a variants no gaire severes.

L'assaig d'expressió *in vitro* de F553L i R1097C, les dues variants detectades en el pacient I.1 afectat de distròfia en patró, contribuirien a demostrar el grau d'afectació funcional de la proteïna. F553L és una variant descrita per primera vegada en aquest treball i de la qual no tenim cap dada funcional. La segona variant, R1097C, ha estat descrita en heterozigosi en pacients STGD, però en tots ells es desconeix la mutació en l'altre cromosoma.

1.7. *ABCA4*: SUSCEPTIBILITAT GENÈTICA A LA DMAE?

La identificació dels factors genètics associats a la DMAE no està exempt de dificultat degut essencialment a la complexitat d'aquesta patologia. Les anàlisis de lligament són difícils perquè el patró d'herència no està establert, la malaltia es presenta cap a la tercera edat i, en general, els pares dels afectats són morts i els fills massa joves per a manifestar-la. La DMAE és una patologia multifactorial en la que intervenen un conjunt de factors de risc juntament amb la influència de l'ambient. Finalment hi ha un biaix poblacional en els estudis realitzats: les freqüències al·lèliques d'*ABCA4* poden diferir en diferents ètnies i poblacions específiques, fet que pot conduir a una associació errònia entre una determinada variant i el risc de DMAE, i pot emmascarar l'efecte real que aquesta variant té sobre la patologia.

Per a la cerca de gens o loci de susceptibilitat a la DMAE, s'han seguit aproximacions diferents. Entre elles, els estudis de lligament no paramètrics en un nombre relativament elevat de famílies de mida petita. L'aproximació no paramètrica permet l'estudi de l'associació potencial d'un locus a la DMAE sense que calgui especificar el tipus d'herència. Si es disposa d'un nombre suficientment elevat de famílies es pot identificar, fins i tot, un locus genètic minoritari que contribueixi a una determinada patologia, però el que encara no s'ha estimat és el nombre mínim de famílies necessàries per validar l'estudi estadístic (Gorin i col., 1999). En aquests casos, treballar amb poblacions de reduïda diversitat genètica podria facilitar l'anàlisi. Una altra d'aproximació a considerar seria partir de l'anàlisi de malalties maculars d'inici primerenc, amb patrons d'herència clars i de les quals se'n coneguin els gens responsables i, a partir d'aquí, extrapolar els coneixements a formes més complexes com és la DMAE. L'estudi d'un nombre elevat de mostres de poblacions d'arreu del món ha permès obtenir dades estadísticament significatives d'associació

entre un risc més elevat de patir DMAE i determinades variants d'*ABCA4* (Allikmets i col., 2000a; Allikmets, 2000b).

L'estudi de la DMAE ha revelat que diferents poblacions presenten freqüències més elevades per al·lels d'*ABCA4* respecte d'altres, i això dificulta l'evaluació del grau de risc d'una determinada variant en la població general. És per això, que estudis realitzats per diferents grups han arribat a conclusions diferents o, fins i tot, oposades. És realment difícil realitzar aquest tipus d'aproximacions en casos com aquests, on a més de l'elevada heterogeneïtat al·lèlica, la freqüència de cada variant en cada població està molt condicionada pels efectes fundadors. A aquesta complexitat s'han d'afegir els factors ambientals, que poden reforçar o minimitzar els efectes genètics. Així, en poblacions amb més fumadors o sotmeses a dietes riques en colesterol es podrien detectar freqüències més elevades de DMAE que podrien emascarar l'efecte genètic. Dades recents han arribat a aquesta conclusió després d'observar que no sempre hi ha concordança entre alguns al·lels *ABCA4* i aquesta patologia (Bernstein i col., 2002).

1.8. ORIGEN DE LES MUTACIONS 2588G->C I L1940P EN EL GEN *ABCA4*

S'han fet alguns estudis poblacionals per tal d'esbrinar si algunes de les variants del gen *ABCA4* estan més o menys representades en les diferents poblacions arreu del món. La informació de les diferents cerques de mutacions fetes per diferents grups junt amb algun d'aquests estudis poblacionals permet deduir unes primeres observacions.

S'han descrit dues variants com a més predominants entre la població STGD dels Estats Units (la majoria són descendents de famílies del nord i centre Europa) que representen un 18'5% de totes les mutacions identificades en aquest gen. Aquestes variants són G1961E i A1038V. En població alemanya G1961E es troba en un 20'5% dels al·lels STGD, mentre que en altres poblacions es detecta entre 4-9% (Allikmets i col., 1997a; Lewis i col., 1999; Maugeri i col., 1999; Simonelli i col., 2000).

La variant 2588G->A (G863A o delG863) a l'exó 17 del gen s'ha detectat en un 37'5% dels pacients STGD de l'oest d'Europa, i es troba en desequilibri de lligament amb un polimorfisme 2828G->A (R943Q) a l'exó 19. Representa un 20% dels al·lels causants de malaltia en el nord d'Europa, mentre que en la població general d'aquesta regió s'hi detecta en un 3%. Es detecta en elevada freqüència (10.2% dels al·lels causants de malaltia) en població alemanya (Rivera i col., 2000).

El fet que hi hagi poblacions amb una freqüència més elevada d'una determinada variant planteja l'existència de possibles efectes fundadors. En aquest sentit, la variant 2588G->C ha estat objecte d'un estudi multicèntric. La col.laboració de molts grups ha permès demostrar l'origen únic d'aquesta mutació i el gradient de freqüència d'aquest al·lel en les poblacions europees. En canvi, la mutació L1940P, només ha estat detectada en població espanyola. Si considerem que les tres

famílies que la presenten provenen d'una mateixa regió geogràfica, també en aquest cas, es pot suggerir un origen únic per aquesta variant. Per arribar a una conclusió definitiva, caldria analitzar més famílies de la mateixa regió i estendre el nombre de marcadors dels haplotips.

La localització de les variants més estudiades d'*ABCA4* es presenta a la figura 3.

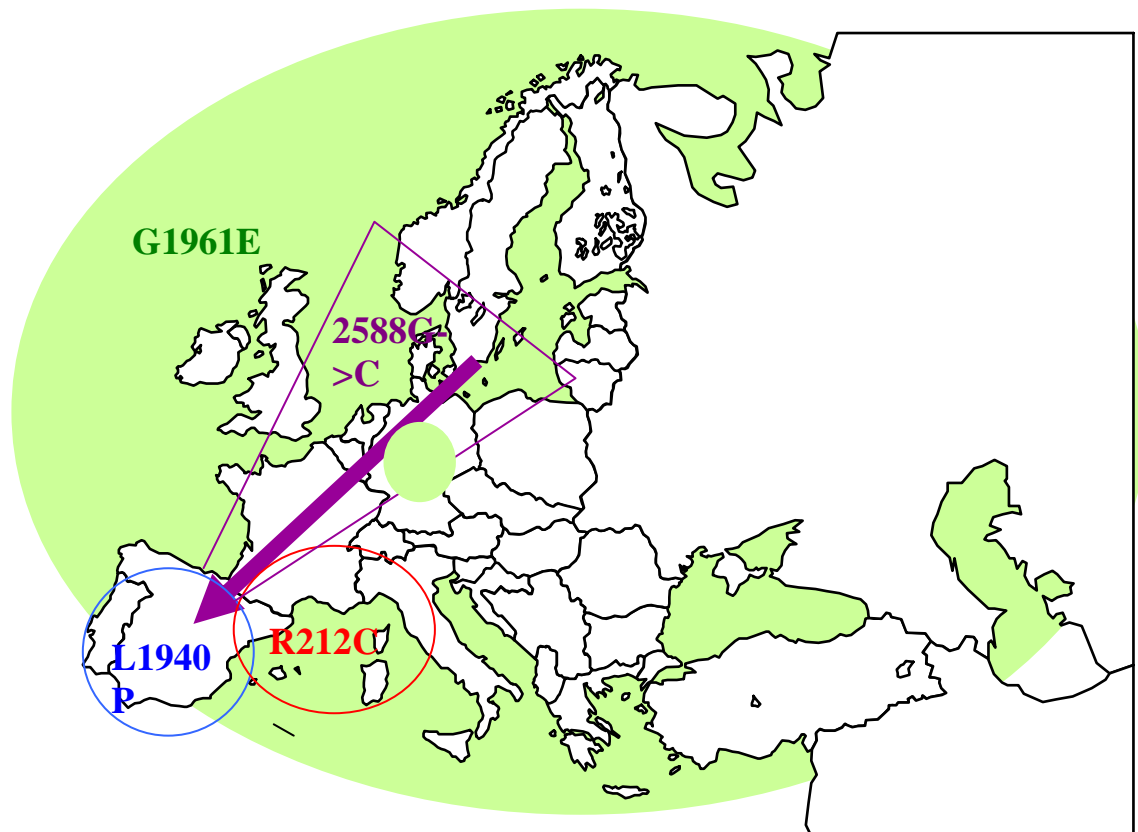


Figura 3. Distribució geogràfica de les variants G1961E, 2588G->C, R212C i L1940P d'*ABCA4*. La fletxa indica el gradient de distribució decreixent cap al sud en la variant 2588G->C.

G1961E és una de les variants patogèniques més freqüents en els Estats Units, i present en gairebé totes les poblacions. Aquest canvi també s'ha detectat en heterozigosi, amb freqüència elevada, en la població control somalí (Guymer i col., 2001). Encara no s'han fet estudis d'haplotips per establir o refutar un origen únic d'aquesta mutació.

1.9. LA FAMÍLIA SZ5

La base genètica de la patologia d'aquesta família resta pendent de ser explicada (apartat 1.1.4.2 de resultats). Les dues variants que s'han detectat en el gen *ABCA4* havien estat descrites prèviament per diferents autors com a variants neutres (Simonelli i col., 2000; Rivera i col., 2000;

Webster i col., 2001). A més, N1868I, tot i ser detectada en població control en diferents grups, ha estat analitzada en un sistema funcional *in vitro* que quantifica l'activitat ATPàsica associada a ABCR. S'ha observat una petita, però reproduïble, disminució d'aquesta activitat respecte la variant silvestre (Sun i col., 2000). Aquestes dades permeten hipotetitzar que aquest canvi, tot i tenir un efecte lleu, afecta d'alguna manera la funció, i podria contribuir a un efecte sinèrgic amb una altra variant, per exemple R212H, una variant neutre també detectada en el mateix cromosoma. Per demostrar una herència dominant, caldria analitzar la resta de membres de la família, fet que no ha estat possible. D'altra banda no s'ha descrit cap cas de Stargardt degut a mutacions dominants a *ABCA4*. Mantenint la hipòtesi d'herència dominant vam analitzar els dos únics loci dominants descrits. Per anàlisi de cosegregació la vinculació del locus *STGD3* ha estat descartada, però en canvi, el locus *STGD4* no ha estat exclòs. Malauradament, no hi ha cap gen candidat en aquesta regió i, per tant, no hem pogut aprofundir en aquesta hipòtesi.

2. GENS ASSAJATS EN L'ESTUDI DE LES BASES GENÈTIQUES DE L'arRP.

2.1. *TULPI*: LA FAMÍLIA M-141

En aquesta família s'ha demostrat que *TULPI* és el gen responsable del fenotip arRP (apartat 2.1 de resultats). De les 49 famílies arRP del panell, 7 (14%) van ésser seleccionades després d'un estudi d'homozigositat i/o cosegregació entre l'arRP i el locus *RPI4*. L'anàlisi mutacional posterior va permetre descriure a la família M-141, no consanguínia, dues variants que cosegregaven amb la malaltia. Ambdues variants IVS4-2delAGA i c.937delC són delecions que provoquen un truncament de la proteïna i, molt probablement, són la causa de la patologia. A més, vam detectar el canvi c.394del24, delecio que elimina 8 aminoàcids de la regió N-terminal de la proteïna sense que es trenqui la pauta de lectura, descrit per Gu i col. (1998) com a putatiu canvi patogènic, en un 2% de població control espanyola. Aquest fet qüestiona la patogenicitat d'aquesta variant. La regió C-terminal, conservada respecte els altres membres de la família TUB (63-90% d'identitat aminoacídica; North i col., 1997), podria ser la regió més crítica a nivell funcional. *TULPI* ha estat implicada en el transport de les opsines cap al segment extern tan en bastons com en cons (Hagstrom i col., 1999; Ikeda i col., 1999). Deficiències funcionals degudes a les mutacions descrites explicarien tant l'afectació perifèrica, derivada de la funció dels bastons, com l'afectació macular d'acord amb la reducció de l'agudesia visual i l'alteració de la visió en color (derivada dels cons) en els nostres pacients.

El gen *TULPI* explica només un 2% de l'arRP espanyola, fet que no sorprèn, i és comparable a la resta de gens responsables d'aquesta patologia entre els que s'inclou *CNGAI* (també analitzat en aquest treball).

Els pacients de la família M-266, seleccionada inicialment per aquestes anàlisis de cosegregació, van ser rediagnosticats *a posteriori* com a afectats de distròfia de cons i bastons. No vam detectar cap mutació en *TULP1*. En canvi, els dos fills afectes eren portadors de dues mutacions en *ABCA4* que segregaven en la família (apartat 1.1.2 de resultats) i que podrien explicar la malaltia.

2.2. *CNGA1*: LES FAMÍLIES M-68 i M-71

La relació entre *CNGA1* i el fenotip RP ha estat àmpliament demostrada (Molday i Hsu, 1995; Schwarzer i col., 2000). En aquest treball s'han detectat dues variants en dues famílies arRP no consanguínies, M-68 i M-71 (apartat 2.2. de resultats). La mutació R28X, situada a l'extrem N-terminal de la proteïna, és la causa de la patologia en la família M-68. El fet d'haver-la detectat en homozigosi planteja un possible llaç de consanguinitat que no ha pogut ser documentat. En canvi, a la família M-71, la variant R28Q (trobadra en menys d'un 1% en la població control analitzada) l'havien heretat tots el fills.

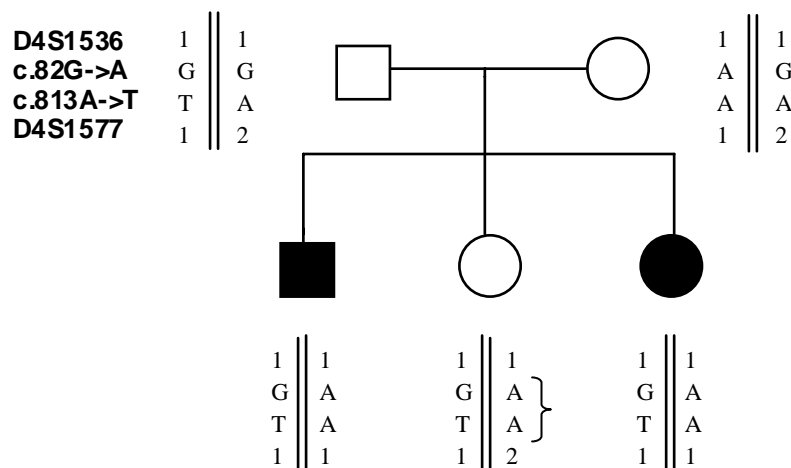


Figura 4. Família M-71. Segregació de la variant R28Q (G82A) i de 3 marcadors flanquejants. Amb una clau s'assenyala la regió en la que es situa la possible recombinació en el cromosoma matern de l'individu sa.

El resultat de l'anàlisi dels dos marcadors flanquejants al gen en aquesta família, havia fet que fos seleccionada per a la cerca de mutacions. Després d'analitzar un SNP intern al gen (c.813A->T), es va poder observar que el fill no afectat era portador d'una recombinació entre c.813A->T i D4S1577 que no s'havia detectat en l'estudi previ amb els dos marcadors externs. Finalment l'anàlisi de la variant c.82G->A va confirmar la recombinació en l'individu sa. Així es va determinar que, de fet, el locus *CNGA1* no cosegregava amb la malaltia en aquesta família, i per tant, que la variant R28Q no pot ser la responsable de la patologia.

Un fet sorprenent és el menor nombre de mutacions detectades en *CNGA1* respecte *CNGA3*, les subunitats α dels canals dependents de cGMP de bastons i cons, respectivament. Mentre a *CNGA1* només han estat descrites 6 mutacions (amb la descrita en aquest treball), a *CNGA3* se n'han descrit un centenar (Wissinger i col., 2001). Ambdues subunitats presenten la mateixa estructura i realitzen la mateixa funció en ambdós tipus cel·lulars, per tant s'esperaria una freqüència de mutacions similar. Per explicar aquest fet hauríem de considerar els punts següents: 1) el nombre de pacients analitzats no ha estat el mateix, 262 famílies per *CNGA3* i 173 famílies més les 10 analitzades en aquest treball, per *CNGA1*; 2) les regions 5' i 3'-UTR del gen *CNGA1* no han estat analitzades, però tampoc s'han estudiat en la subunitat α dels cons; i finalment, 3) aquesta diferència quantitativa es podria explicar si les mutacions de *CNGA1* estiguessin associades a d'altres patologies de la retina no analitzades. Això és difícil de comprovar i en molts casos l'atzar juga un paper important. També cal destacar que, de les 6 variants de *CNGA1* descrites, 3 són mutacions que trunquen la pauta de lectura de la proteïna a l'extrem amino-terminal (Figura 5). En el nostre cas, els afectats són portadors d'aquesta variant en homozigosi, el que explicaria la severitat fenotípica en aquests pacients.

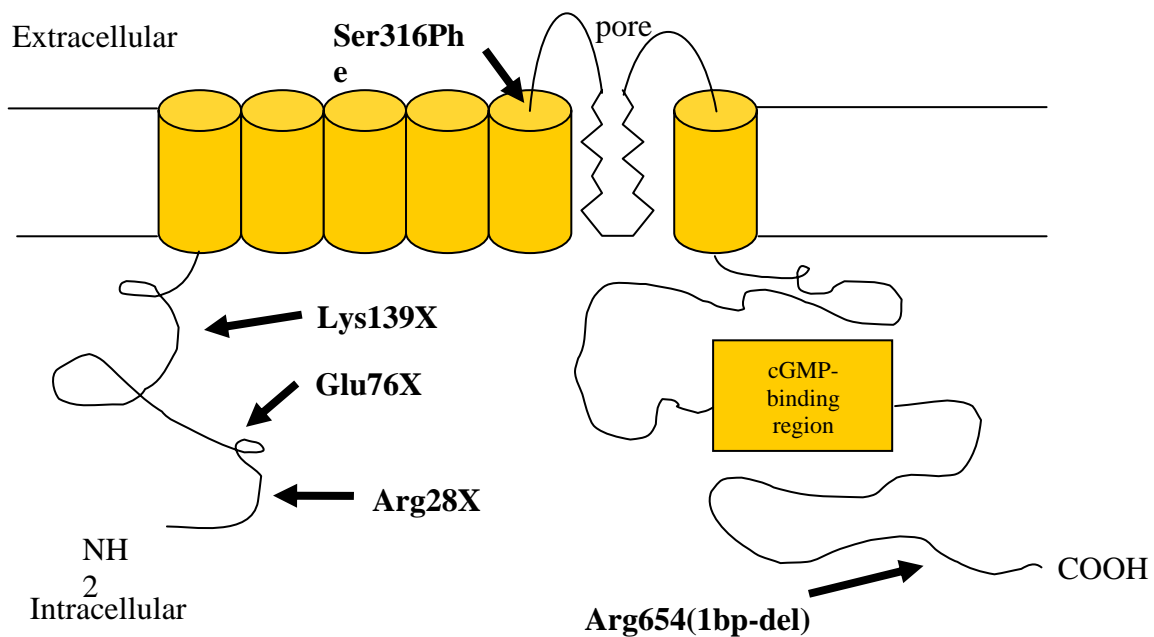


Figura 5. Esquema de la proteïna codificada per *CNGA1*. S'assenyalen 5 de les 6 mutacions descrites en pacients arRP.

2.3. EL GEN *RPGRIP1*

La proteïna codificada pel gen *RPGRIP1* interacciona amb RPGR, la proteïna alterada en la majoria dels fenotips xLRP. Això ha fet pensar en un possible efecte d'aquest gen sobre algun dels fenotips RP. S'ha hipotitzat una vinculació al transport vesicular dins els bastons, i RPGRIP1 ha estat localitzada al cili connector tant de bastons com de cons. És un component estructural de l'axonema d'aquest cili connector (Roepman i col., 2000; Hong i col., 2001). S'ha proposat que RPGR seria l'encarregada del transport de les opsines des del segment intern, on són sintetitzades, al segment extern on realitzen la seva funció, i que la formació d'un complex amb RPGRIP1, li facilitaria el transport direccional, en contra del gradient de concentració cap al segment extern (Hong i col., 2001). Seguint aquesta hipòtesi, mutacions en aquest gen seran greus, perquè la rodopsina és la molècula que rep el fotó de llum i la que inicia el procés de fototransducció. Si no es troba correctament posicionada en els discs, la fototransducció queda bloquejada en el primer pas. Actualment, només s'han detectat mutacions en aquest gen en pacients afectats de l'amaurosi congènita de Leber, una patologia clínicament molt semblant a la RP, però d'aparició molt primerenca, molts nens ja neixen cecs. Totes les mutacions detectades són *null*. Els individus portadors d'aquestes variants pateixen degeneració tant dels bastons com dels cons i en ells també es dona una pèrdua severa de l'agudesia visual central. La severitat d'aquest fenotip, en els afectats no s'arriben a formar els segments externs dels fotoreceptors, sembla coherent amb les mutacions detectades. De la mateixa manera, quan la proteïna RPGR muta, és la responsable dels casos més severos de xLRP que s'inicien en la primera dècada de vida.

La posició del gen *RPGRIP1* en els mapes físics ha anat variant, i en el moment en què es va realitzar aquesta anàlisi, *NRL* i *RPGRIP1* es trobaven situats molt a prop l'un de l'altre, de manera que les anàlisis de cosegregació realitzades amb el primer, van ser utilitzades per seleccionar un conjunt de famílies en les quals s'ha dut a terme la cerca de mutacions en *RPGRIP1* (apartat 2.3.1. de resultats). Avui, que quasi s'ha completat la seqüenciació del genoma humà, se sap que *RPGRIP1* se situa fora de l'interval de marcadors utilitzats en les anàlisis de cosegregació de *NRL*, tot i que continua sent proper. Potser per això, no hem trobat cap variant patològica en aquest gen en les 4 famílies analitzades. A més, el fet que actualment el gen tingui 9 exons addicionals, descrits amb posterioritat al nostre estudi, manté oberta la seva condició de candidat.

2.4. LA FAMÍLIA M-280

M-280 és una família mixta amb un membre STGD i un RP (apartat 2.3.3. de resultats). La mutació N1805D detectada en homozigosi en el pacient STGD podria explicar la patologia, però la pacient RP només presenta una còpia d'aquest al·lel. Sota la hipòtesi que els dos fenotips són causats pel mateix gen, la variant d'*ABCA4* no cosegrega amb la patologia. No sembla probable que la pacient RP fos portadora d'una mutació diferent en *ABCA4* si tenim en compte que pare (I.1) i filla (II.4) d'aquesta família presenten la mateixa combinació d'al·lels per al locus *RPI9* (Figura 16

de resultats). Per comprovar si s'havia generat una variant *de novo* en la pacient RP (II.4) vam seqüenciar tot el gen incloent-hi la regió promotora, i no vam detectar cap altra variant. Sembla, doncs, que *ABCA4* no seria la causa de la malaltia, a no ser que s'hagués produït una reorganització gènica *de novo*, no detectable amb les tècniques utilitzades. A més, l'estudi de la segregació dels marcadors flanquejants al gen, no ha permès identificar cap regió en homozigosi indicativa d'alguna reorganització.

Finalment, vam analitzar altres gens arRP diferents d'*ABCA4*. Les anàlisis de cosegregació han permès descartar 9 gens i 4 loci RP (Taula 1). Queda pendent l'assaig d'expressió de la variant N1805D per tal d'esbrinar la seva implicació en la patologia del pacient II.1 (STGD).

Taula 1. Gens i loci analitzats per anàlisi de cosegregació i homozigositat en la família M-280.

Gens i loci analitzats	Resultats de les anàlisis de cosegregació (nºmutacions)
<i>Rodopsina</i>	ECH
<i>Periferina/RDS</i>	EH
<i>ROM-1</i>	-(Cap mutació)
<i>PDE6A</i>	ECH
<i>PDE6B</i>	ECH
<i>Arrestina o antigen S</i>	ECH
<i>ABCA4</i>	-(una mutació)
<i>CNGA1</i>	EH
<i>RPE65</i>	ECH
<i>RP12</i>	ECH
<i>RP14</i>	EH
<i>RP25</i>	EH
<i>RP26</i>	EH

ECH: exclusió per cosegregació i homozigositat; EH: exclusió per homozigositat.

2.5. LA FAMÍLIA V-8

En un treball anterior a aquesta tesi es va detectar un al·lel doble mutant en heterozigosi en el gen *ROM-1* en els dos membres afectats de RP de la família V-8, així com en dos membres que no presentaven alteracions retinianes. Aquesta variant no era present en cap dels 76 cromosomes control analitzats. També cal remarcar que la forma d'herència de la RP no era clara en aquesta família. Vam considerar que la RP fos deguda a mutacions recessives en algun dels gens candidats per l'arRP o a una herència digènica de *ROM-1* amb *RHO*. La rodopsina és una proteïna present en les membranes discals dels bastons, a l'igual que dues altres proteïnes en les que ja s'han descrit casos d'herència digènica: la mateixa *ROM-1* i la periferina/*RDS*.

Dels resultats obtinguts en aquest treball podem concloure tant que *RPE65* i la patologia cosegreguen en aquesta família sota la hipòtesi d'herència recessiva, com que es tracta d'herència

digènica de *RPE65* amb *ROM-1*. De totes maneres, la interacció entre la proteïna RPE65, situada a l'epiteli pigmentari de la retina i amb funció dins el cicle de la visió, i ROM-1, en els discs del fotoreceptors i amb funció bàsicament estructural, resulta una mica difícil d'explicar. Per altra banda, en un treball previ, s'havia detectat, en els pacients de la família V-8, la variant S133S de *NRL* en heterozigosi, i l'anàlisi de cosegregació no permetia excloure aquest gen sota la hipòtesi de digènia. *NRL* és un factor de transcripció. Però encara es fa més difícil admetre possible relació d'aquest amb *ROM-1*, que codifica per una proteïna organitzadora i estabilitzadora dels discs. S'hauria de demostrar que *NRL* controla l'expressió de *ROM-1* i que el canvi silenciós detectat inactivaria un dels seus al·lels. Amb les dades recollides fins avui, l'opció més factible continua essent que l'al·lel [P60T;T108M] detectat a *ROM-1*, és el responsable de les alteracions clíniques d'aquesta família sota la hipòtesi d'herència dominant amb penetrància incompleta o expressivitat variable (Martínez-Mir i col., 1997).

2.6. ELS GENS I LOCI *RPE65*, *MERTKI* *RP25* EN L'arRP ESPANYOLA

L'aproximació a l'estudi d'un determinat gen en una col·lecció de pacients via les anàlisis de cosegregació és un procediment clau en una malaltia tan heterogènia com la RP. S'han descrit molts gens que causen RP, però cadascun d'ells explica un nombre reduït de casos. La grandària d'alguns dels gens (*ABCA4*, 51 exons; *MERTK*, 19 exons; *RPE65*, 14 exons) implica una gran inversió d'esforços (l'anàlisi de tots els exons en cadascun dels pacients de cada família) sovint poc "recompensada". La utilització combinada en les anàlisis de cosegregació, tant de polimorfismes intragènics, com flanquejants a aquest, assegura una bona informativitat en la majoria dels casos. Al mateix temps, es duu a terme una cerca d'homozigotitat en les famílies consanguínies i, de fet, aquest serà l'únic criteri d'exclusió en aquelles famílies que només tenen un fill afectat. El problema rau en què no totes les famílies no excloses presenten mutacions en el gen en qüestió. D'altra banda, les exclusions pel criteri d'homozigotitat en les famílies arRP consanguínies podrien fer passar per alt algun cas on l'al·lel no sigui idèntic per descendència, tot i que aquests casos se suposen minoritaris en tractar-se d'una patologia tan heterogènia. En el nostre panell, un 2% de les famílies aproximadament presenta mutacions en un determinat gen, malgrat entre un 10 i un 20% no poden ser excloses per les anàlisis de cosegregació/homozigotitat. Aquestes anàlisis han permès excloure més d'un 80% de les famílies del panell arRP per cada gen analitzat. Aquests resultats són poc sorprenents si els comparem amb la resta de gens i loci descrits com a causants d'arRP. Tots els gens són "minoritaris" i expliquen molts pocs casos. Molts més gens han de ser descoberts per poder explicar la globalitat dels casos clínics. En aquest treball s'han analitzat 3 gens/loci: *RPE65*, *MERTK* i *RP25*. *RPE65* no ha pogut ser exclòs en un 17% dels casos, mentre estudis d'altres poblacions han predit que explicaria un 2% aproximadament de l'arRP i un 16% de l'amaurosi congènita de Leber (Marlhens i col., 1997). La cerca de mutacions en aquest gen no ha estat

possible. El locus *RP25* no ha pogut ser exclòs en un 18% dels casos, mentre el gen *MERTK* només pot explicar com a màxim un 5% de les famílies espanyoles afectades d'arRP, ja que el 95% restant s'ha exclòs pels criteris d'homozigositat i/o cosegregació. De totes maneres és obvi, que els resultats que es desprenen de les anàlisis del gen *MERTK* no són vàlids amb les distàncies genètiques actuals dels marcadors emprats. Gal i col. (2000) han detectat mutacions en *MERTK* en 3 pacients RP d'entre un panell de 328 individus afectats de vàries distròfies retinianes. Aquestes dades suggereixen que aquest gen explicaria alguns casos d'aquesta patologia.

2.7. RESUM GLOBAL DE L'ESTUDI DE CANDIDATS DINS LA LÍNIA D'INVESTIGACIÓ DE LES BASES GENÈTIQUES I MOLEULARS DE L'arRP ESPANYOLA

Taula 2. Anàlisi de cosegregació i homozigositat i cerca de mutacions en el conjunt de famílies arRP espanyoles analitzades. Pel gen *MERTK*, les dades no són vàlides actualment.

Gen/locus candidats analitzats	Famílies excloses per manca de lligament	Mutacions identificades (famílies)
<i>Rodopsina</i>	51%	0
<i>PDE6B</i>	81%	3 (3)
<i>Periferina/RDS</i>	67%	0
<i>Recoverina</i>	94%	0
<i>Antigen S</i>	62%	0
<i>PDEG</i>	53%	0
<i>6p (GCAP)</i>	80%	0
<i>ROM1</i>	-	0
<i>PDE6A</i>	77%	0
<i>RP12</i>	86%	-
<i>NRL</i>	93%	0
<i>ABCA4</i>	92%	1 (1)
<i>TULP1 (RP14)</i>	83%	2 (1)
<i>CNGA1</i>	76%	1 (1)
<i>RPE65</i>	83%	-
<i>RPGRIP1</i>	92%	0
<i>MERTK</i>	(95%)	-
<i>RP25</i>	82%	-

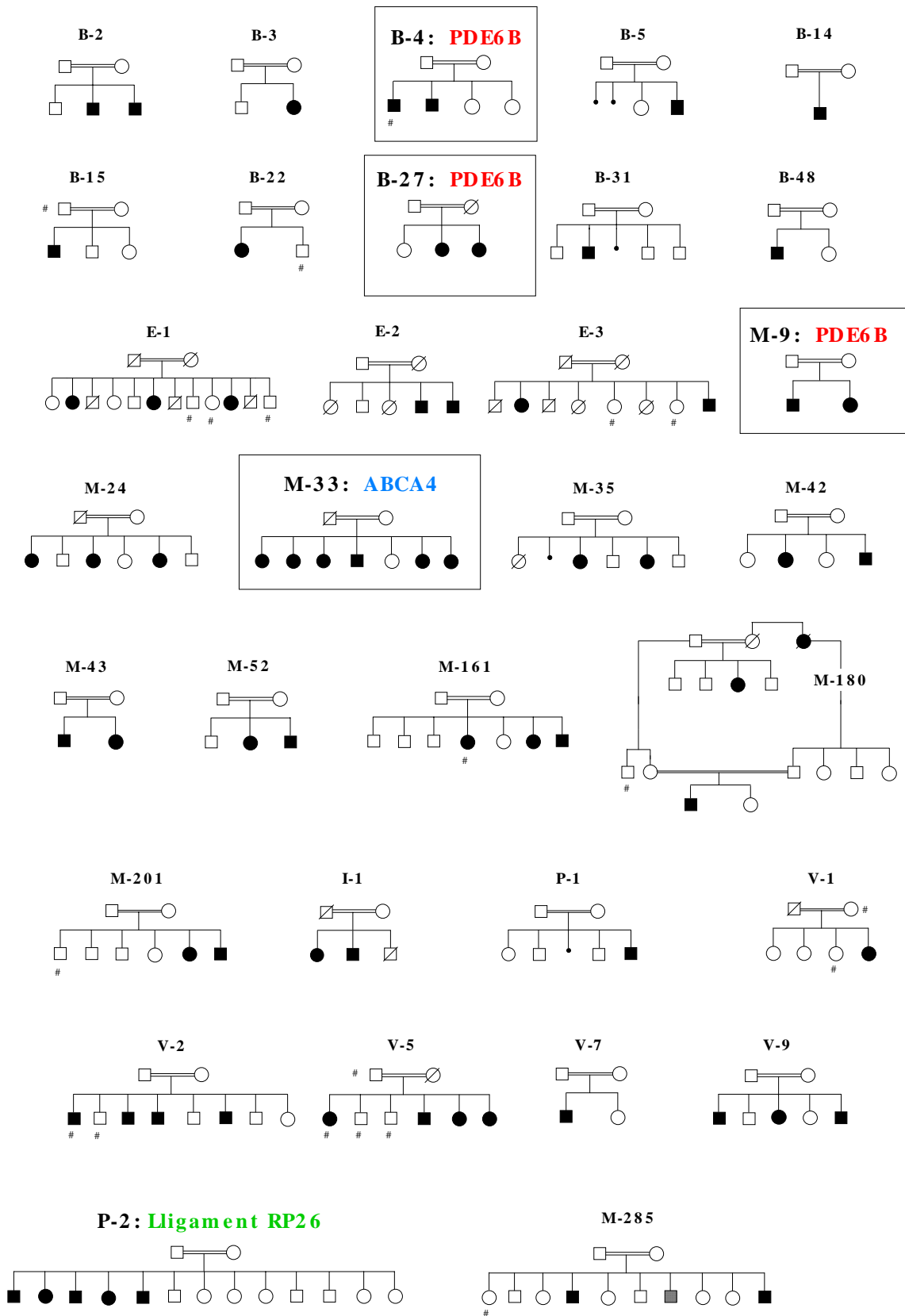
Taula 3. Variants patogèniques caracteritzades a partir de la cerca de mutacions, per SSCP o per seqüenciació, en el conjunt de gens analitzats.

Gen	Família	Exó	Canvi nucleotídic	Canvi proteic	Detecció	Freqüència cromosomes control
<i>PDE6B</i>	B4	1	260(71 bp dup)	canvi pauta de lectura	6% acrilamida	0/100
	M9	13	1676G->A	Arg552Gln	Patró SSCP	0/100
	B27	17	2117T->G	Leu669Arg	Patró SSCP	0/100
<i>ABCA4</i>	M33	13	1847delA	canvi pauta de lectura	- <i>Mbo</i> II	0/92
<i>TULP1</i>	M141	5	IVS4-2delAGA	eliminació lloc acceptor d' <i>splicing</i>	+ <i>Msp</i> I	0/200
	M141	10	c.937delC	canvi pauta de lectura	Seqüenciació	0/200
<i>CNGA1</i>	M68	3	c.82C->T	Arg28X	ASOH	0/100

S'han estudiat 52 famílies inicialment diagnosticades d'arRP de les quals 31 són consanguínies i la resta no ho són. De les 17 anàlisis de cosegregació realitzades s'han pogut excloure, de mitjana, un 79% de les famílies. Per a cada família arRP, s'han analitzat 14 gens, el què significa un total de 24.473 nucleòtids de regió codificant, distribuïts en 175 exons, i que traduïts a proteïna representen un total de 8.158 aminoàcids. Únicament en 4 dels 14 gens analitzats s'han detectat variants patogèniques. Per tant, un 29% dels gens analitzats ha resultat ser portador de mutacions. S'han trobat mutacions a 6 exons, per tant només un 3'4% dels exons són portadors de mutació i la probabilitat de trobar mutació en un nucleòtid determinat queda reduïda a un 0'02%. D'entre les 7 mutacions trobades, dues canvien aminoàcid, una genera una aturada prematura de la traducció, tres són insercions/delecions i la darrera afecta l'*splicing*. Del total de 52 famílies analitzades, només 6 s'han pogut explicar per mutacions en algun dels gens analitzats, per tant només un 11% de les famílies espanyoles analitzades han pogut ser explicades. A més, en dues

d'aquestes famílies s'ha dut a terme lligament genètic. Malgrat que encara s'està analitzant la regió, no s'ha pogut trobar el gen responsable del fenotip arRP de la família P-2 (2q31-q33), mentre que la família M-33, amb lligament genètic a 1p13-p21, ha pogut ser explicada per una mutació a *ABCA4*.

Famílies consanguínies



Famílies no-consanguínes

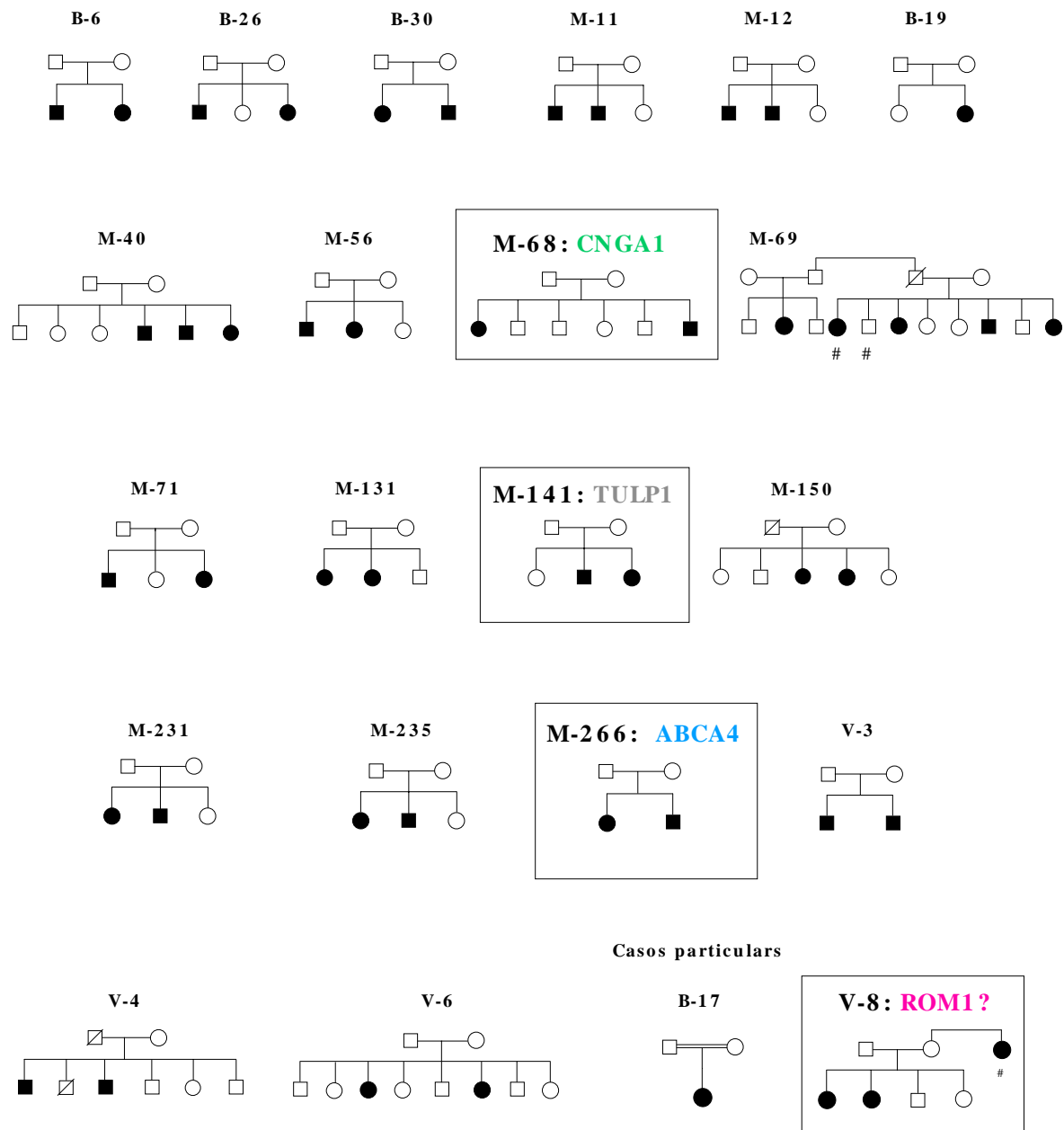


Figura 6. Conjunt de famílies analitzades en aquest treball. S'assenyalen amb un requadre les famílies que s'han pogut explicar per mutacions en gens candidats d'arRP en aquesta línia d'investigació.

2.8. Famílies arRP per explicar.

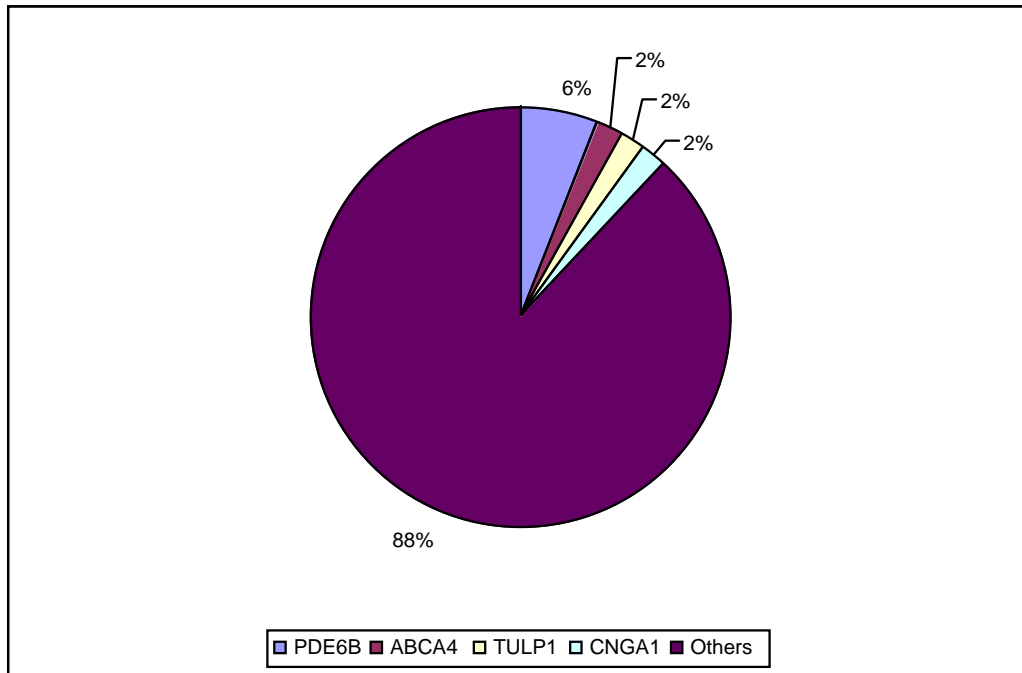


Figura 7. Percentatge de casos explicats per mutacions en els gens *PDE6B*, *ABCA4*, *TULP1* i *CNGA1* respecte les famílies que encara romanen sense diagnòstic genètic.

Quan s'observa la quantitat de casos que queden per explicar, a primer cop d'ull i tenint en compte la genètica de malalties monogèniques, semblaria que l'eficiència en la cerca de mutacions per a l'arRP és extremadament baixa. Si es considera l'elevada heterogeneïtat genètica d'aquesta patologia, aquests valors ja no són tan alarmants. Molts gens expliquen un % molt baix de famílies (entre 2 i 10% dels casos). Si tenim en compte la prevalença de la patologia (1:4.000), podem imaginar la quantitat de gens potencialment involucrats en aquesta distròfia retiniana. Els resultats obtinguts en aquest treball, reforcen la idea que aquestes petites aportacions faran que algun dia l'arRP pugui arribar a ser explicada en la seva totalitat i, per tant, que qualsevol dada, ja sigui positiva (el descobriment de nous gens responsables de part de l'arRP) o negativa (exclusió de determinats gens com a responsables de l'arRP en un nombre determinat de famílies) és important.

3. DISCUSSIÓ GENERAL.

3.1. LIMITACIONS CLÍNQUES

En l'estudi de patologies hereditàries de la retina, sovint ens trobem amb casos que han estat classificats com una mateixa entitat clínica, i que posteriorment la genètica ha permès diferenciar-los. Els solapaments de simptomatologia entre diferents patologies de la retina fan difícil marcar una línia de separació. Per aquesta raó, a mesura que s'han descrit nous gens

responsables de la RP, s'han anat reclassificant diferents distròfies retinianes. Per exemple, casos de FFM d'edats avançades poden confondre's o solapar-se amb casos de DMAE i s'han d'analitzar amb molta cura totes les característiques clíniques per poder fer un diagnòstic correcte. Ens trobem amb la mateixa situació quan parlem de distròfies de cons i bastons o de bastons i cons, o de RP, ja que en edats avançades són molt difícils de diferenciar clínicament, perquè tot i que tinguin inicis cel·lulars lleugerament diferents, la degeneració de la retina arriba a una disfunció que desencadena l'apoptosi dels fotoreceptors. En aquest sentit, seria important diagnosticar aquestes patologies quan es presenten els primers símptomes. Segons els clínics, la troballa de mutacions en gens nous fa avançar la reclassificació d'aquestes patologies altament difícils de diferenciar. Els genetistes argumenten que una bona informació clínica facilitaria el diagnòstic genètic. El diagnòstic dels pacients serà més eficaç quanta més interacció hi hagi entre ambdues disciplines.

3.2. HETEROGENEÏTAT AL·LÈLICA

Mutacions en *ABCA4* poden causar STGD, FFM, arRP, arCRD i possiblement incrementen la susceptibilitat a la DMAE. S'ha demostrat abastament l'heterogeneïtat al·lèlica d'aquest gen (Allikmets i col.,1997b; Rozet i col.,1998), fet que reforça la importància d'*ABCA4* a nivell de qualsevol patologia retiniana i d'aparició tant primerenca com tardana. La base molecular d'aquesta variabilitat fenotípica deguda a un sol locus no és del tot clara i, a més, hi ha pocs antecedents. De tota manera, ABCR és una proteïna que contribueix al cicle visual, i per tant a un punt de connexió de totes aquestes patologies. El model de correlacions genotip-fenotip sembla bastant acurat considerant els casos analitzats. Així, mutacions *null* en homozigosi produeixen un defecte molt sever en la visió que afecta inicialment als bastons (RP); mentre mutacions lleus afectarien principalment als cons, cas dels pacients STGD. Si tenim en compte que la proteïna ABCR només actua com a transportadora (flipasa) i s'expressa en ambdós tipus cel·lulars, per quina raó en unes cèl·lules deixa de funcionar més aviat que en altres? Per què mutacions *null* provoquen una malaltia que pot mostrar una aparició més tardana (RP) i mutacions no tan severes causen una malaltia que pot aparèixer a la infantesa (STGD)?

En ratolins *knock out* per a *RmP* (*Rim Protein: ABCA4* en humans) s'ha observat que després de l'excitació de la rodopsina per un fotó de llum, el seu grup prostètic és isomeritzat de 11-cis-retinal a tot-trans-retinal. En els segments externs dels fotoreceptors té lloc la formació de complexos de PE (fosfatidiletanolamines)-[tot-trans-retinal] que seran transportats per l'activitat flipasa d'*ABCR* a l'exterior dels discs i mitjançant altres transportadors al RPE on tindrà lloc la reducció de retinal a retinol i aquest podrà tornar a ser utilitzat per la rodopsina. Quan falla l'activitat flipasa els complexos PE-[tot-trans-retinal] s'acumulen als discs, i en ser fagocitats per el RPE, aquests isòmers d'A2E (major fluoròfor de la lipofuscina=complex PE+ tot-trans-retinal) s'acumulen en els lisosomes d'aquest teixit i alteren el reciclatge dels segments externs dels

fotoreceptors (Weng i col., 1999). Aquest és el model que s'ha proposat per explicar la malaltia de Stargardt. Les bases de la RP són més confuses ja que mutacions *null* per *ABCA4* haurien de suposar una ràpida acumulació d'aquests isòmers i, per tant, provocar una simptomatologia molt més primerenca.

3.3. PAPER DELS GENS MODIFICADORS EN LA VARIABILITAT FENOTÍPICA

Per explicar part d'aquesta variabilitat fenotípica sembla que a més de les combinacions d'al·lels d'un gen determinat, els gens modificadors jugarien un paper important a l'hora de definir un fenotip. Sembla que podrien ser els responsables de la variabilitat d'expressió o manifestació d'una determinada patologia. Alguns autors defensen que podrien explicar els fenotips que es manifesten en edats més avançades, en aquests casos ajudarien a preservar la funció durant més temps, i també els casos que, amb una mateixa mutació, cursen amb severitat diferent. La RP digènica també és un exemple de com diferents gens poden interactuar per donar lloc a un fenotip final.

3.4. PERSPECTIVES DE FUTUR

3.4.1. Noves perspectives de diagnòstic per a les patologies retinianes

S'ha estimat que existeixen entre 50.000 i 100.000 gens en el genoma humà (Murata i col., 1997). Actualment ens trobem a les últimes etapes del procés de caracterització del genoma, i al final d'aquest procés es pretén arribar a identificar els gens associats a malalties humanes, entre elles les malalties que afecten la visió. Avui dia s'han identificat més de 60 gens responsables de diferents distròfies humanes de la retina. Hi ha dues adreces d'internet on contínuament s'actualitzen aquestes dades (RetNet: <http://utsph.sph.uth.tmc.edu/www/utsph/RetNet/genes.htm> i OMIM: <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>).

El clonatge dels gens involucrats en les diverses retinopaties serà més dirigit en un futur proper. Això permetrà diagnosticar individus en estadis inicials i facilitarà el diagnòstic prenatal. Seguint aquest progrés, fins i tot podrem arribar a detectar casos asimptomàtics d'aquestes patologies. Per a aquests darrers, les teràpies profilàctiques suposaran una avantatge, controlar o retardar la severitat de la malaltia i, fins i tot, prevenir la seva manifestació. El coneixement dels diferents gens també permetrà un diagnòstic diferencial dels casos més atípics. Tot això comportarà que el consell genètic de malalties tant monogèniques com cada cop més les multifactorials, sigui una realitat. D'altra banda, l'aprofundiment en l'estudi de la funció permetrà establir correlacions genotip-fenotip. Una dificultat amb què ens trobem actualment és l'existència d'heterogeneïtat en els fenotips que resulten del defecte en un únic gen com és el cas de mutacions en la periferina

(Kumar-Sharma i Ehinger, 1999) o de mutacions en el gen *ABCA4* (aquest treball). Aquestes expectatives de futur en el diagnòstic també es materialitzaran en les distròfies en les que el gen *ABCA4* està involucrat. Malgrat aquests casos, la gran disparitat de mutacions descrites (més de 300), el desconeixement de mutacions prevalents i la diversitat ètnica requeriran que el diagnòstic es faci mitjançant xips de DNA. El xip representarà una eina eficaç i econòmica per a la detecció de mutacions en un gen tan gran i tan polimòrfic com és *ABCA4*. Però per a poder determinar la patologia associada a mutacions, es continuarà necessitant una clínica precisa. Realment *ABCA4* representa un repte per aquells investigadors que es proposen posar a punt tècniques per obtenir noves eines de diagnòstic i per optimitzar les bases del consell genètic en els pacients i les seves famílies.

3.4.2. Nous gens responsables de patologies retinianes

L'anàlisi de lligament, acompanyada de l'anàlisi de candidats posicionals o funcionals, ha estat una estratègia que ha permès la descripció de nous loci/gens responsables de patologies de la retina durant l'última dècada. Podríem suposar, doncs, que amb el coneixement de les dades del projecte humà, augmentarà l'eficiència en la cerca de candidats. No podem oblidar, però, que l'anàlisi de candidats posicionals ha facilitat la identificació de gens responsables de patologies sense disposar de pistes prèvies sobre la funció, fet que la cerca directa de gens candidats no hagués permès. Actualment, cada cop és més difícil trobar famílies grans prou informatives per a poder dur a terme les anàlisis de lligament i, a més, almenys en les malalties que hem estudiat, un resultat positiu pot portar a l'anàlisi d'un gen candidat que potser resoldrà un o uns pocs casos de patologia. S'han de desenvolupar altres estratègies per la cerca de gens responsables de les patologies retinianes, i tractar de predir candidats crucials que en moltes d'elles encara romanen desconeguts. Podríem parlar de tres grans grups de candidats susceptibles a generar distròfies de la retina.

Un grup inclouria els gens involucrats en els processos apoptòtics. L'apoptosi és la via comuna de degeneració dels fotoreceptors en els models animals *rd* i *rd_s*, tot i ser fenotips que s'inicien amb alteracions genètiques diferents (Chang i col., 1993). Mentre s'han descrit les caspases com a iniciadores d'apoptosi i responsables de la inestabilització de la cèl.lula, la *bcl-2* i proteïnes relacionades serien les principals inhibidores d'aquest procés, que promocionarien la supervivència dels fotoreceptors (Farkas i Grosskreutz, 2001). També s'ha observat que l'exposició a alts nivells de llum indueix l'apoptosi dels fotoreceptors mitjançant l'activació del factor de transcripció AP-1. El proto-oncogen *c-fos*, component del complex dimèric AP-1, sembla ser el responsable de la mort dels fotoreceptors derivada d'aquest excés lluminós. Així s'ha proposat que una estratègia terapèutica per tal de retardar la distròfia i degeneració de la retina seria aquella basada en la inhibició de *c-fos* (Hafezi i col., 1997). El rol de la proteïna *bcl-2* no és del tot clara. En models animals retrassa la mort apoptòtica dels fotoreceptors, però no evita totalment la

degeneració (Remé i col., 2000). Gens involucrats en el cicle cel.lular, en la degradació dels radicals d'oxidació i els que codifiquen per xaperones són, per la seva relació amb l'apoptosi, dianes terapèutiques. Aquest procés, però, tot i ser objecte d'estudi intens, té encara molts racons per explorar, i cal tenir en compte que no totes les neurones entren en apoptosi utilitzant els mateixos senyals, i que l'apoptosi comprèn diferents vies moleculars que culminen finalment en la mort cel.lular (Jomary i col., 2001).

Un altre grup de candidats serien els gens que codifiquen per proteïnes que participen en el metabolisme dels fotoreceptors de la retina. Un exemple són les proteïnes que intervenen en el metabolisme del calci, recentment involucrat en un gran nombre de processos dins i al voltant del fotoreceptor. Concentracions altes de glutamat, principal neurotransmissor excitador en el sistema nerviós central, poden donar lloc a l'entrada massiva de calci dins aquestes cèl.lules. Algunes de les diverses funcions d'aquesta catió són el control dels canals iònics de la superfície de les cèl.lules, la regulació d'enzims i, fins i tot, l'autoregulació dels seus propis nivells. Alts nivells de calci poden activar cascades de proteases, nucleases i lipases, que ataquen constituents cel.lulars i que acaben generant radicals lliures altament reactius. Poden alterar les mitocondries, que alhora generen més radicals lliures i activen enzims generadors d'òxid nítric. Aquests radicals poden acabar essent activadors dels primers estadis de l'apoptosi. Un altre exemple són les proteïnes que intervenen en el metabolisme del ferro. En la rata RCS s'ha descrit una mala regulació de l'homeostasi del ferro, que s'ha relacionat amb l'estat neurodegeneratiu de la retina. S'ha proposat que l'increment dels nivells de ferro dins el fotoreceptor podria fer-lo més vulnerable enfront l'estrés oxidatiu (Yefimova i col., 2002). Qualsevol gen que impliqui una alteració d'algun dels processos metabòlics vitals del fotoreceptor pot ser un candidat a provocar degeneració de la retina.

Altres candidats serien aquells que intervenen en el recanvi proteic dels components del fotoreceptor. Es coneix que la síntesi de proteïnes noves dins aquestes cèl.lules és un procés que està contínuament activat. El segment extern conté entre 900 i 1100 estructures discals. A cada disc s'empaqueten 80.000 molècules de rodopsina i cada disc és renovat amb una taxa altíssima. En la rata, és aproximadament de 100 discs per segment extern i per dia (Rodieck, 1998). La llargada del fotoreceptor, però, no augmenta, degut a l'elevada fagocitosis de discs vells que porten a terme les cèl.lules de l'epiteli pigmentari de la retina. Aquest mecanisme sembla ser una resposta evolutiva a la constant rebuda de fotons i a la generació d'espècies reactives d'oxigen que té lloc dins la cèl.lula més exposada a la llum i més activa metabòlicament del cos humà (Wright, 2000). Per tant, alteracions en els gens involucrats en el reciclatge dels seus components podrien fàcilment portar a situacions anòmales, potencialment patològiques.

Una aproximació a la caracterització de candidats ha estat la hibridació diferencial desenvolupada per Swanson i col. (1997). Es tractava de fer un crivellatge d'una llibreria de retina murina utilitzant com a sonda cDNA de retina d'esquirol per detectar gens específics de cons. La

raó per la que es va utilitzar retina d'esquirol és perquè aquest animal, a diferència dels humans, té una retina enriquida en cons (95%) respecte als bastons (5%). L'estratègia va donar bons resultats ja que va permetre la detecció de 67 clons, dels quals 9 eren ja gens coneguts dels cons. Aquesta estratègia ha permès una nova aproximació a la cerca de gens importants per la funció dels fotoreceptors. Altres tècniques com són la hibridació sustractiva o el *differential display* han permès la detecció de nous gens candidats (den Hollander i col., 1999). Dins aquesta línia, recentment, s'ha trobat el gen responsable del fenotips associats al locus *RP10* responsable d'alguns casos d'adRP. Mitjançant anàlisi de *microarrays* s'han buscat transcrits subexpressats o sobreexpressats en retines de ratolins *knock out* per RHO respecte la retina d'un ratolí normal. Aquells transcrits derivats de gens que presentaven nivells alterats i que mapaven en loci que donaven retinopaties han estat analitzats. Entre ells s'ha descobert el gen *IMPDH1* (*inosine monophosphate dehydrogenase type 1*) a 7q que presenta una mutació a la família en la que inicialment es va mapar el locus *RP10* (Kennan i col., 2002; Bowne i col., 2002).

En general s'està avançant molt en la descripció de mutacions en gens nous que generen patologies retinianes, però la relació entre aquestes mutacions i els dèficits funcionals dins la cèl.lula, així com els senyals que porten a una cèl.lula cap a la mort, són encara poc coneguts.

3.4.3. Futur en les estratègies terapèutiques

Per tal de restaurar la visió en un pacient afectat de degeneració retiniana, hi ha diferents estratègies assajades en models animals. La seva importància rau en que són: 1) models per estudiar els mecanismes moleculars que condueixen a la degeneració dels fotoreceptors; 2) la base d'estratègies moleculars per retardar o aturar l'apoptosi dels fotoreceptors; i 3) una aproximació a la teràpia gènica pel rescat dels fotoreceptors. Tot i que els animals més utilitzats són rata i ratolí, s'està començant a experimentar amb porcs que presenten una distribució de cons més semblant a l'humà, el temps de desenvolupament de patologies mimetitzada més el dels homes i la grandària dels seus ulls són ideals per injeccions a la subretina i per la teràpia gènica somàtica (Hafezi i col., 2000). L'aplicació als humans, però, es troba molt lluny encara de poder ser plantejada com a teràpia viable i encara s'ha de dur a terme molta recerca per dissenyar un futur on la visió no sigui un problema per a ningú.

En els casos en què l'apoptosi ja s'ha iniciat, es planteja el trasplantament de retina o la implantació de pròtesis o xips electrònics que permetin la transmissió de senyals elèctriques al cervell (apartat 6.1. de introducció). Però com més s'avanci en el coneixement dels gens i les seves funcions reguladores en l'apoptosi, la seva manipulació serà una estratègia per salvar les cèl.lules de la mort programada. Per exemple, l'aplicació de factors de creixement sols o acompanyats de fàrmacs anti-apoptòtics podria ser una estratègia de futur (Remé i col., 2000). Una altra

aproximació seria la teràpia gènica en aquelles mutacions responsables de les patologies i quina seria l'estratègia adient, teràpia gènica o inhibició d'apoptosi, al llarg del lent desenvolupament d'aquestes patologies (Remé i col., 2000).

4. PREGUNTES PER RESPONDRE.

Després de tot aquest estudi, s'han generat una sèrie de preguntes, algunes de les quals ja s'han anat plantejant en els diferents apartats. S'ha avançat molt en el coneixement de les distròfies retinianes, i precisament són les preguntes que es van generant sobre la marxa les que faciliten el progrés en aquesta disciplina. Algunes d'elles fan referència als següents aspectes:

- Com mutacions en un mateix gen poden causar patologies tan diferents a nivell fenotípic
- L'explicació de l'elevada heterogeneïtat al·lèlica present en *ABCA4*
- Les causes moleculars que determinen una major afectació de cons o de bastons
- La importància d'ABCR com a molècula estructural dels discs a més de ser un transportador
- El nombre de gens que hauran d'aparèixer per explicar la globalitat dels casos arRP
- Els mecanismes que desencadenen l'apoptosi de les cèl·lules fotoreceptores en totes aquestes patologies

1. L'anàlisi del gen *ABCA4* en la família M33 reforça la gran heterogeneïtat genètica de l'arRP. La deleció c.1847delA, detectada en homozigosi a l'exó 13, és la causa de la patologia dels membres afectats de la família M33. Aquesta deleció altera la pauta de lectura i genera una aturada prematura en la traducció, de manera que la proteïna que se sintetitza conté només 648 aminoàcids. Aquest gen explicaria aproximadament un 2% de l'arRP espanyola.
2. Mutacions en *ABCA4* poden causar diferents patologies hereditàries de la retina. La distròfia en patró de l'epiteli pigmentari de la retina, alteració retiniana lleu caracteritzada en la família L-H, també pot ser causada per mutacions en aquest gen. La combinació de dos al·lels de substitució d'aminoàcid i per tant considerats molt lleus és la causa de la patologia en el pacient I.1. Així s'ha pogut ampliar i completar el model de correlacions genotip-fenotip proposat per *ABCA4*.
3. L'existència de famílies recessives amb pacients STGD que no presenten mutacions en el gen *ABCA4* demostra la base genètica heterogènia d'aquesta patologia, malgrat que aquests casos són minoritaris.
4. La mutació L1940P a l'exó 41 d'*ABCA4* ha estat detectada en tres famílies espanyoles afectades d'arCRD-RP i STGD. La seva vinculació a un cas de CRD-RP la inclou dins el grup de mutacions severes d'aquest gen.
5. La mutació 2588G->C a l'exó 17 d'*ABCA4* té un origen únic al nord d'Europa i s'observa un gradient decreixent de portadors nord-est/sud-oest. En població espanyola, la freqüència de portadors és de 1/209, menys d'un 0'5%.
6. Els al·lels G1961E i D2177N d'*ABCA4* són factors de risc per la DMAE. Sobre una mostra de 1218 pacients s'ha demostrat que l'al·lel G1961E cofereix un risc relatiu de 5 vegades més i l'al·lel D2177N de 3 vegades més a patir la patologia.
7. *TULP1* explica un 2% del panell de famílies arRP estudiades en aquest treball. S'ha demostrat que els afectats d'arRP de la família M-141 són portadors de dues mutacions en heterozigosi en aquest gen, IVS4-2delAGA i c.937delC.
8. Una mutació en el gen *CNGA1* és la causa de l'arRP de la família M-68. La mutació trenca la pauta de lectura a l'exó 3 i genera un triplet prematur d'aturada de la traducció. Mutacions en aquest gen expliquen també un 2% de les famílies arRP espanyoles analitzades.

9. Les anàlisis de cosegregació i homozigositat han permès excloure *RPE65*, *MERTK* i *RP25* com a possibles gens/locus causants de la patologia en un 83%, 95% i 82% de les 47 famílies arRP espanyoles analitzades, respectivament.

10. S'ha portat a terme la cerca de mutacions en el gen *RPGRIP1* en 4 famílies arRP no excloses en l'anàlisi de cosegregació. No s'han detectat mutacions en aquest gen malgrat que, darrerament, la incorporació de 9 exons més a l'extrem a 5' de *RPGRIP1* deixa oberta la possibilitat d'identificar variants patogèniques en els individus afectats.

11. En resum, els resultats obtinguts en aquest treball demostren: 1) la gran heterogeneïtat genètica de la RP, on s'han descrit molts gens que expliquen un nombre molt reduït de casos; i 2) la gran heterogeneïtat al·lèlica d'*ABCA4*, on mutacions diferents poden explicar un nombre considerable de patologies retinianes.

A

Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, Pearce-Kelling SE, Anand V, Zeng Y, Maguire AM, Jacobson SG, Hauswirth WW, Bennett, JS (2001) Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 28:92-5

Adler R, Curcio C, Hicks D, Price D, Wong FS (1999) Cell death in age-related macular degeneration. *Mol Vis* 5:31.

Ahn J, Wong JT, Molday RS (2000) The effect of lipid environment and retinoids on the ATPase activity of ABCR, the photoreceptor ABC transporter responsible for Stargardt macular dystrophy. *J of Biol Chem* 275:20399-20405

Ali RR, Reichel MB, Thrasher AJ, Levinsky RL, Kinnon C, Kanuga N, Hunt DM, Bhattacharya S (1996) Gene transfer into the mouse retina mediated by an adeno-associated viral vector. *Hum Mol Genet* 5:591-594

Ali RR, Sarra GM, Stephens C, de Alwis M., Bainbridge J, Munro PM, Fauser S, Reichel MB, Kinnon C, Hunt DM, Bhattacharya SS, Thrasher AJ (2000) Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat Genet* 25:306-310

Allikmets R (2000a) Further evidence for an association of ABCR alleles with age-related macular degeneration. The International ABCR Screening Consortium. *Am J Hum Genet* 67:487-491

Allikmets R (2000b) Simple and complex ABCR: Genetic predisposition to retinal disease. *Am J Hum Genet* 67:793-799

Allikmets R, Gerrard B, Hutchinson A, Dean M (1996) Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet* 5:1649-1655

Allikmets R, Seddon JM, Bernstein PS, Hutchinson A, Atkinson A, Sharma S, Gerrard B, Li W, Metzker ML, Wadelius C, Caskey CT, Dean M, Petrukhin K (1999) Evaluation of the Best disease gene in patients with age-related macular degeneration and other maculopathies. *Hum Genet* 104:449-453

Allikmets R, Shroyer NE, Singh N, Seddon JM, Lewis RA, Bernstein PS, Peiffer A, Zabriskie NA, Li Y, Hutchinson A, Dean MRA, Lupski JR, Leppert M (1997b) Mutation of the Stargardt Disease Gene (ABCR) in Age-Related Macular Degeneration. *Science* 277:1805-1807

Allikmets R, Singh N, Sun H, Shroyer NE, Hutchinson A, Chidambaram A, Gerrard B, Baird L, Stauffer D, Peiffer A, Rattner A, Smallwood P, Li YX, Anderson KL, Lewis RA, Nathans J, Leppert M, Dean M, Lupski JR (1997a) A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (*ABCR*) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nature Genet* 15:236-246

Allikmets R, Wasserman WW, Hutchinson A, Smallwood P, Nathans J, Rogan PK, Schneider TD, Dean M (1998) Organization of the ABCR gene: analysis of promoter and splice junction sequences. *Gene* 215:11-122

Anderson KL, Baird L, Lewis RA, Chinault AC, Otterud B, Leppert M, Lupski JR (1995) A YAC contig encompassing the recessive Stargardt disease gene (STGD) on chromosome 1p. *Am J Hum Genet* 57:1351-1363

Apte SS, Mattei MG, Olsen BR (1994) Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and mapping of the TIMP3 gene to chromosome 22. *Genomics* 19:86-90.

Ardell MD, Bedsole DL, Schoborg RV, Pittler SJ (2000) Genomic organization of the human rod photoreceptor cGMP-gated cation channel beta-subunit gene. *Gene* 245:311-318

Ayuso C, Garcia-Sandoval B, Najera C, Valverde D, Carballo M, Antinolo G (1995) Retinitis pigmentosa in Spain. *Clin Genet* 48:120-122

Azarian SM, Megarity CF, Weng J, Horvath DH, Travis GH, Espinós C, Millán JM, Sánchez F, Beneyto M, Najera C (1998) The human photoreceptor rim protein gene (ABCR): genomic structure and primer set information for mutation analysis. *Hum Genet* 102:699-705

Azarian SM, Travis GRA (1997) The photoreceptor rim protein is an abc transporter encoded by the gene for recessive stargardts disease (abcr). *Febs Letters*. 409:247-252

B

Baehr W, Chen CK (2001) RP11 and RP13: unexpected gene loci. *Trends Mol Med* 7:484-486.

Banerjee P, Kleyn PW, Knowles JA, Lewis CA, Ross BM, Parano E, Kovats SG, Lee JJ, Penchaszadeh GK, Ott J, Jacobson SG, Gilliam TC (1998) TULP1 mutation in two extended Dominican kindreds with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 18:177-179

Bareil C, Hamel CP, Delague V, Arnaud B, Demaille J, Claustres M (2001) Segregation of a mutation in CNGB1 encoding the beta-subunit of the rod cGMP-gated channel in a family with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Genet* 108:328-334

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

Bayés M, Giordano M, Balcells S, Grinberg D, Vilageliu L, Martínez I, Ayuso C, Benítez J, Ramos-Arroyo MA, Chivelet P, Solans T, Valverde D, Amselem S, Goossens M, Baiget M, González-Duarte R, Bemdond C (1995) Homozygous Tandem Duplication Within the Gene Encoding the b-Subunit of Rod Phosphodiesterase as a Cause for Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa. *Hum Mutat* 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 L, Balcells S, González-Duarte R, Grinberg D (1998) A new autosomal recessive retinitis pigmentosa locus maps on chromosome 2q31-q33. *J Med Genet* 35:141-5

Bayés M, Martínez-Mir A, Valverde D, Del Rio E, Vilageliu L, Grinberg D, Balcells S, Ayuso C, Baiget M, González-Duarte R (1996) Autosomal recessive retinitis pigmentosa in Spain: evaluation of four genes and two loci involved in the disease. *Clin Genet*. 50:380-387

Bernstein EF (2002) Reactive oxygen species activate the human elastin promoter in a transgenic model of cutaneous photoaging. *Dermatol Surg* 28:132-135

Bernstein PS, Tammur J, Singh N, Hutchinson A, Dixon M, Pappas CM, Zabriskie NA, Zhang K, Petrukhin K, Leppert M, Allikmets R (2001) Diverse macular dystrophy phenotype caused by a novel complex mutation in the ELOVL4 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:3331-3336

- Bessant DA, Ali RR, Bhattacharya S** (2001) Molecular genetics and prospects for therapy of the inherited retinal dystrophies. *Curr Opin Genet Dev* 11:307-316
- Bird AC** (1995) Retinal photoreceptor dystrophies LI Edward Jackson memorial lecture. *Am J Ophthalmol* 119:543-562
- Birnbach CD, Jarvelainen M, Possin DE, Milam AH** (1994) Histopathology and immunocytochemistry of the neurosensory retina in fundus flavimaculatus. *Ophthalmology* 101:1211-1219
- Biswas EE** (2001) Nucleotide binding domain 1 of the human retinal abc transporter functions as a general ribonucleotidase. *Biochemistry* 40:8181-8187
- Biswas EE, Biswas SB** (2000) The C-terminal nucleotide binding domain of the human retinal ABCR protein is an adenosine triphosphatase. *Biochemistry* 39:15879-15886
- Bither PP, Berns LA** (1988) Dominant inheritance of Stargardt's disease. *J Am Optom Assoc* 59:112-117
- Boggon TJ, Shan WS, Santagata S, Myers SC, Shapiro L** (1999) Implication of tubby proteins as transcription factors by structure-based functional analysis. *Science* 286:2119-2125
- Bok D, Hall MO** (1971) The role of the pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol* 49:664-682
- Bonigk W, Altenhofen W, Muller F, Dose A, Illing M, Molday RS, Kaupp UB** (1996) Rod and Cone Photoreceptor Cells Express Distinct Genes for cGMP-Gated Channels. *Neuron* 10:865-877
- Bormann J, Feigenspan A** (1995) GABAC receptors. *Trends Neurosci* 18:515-519
- Bowes C, Li T, Dancinger M, Baxter LC, Applebury ML, Farber DB** (1990) Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the b subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* 347:677-680
- Bowes C, Li TS, Frankel WN, Danciger M, Coffin JM, Applebury ML, Farber DB** (1993) Localization of a Retroviral Element Within the rd Gene Coding for the beta-Subunit of cGMP Phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2955-2959
- Bowne SJ, Sullivan LS, Blanton SH, Constance LC, Blackshaw S, Birch DG, Hughbanks-Wheaton D, Heckenlively JR, Daiger SP** (2002) Mutations in the inosine monophosphate dehydrogenase 1 (IMPDH1) cause the RP10 form of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 11:559-568
- Boylan JP, Wright AF** (2000) Identification of a novel protein interacting with RPGR. *Hum Mol Genet* 9:2085-2093
- Bressler NM, Bressler SB, Fine SL** (1988) Age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 32:375-413
- Briggs CE, Rucinski D, Rosenfeld PJ, Hirose T, Berson EL, Dryja TP** (2001) Mutations in ABCR (ABCA4) in patients with Stargardt macular degeneration or cone-rod degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2229-2236
- Burns ME, Baylor DA** (2001) Activation, deactivation, and adaptation in vertebrate photoreceptor cells. *Annu Rev Neurosci* 24:779-805

C

Chang GQ, Hao Y, Wong F (1993) Apoptosis - Final Common Pathway of Photoreceptor Death in rd, rds, and Rhodopsin Mutant Mice. *Neuron* 11:595-605

Chapple JP, Grayson C, Hardcastle AJ, Saliba R.S, van der Spuy J, Cheetham ME (2001) Unfolding retinal dystrophies: a role for molecular chaperones? *Trends Mol Med* 7:414-421

Chen TY, Illing M, Molday LL, Hsu YT, Yau KW, Molday RS (1994) Subunit 2 (or b) of retinal rod cGMP-gated cation channel is a component of the 240-kDa channel-associated protein and mediates Ca²⁺-calmodulin modulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11757-11761

Chen TY, Peng YW, Dhallan RS, Ahamed B, Reed RR, Yau KW (1993) A new subunit of the Cyclic nucleotide-gated cation channel in retinal rods. *Nature* 362:764-767

Cibis GW, Morey M, Harris DJ (1980) Dominantly inherited macular dystrophy with flecks (Stargardt). *Arch Ophthalmol* 98:1785-1789

Coscas G (1987) Montgomery lecture. Subretinal neovascularisation in senile macular degeneration. *Eye* 3:364-78.

Cremers FP, van de Pol DJ, van Driel M, den Hollander AI, van Haren FJ, Knoers NV, Tijmes N, Bergen AA, Rohrschneider K, Blankenagel A, Pinckers AJ, Deutman AF, Hoyng CB (1998) Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. *Hum Mol Genet* 7:355-362

Cremonesi L, Carrera P, Fumagalli A, Lucchiari S, Cardillo E, Ferrari M, Righetti SC, Zunino F, Righetti PG, Gelfi C (1999) Validation of double gradient denaturing gradient gel electrophoresis through multigenic retrospective analysis. *Clin Chem* 45:35-40

Cremonesi L, Firpo S, Ferrari M, Righetti PG, Gelfi C (1997) Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations. *Biotechniques* 22:326-330

Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, Jorissen M, Droogmans G, Reynaert I, Goossens M, Nilius B, Cassiman JJ (1998) Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (Tg)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest* 101:487-496

Curcio CA, Medeiros NE, Millican CL (1996) Photoreceptor loss in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 37:1236-1249

Curcio CA, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson AE (1990) Human photoreceptor topography. *J Comp Neurol* 292:497-523

D

D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, Vollrath D (2000) Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Genet* 9:645-651

Danciger M, Hendrickson J, Lyon J, Toomes C, McHale JC, Fishman GA, Inglehearn CF, Jacobson SG, Farber DB (2001) CORD9 a new locus for arCRD: mapping to 8p11, estimation of frequency, evaluation of a candidate gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2458-2465

- De La Paz MA, Guy VK, Abou DS, Heinis R, Bracken B, Vance JM, Gilbert JR, Gass JDM, Haines JL, Pericak-Vance MA** (1999) Analysis of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 106:1531-1536
- Dean M** (1998) Britain to debate how to plan for an ageing population. *Lancet* 351:811.
- Dean M, Allikmets R** (1995) Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev* 5:779-785
- Dejneka NS, Bennett J** (2001) Gene therapy and retinitis pigmentosa advances and future challenges. *BioEssays* 23:662-668
- Delcourt C, Diaz JL, Ponton-Sanchez A, Papoz L** (1998) Smoking and age-related macular degeneration. The POLA Study. *Pathologies Oculaires Liees a l'Age. Arch Ophthalmol* 116:1031-1035.
- Della NG** (1996) Molecular biology in ophthalmology: A review of principles and recent advances. *Arch Ophthalmol* 114:457-463
- Delori FC, Staurenghi G, Arend O, Dorey CK, Goger DG, Weiter JJ** (1995) In vivo measurement of lipofuscin in Stargardt's disease--Fundus flavimaculatus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:2327-2331
- den Hollander A, van Driel M, de Kock Y, van de Pol D, Hoyng CB, Brunner HG, Deutman AF, Cremers F P** (1999) Isolation and mapping of novel candidate genes for retinal disorders using suppression subtractive hybridization. *Genomics* 58:240-249
- Detwiler PB, Ramanathan S, Sengupta A, Shraiman BI** (2000) Engineering aspects of enzymatic signal transduction: photoreceptors in the retina. *J of Biophys* 79:2801-2817
- Dhallan RS, Macke JP, Eddy RL, Shows TB, Reed RR, Yau KW, Nathans J** (1992) Human Rod Photoreceptor cGMP-gated Channel: Amino Acid Sequence, Gene Structure, and Functional Expression. *J of Neurosci* 12:3248-3256
- Donoso LA, Frost AT, Stone EM, Weleber RG, MacDonald IM, Hageman GS, Cibis GW, Ritter R, Edwards AO** (2001) Autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy - Founder effect and reassessment of genetic heterogeneity. *Arch of Ophthalmol* 119:564-570
- Dowling JE, Sidman RL** (1962) Inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol* 14:73-109
- Dryja TP** (1997) Gene-based approach to human gene-phenotype correlations. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12117-12121
- Dryja TP, Adams SM, Grimsby JL, McGee TL, Hong DH, Li T, Andreasson S, Berson EL** (2001) Null RPGRIP1 alleles in patients with Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 68:1295-1298
- Dryja TP, Berson EL** (1995c) Retinitis pigmentosa and allied diseases. Implications of genetic heterogeneity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:1197-1200
- Dryja TP, Berson EL, Rao VR** (1993) Heterozygous missense mutation in the rhodopsin gene as a cause of congenital stationary night blindness. *Nature Genet* 4:280-283
- Dryja TP, Finn JT, Peng YW, McGee TL, Berson EL, Yau KW** (1995b) Mutations in the gene encoding the alpha subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10177-10181

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

Dryja TP, McGee TL, Hahn LB, Cowley GS, Olsson JE, Reichel E, Sandberg MA, Berson EL (1990) Missense mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 47:54

E

Eckert R, Randall D, Augustine G (1990) Mecanismos sensoriales in: *Fisiología animal: mecanismos y adaptaciones* (McGraw-Hill, ed.), New York: 201-216

Eckmiller MS (1997) Morphogenesis and renewal of cone outer segments. *Progress In Retinal And Eye Research* 16:401-441

Edwards AO, Miedziak A, Vrabec T, Verhoeven J, Acott TS, Weleber RG, Donoso LA (1999) Autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy: I. Clinical characterization, longitudinal follow-up, and evidence for a common ancestry in families linked to chromosome 6q14. *Am J Ophthalmol* 127:426-435

Eldred GE, Lasky MR (1993) Retinal age pigments generated by self-assembling lysosomotropic detergents. *Nature* 361:724-726

Evans K, Bird AC (1996) The genetics of complex ophthalmic disorders. *Br J Ophthalmol* 80:763-768

Evans K, Fryer A, Inglehearn C, Duvall-Young J, Whittaker JL, Gregory CY, Butler R, Ebenezer N, Hunt DM, Bhattacharya S (1994) Genetic linkage of cone-rod retinal dystrophy to chromosome 19q and evidence for segregation distortion. *Nature Genet* 6:210-213

F

Fain GL, Matthews HR, Cornwall MC, Koutalos Y (2001) Adaptation in vertebrate photoreceptors. *Physiol Rev* 81:117-151

Farkas R H, Grosskreutz CL (2001) Apoptosis, neuroprotection, and retinal ganglion cell death: an overview. *Int Ophthalmol Clin* 41:111-130

Farrar GJ, Kenna P, Jordan SA, Kumarsingh R, Humphries MM, Sharp EM, Sheils DM, Humphries P (1991) A 3-Base-Pair Deletion in the Peripherin-RDS Gene in One Form of Retinitis-Pigmentosa. *Nature* 354:478-480

Fish G, Grey R, Sehmi KS, Bird AC (1981) The dark choroid in posterior retinal dystrophies. *Br J Ophthalmol* 65:359-363

Fishman GA (1976) Fundus flavimaculatus: A clinical classification. *Arch Ophthalmol* 94:2061-2067

Fishman GA, Stone EM, Grover S, Derlacki DJ, Haines HL, Hockey RR (1999) Variation of clinical expression in patients with Stargardt dystrophy and sequence variations in the ABCR gene. *Arch of Ophthalmol* 117:504-510

Flannery JG, Zolotukhin S, Vaquero MI, LaVail, MM, Muzyczka N, Hauswirth WW (1997) Efficient photoreceptor-targeted gene expression in vivo by recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6916-6921

Francescetti A (1962) Über tapeto-retinale Degenerationen im Kindesalter. Dritter Fortbildungskurs der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft. In: Sautteer H. editor. Entwicklung and Fortschritt in der Augenbielkunde. Stuttgart:Enke:1963:107-120

Frasson M, Sahel JA, Fabre M, Simonutti M, Dreyfus H, Picaud S (1999) Retinitis pigmentosa: rod photoreceptor rescue by a calcium-channel blocker in the rd mouse. *Nat Med* 5:1183-1187

Friedman PM, Friedman RH, Jiang SB, Nouri K, Amonette R, Robins P (1999) Microcystic adnexal carcinoma: collaborative series review and update. *J Am Acad Dermatol* 41:225-231

Fumagalli A, Ferrari M, Soriani N, Gessi A, Foglieni B, Martina E, Manitt, MP, Brancato R, Dean M, Allikmets R, Cremonesi L (2001) Mutational scanning of the ABCR gene with double-gradient denaturing-gradient gel electrophoresis (DG-DGGE) in Italian Stargardt disease patients. *Hum Genet* 109:326-328

G

Gal A, Apfelstedtsylla E, Janecke AR, Zrenner E (1997) Rhodopsin mutations in inherited retinal dystrophies and dysfunctions. *Progress In Retinal And Eye Research* 16:51-79

Gal A, Li Y, Thompson DA, Weir J, Orth U, Jacobson SG, Apfelstedt-Sylla E, Vollrath D (2000) Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 26:270-271

Gass JDM (1973) Drusen disciform macular detachment and degeneration. *Arch Ophthalmol* 90:208-217

Gerber S, Perrault I, Hanein S, Barbet F, Ducroq D, Ghazi I, Martin-Coignard D, Leowski C, Homfray T, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J, Rozet JM (2001) Complete exon-intron structure of the RPGR-interacting protein (RPGRIP1) gene allows the identification of mutations underlying Leber congenital amaurosis. *Eur J Hum Genet* 9:561-571

Gerber, S, Rozet JM, Bonneau D, Souied E, Camuzat A, Dufier JL, Amalric P, Weissenbach J, Munnich A, Kaplan J (1995) A gene for late-onset fundus flavimaculatus with macular dystrophy maps to chromosome 1p13. *Am J Hum Genet* 56:396-399

Gerber S, Rozet JM, van de Pol T, Hoyng CB, Munnich A, Blankenagel A, Kaplan J, Cremers FP (1998) Complete exon-intron structure of the retina-specific ATP binding transporter gene (ABCR) allows the identification of novel mutations underlying Stargardt disease. *Genomics* 48:139-142

Goldberg A, Molday RS (2000) Expression and characterization of peripherin/rds-rom-1 complexes and mutants implicated in retinal degenerative diseases. *Vertebrate Phototransduction And The Visual Cycle Pt B* 316:671-687

Gorin MB, Breitner JC, De Jong PT, Hageman GS, Klaver CC, Kuehn MH, Seddon, JM (1999) The genetics of age-related macular degeneration. *Mol Vis* 5:29

Gorin MB, Jackson KE, Ferrell RE., Sheffield VC, Jacobson SG, Gass JDM, Mitchell E, Stone EM (1995) A peripherin/retinal degeneration slow mutation (Pro-210-Arg) associated with macular and peripheral retinal degeneration. *Ophthalmology* 102:246-255

Green WR (1999) Histopathology of age-related macular degeneration. *Mol Vis* 5:27

Gregory CY, Bird AC (1995) Cell loss in retinal dystrophies by apoptosis--death by informed consent. *Br J Ophthalmol* 79:186-190

Gregory-Evans K, Bhattacharya S (1998) Genetic blindness: current concepts in the pathogenesis of human outer retinal dystrophies *TIG* 14:103-108

Griesinger IB, Sieving PA, Ayyagari R (2000) Autosomal dominant macular at 6q14 excludes *CORD7* and *MCDR1/PBCRA* loci. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:248-255

Griffin CA, Ding C L, Jabs EW, Hawkins AL, Li X, Levine MA (1993) Human Rod cGMP-Gated Cation Channel Gene Maps to 4p12->centromere by Chromosomal Insitu Hybridization. *Genomics* 16:302-303

Gu S, Lennon A, Li Y, Lorenz B, Fossarello M, North M, Gal A, Wright A (1998) Tubby-like protein-1 mutations in autosomal recessive retinitis pigmentosa [letter]. *Lancet* 351:1103-1104

Gu S, Thompson D, Srikumari CRS, Lorenz B, Finckh U, Nicoletti A, Murthy KR, Rathmann M, Kumaramanickavel G, Denton MD, Gal A (1997) Mutations in *RPE65* cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* 17:194-197

Guymer RH, Heon E, Lotery AJ, Munier FL, Schorderet DF, Baird PN, McNeil RJ, Haines H, Sheffield VC, Stone EM (2001) Variation of codons 1961 and 2177 of the Stargardt disease gene is not associated with age-related macular degeneration. *Arch of Ophthalmol* 119:745-751

Guyton AC (1988) Los sentidos especiales. En: *Tratado de fisiología médica* (McGraw-Hill, ed.), New York:556-583

H

Hafezi F, Steinbach JP, Marti A, Munz K, Wang ZQ, Wagner EF, Aguzzi A, Reme CE (1997) The absence of *c-fos* prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptor in retinal degeneration in vivo. *Nat Med* 3:346-349

Hafezi F, Grimm C, Simmen BC, Wenzel A, Reme CE (2000) Molecular ophthalmology: an update on animal models for retinal degenerations and dystrophies. *Br J Ophthalmol* 84:922-927

Hagstrom SA, Adamian M, Scimeca M, Pawlyk BS, Yue G, Li T (2001) A role for the Tubby-like protein 1 in rhodopsin transport. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1955-1962

Hagstrom SA, Duyao M, North MA, Li TS (1999) Retinal degeneration in *tulp1(-/-)* mice: Vesicular accumulation in the interphotoreceptor matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2795-2802

Hagstrom SA, North MA, Nishina PL, Berson EL, Dryja TP (1998) Recessive mutations in the gene encoding the tubby-like protein *TULP1* in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 18:174-176

Hamel CP, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Redmond TM (1994) The Gene for the Retinal Pigment Epithelium-Specific Protein *Rpe65* Is Localized to Human 1P31 and Mouse 3. *Genomics* 20:509-512

Hardie RC, Raghu P (2001) Visual transduction in *Drosophila*. *Nature* 413:186-193

Hargrave PA, Mcdowell, JH (1992) Rhodopsin and Phototransduction - A Model System for G-Protein-Linked Receptors. *FASEB J* 6:2323-2331

Heher KL, Johns DR (1993) A maculopathy associated with the 15257 mitochondrial DNA mutation. *Arch Ophthalmol* 111:1495-1499

Heiba IM, Elston RC, Klein BE, Klein R (1994) Sibling correlations and segregation analysis of age-related maculopathy: The Beaver Dam Eye Study. *Genet Epidemiol* 11:51-67

Hong DH, Yue G, Adamian M, Li T (2001) Retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-interacting protein is stably associated with the photoreceptor ciliary axoneme and anchors RPGR to the connecting cilium. *J Biol Chem* 276:12091-12099

Hoyng CB., Poppelaars F, Van de Pol T, Kremer H, Pinckers A, Deutman AF, Cremers F (1996) Genetic fine mapping of the gene for recessive Stargardt disease. *Hum Genet* 98:500-504

Humphries MM, Rancourt D, Farrar GJ, Kenna P, Hazel M, Bush RA, Sieving PA, Sheils DM, McNally N, Creighton P, Erven A, Boros A, Gulya K, Capecchi MR, Humphries P (1997) Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene. *Nat Genet* 15:216-219

Humphries P, Farrar JG, Keena P, McWilliam P (1990) Retinitis pigmentosa: genetic mapping in X-linked and autosomal forms of the disease. *Clin Genet* 38:1-13

Hyman L (1987) Epidemiology of eye disease in the elderly. *Eye* 1:330-341

I

Ikeda S, He W, Ikeda A, Naggert JK, North MA, Nishina PM (1999) Cell-specific expression of tubby gene family members (tub, Tulp1,2, and 3) in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2706-2712

Illing M, Molday LL, Molday RRA (1997) The 220 kda rim protein of retinal rod outer segments is a member of the abc transporter superfamily. *J of Biol Chem.* 272:10303-10310

J

Jomary C, Neal MJ, Jones SE (2001) Characterization of cell death pathways in murine retinal neurodegeneration implicates cytochrome c release, caspase activation, and bid cleavage. *Mol Cell Neurosci* 18:335-346

K

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

Kajiwara K, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP (1993) A null mutation in the human peripherin/RDS gene in a family with autosomal dominant retinitis punctata albescens. *Nature Genet* 3: 208-212

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

Kaplan J, Gerber S, Larget-Piet D, Rozet JM, Dollfus H, Dufier JL, Odent S, Postel-Vinay A, Janin N, Briard ML, Frezal J, Munnich A (1993) A gene for Stargardt's disease (fundus flavimaculatus) maps to short arm of chromosome 1. *Nature Genet* 5:308-311

- Kelsell RE, Evens K, Gregory CY, Moore AT, Bird AC, Hunt DRA** (1997) Localization of a gene for dominant cone rod dystrophy (cord6) to chromosome 17p. *Hum Mol Genet* 6:597-600
- Kennan A, Aherne A, Palfi A, Humphries M, McKee A, Stitt A, Simpson DAC, Demtroder K, Orntoft T, Ayuso C, Kenna PF, Farrar GJ, Humphries P** (2002) Identification of an IMPDH1 mutation in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP10) revealed following comparative microarray analysis of transcripts derived from retinas of wild-type and Rho^{-/-} mice. *Hum Mol Genet* 11:547-558
- Kent WJ, Haussler D** (2001) Assembly of the working draft of the human genome with GigAssembler. *Genome Res* 11: 1541–1548
- Khaliq S, Hameed A, Ismail M, Anwar K, Leroy BP, Mehdi SQ, Payne AM, Bhattacharya SS** (2000) Novel locus for autosomal recessive cone-rod dystrophy *CORD8* mapping to chromosome 1q12-Q24. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3709-3712
- Khaliq S, Hameed A, Ismail M, Mehdi SQ, Bessant D, Payne AM, Bhattacharya SS** (1999) Refinement of the locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP25) linked to chromosome 6q in a family of Pakistani origin. *Am J Hum Genet* 65:571-574
- Kikuchi T, Arai J, Shibuki H, Kawashima H, Yoshimura N** (2000) Tubby-like protein 1 as an autoantigen in cancer-associated retinopathy. *J of Neuroimmunol* 103:26-33
- Kim RY, Dollfus H, Keen TJ, Fitzke FW, Arden GB, Bhattacharya SS, Bird AC** (1995) Autosomal dominant pattern dystrophy of the retina associated with a 4-base pair insertion codon 140 in the peripherin/RDS gene. *Arch Ophthalmol* 113:451-455
- Klaver CC, Kliffen M, van Duijn C, Hofman A, Cruts M, Grobbee DE, van Broeckhoven C, de Jong P** (1998) Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 63:200-206
- Klein BE, Klein R, Lee KE** (1997) Cardiovascular disease, selected cardiovascular disease risk factors, and age-related cataracts: the Beaver Dam Eye Study. *Am J Ophthalmol* 123:338-346
- Klein ML, Schultz DW, Edwards A, Matise TC, Rust K, Berselli CB, Trzuppek K, Weleber RG, Ott J, Wirtz MK, Acott TS** (1998) Age-related macular degeneration. Clinical features in a large family and linkage to chromosome 1q. *Arch Ophthalmol* 116:1082-1088
- Klevering BJ, van Driel M, van de Pol DJ, Pinckers AJ, Cremers FP, Hoyng CB** (1999) Phenotypic variations in a family with retinal dystrophy as result of different mutations in the *ABCR* gene. *Br J Ophthalmol* 83:914-918
- Klystra JA, Aylsworth AS** (1993) Cone-rod retinal dystrophy in a patient with neurofibromatosis type 1. *Can J Ophthalmol* 28:79-80
- Kniazeva M, Chiang MF, Morgan B, Anduze AL, Zack DJ, Han M, Zhang K** (1999) A new locus for autosomal dominant stargardt-like disease maps to chromosome 4. *Am J Hum Genet* 64:1394-1399
- Kniazeva M, Traboulsi EI, Yu Z, Stefko ST, Gorin MB, Shugart YY, O'Connell JR, Blaschak CJ, Cutting G, Han M, Zhang K** (2000) A new locus for dominant drusen and macular degeneration maps to chromosome 6q14. *Am J Ophthalmol* 130:197-202
- Knowles JA, Shugart Y, Banerjee P, Gilliam TC, Lewis CA, Jacobson SG, Ott J** (1994) Identification of a locus, distinct from RDS-peripherin, for autosomal recessive retinitis pigmentosa on chromosome 6p. *Hum Mol Genet* 3:1401-1403

Kobayashi A, Higashide T, Hamasaki D, Kubota S, Sakuma H, An W, Fujimaki T, McLaren MJ, Weleber RG, Inana G (2000) HRG4 (UNC119) mutation found in cone-rod dystrophy causes retinal degeneration in a transgenic model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3268-3277

Kohl S, Baumann B, Broghammer M, Jagle H, Sieving P, Kellner U, Spegal R, Anastasi M, Zrenner E, Sharpe LT, Wissinger B (2000) Mutations in the CNGB3 gene encoding the beta-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated channel are responsible for achromatopsia (ACHM3) linked to chromosome 8q21. *Hum Mol Genet* 9:2107-2116

Kohl S, Marx T, Giddings I, Jagle H, Jacobson SG, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Sharpe LT, Wissinger B (1998) Total colourblindness is caused by mutations in the gene encoding the alpha-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated cation channel. *Nat Genet* 19:257-259

Koutalos Y, Yau KW (1996) Regulation of sensitivity in vertebrate rod photoreceptors by calcium. *Trends Neurosci* 19:73-81

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

Kumar-Sharma R, Ehinger B (1999) Management of hereditary retinal degenerations: Present status and future directions. *Survey of Ophthalmology* 43:427-444

Kumar-Singh R, Farber DB (1998) Encapsidated adenovirus mini-chromosome-mediated delivery of genes to the retina: application to the rescue of photoreceptor degeneration. *Hum Mol Genet* 7:1893-1900

Kuroiwa S, Kojima H, Kikuchi T, Yoshimura N (1999) ATP binding cassette transporter retina genotypes and age related macular degeneration: an analysis on exudative non-familial Japanese patients. *Br J Ophthalmol* 83:613-615

L

Lagali PS, MacDonald IM, Griesinger IB, Chambers ML, Ayyagari R, Wong PW (2000) Autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy segregating in a large Canadian family. *Can J Ophthalmol* 35:314-324

LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Drenser KA, Flannery JG, Lewin AS, Hauswirth WW (2000) Ribozyme rescue of photoreceptor cells in P23H transgenic rats: long-term survival and late-stage therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11488-11493

LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Lau-Villacorta C, Unoki K, Sung CH, Steinberg RH (1998) Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:592-602

Leskov IB, Klenchin VA, Handy JW, Whitlock GG, Govardovskii VI, Bownds MD, Lamb TD, Pugh EN, Arshavsky VY (2000) The gain of rod phototransduction: reconciliation of biochemical and electrophysiological measurements. *Neuron* 27:525-537

Lewis RA, Lupski JR (2000) Macular degeneration: the emerging genetics. *Hosp Pract (Off Ed)* 35:41-50

Lewis RA, Shroyer NF, Singh N, Allikmets R, Hutchinson A, Li YX, Lupski JR, Leppert M, Dean M (1999) Genotype/phenotype analysis of a photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, in Stargardt disease. *Am J of Hum Genet* 64:422-434

Li Y, Marcos I, Borrego S, Yu ZY, Zhang K, Antinolo G (2001) Evaluation of the ELOVL4 gene in families with retinitis pigmentosa linked to the RP25 locus. *J of Med Genet* 38:478-480

Linari M, Ueffing M, Manson F, Wright A, Meitinger T, Becker J (1999) The retinitis pigmentosa GTPase regulator, RPGR, interacts with the delta subunit of rod cyclic GMP phosphodiesterase. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 96:1315-1320

Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J (1995) Sensory transduction: The visual and olfactory systems. Ed: third. In: *Scientific American Books* (eds), *Molecular Cell Biology*. New York:971-979

Lois N, Holder GE, Bunce C, Fitzke FW, Bird AC (2001) Phenotypic subtypes of Stargardt macular dystrophy-fundus flavimaculatus. *Arch Ophthalmol* 119:359-369

Lopez PF, Aaberg TM (1992) Phenotypic similarities between Stargardt's flavimaculatus and pattern dystrophies. *Aust N Z J Ophthalmol* 20:163-171

Lund RD, Adamson P, Sauve Y, Keegan DJ, Girman SV, Wang S, Winton H, Kanuga N, Kwan AS, Beauchene L, Zerbib A, Hetherington L, Couraud PO, Coffey P, Greenwood J (2001) Subretinal transplantation of genetically modified human cell lines attenuates loss of visual function in dystrophic rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9942-9947

M

Mansergh FC, Millington WS, Kennan A, Kiang AS, Humphries M, Farrar GJ, Humphries P, Kenna PF (1999) Retinitis pigmentosa and progressive sensorineural hearing loss caused by a C12258A mutation in the mitochondrial MTTS2 gene. *Am J of Hum Genet* 64:971-985

Mansour A M (1992) Long-term follow-up of dominant macular dystrophy with flecks (Stargardt). *Ophthalmologica* 205:138-143

Marcos I, Ruiz A, Blaschak CJ, Borrego S, Cutting GR, Antiñolo G (2000) Mutation analysis of GABRR1 and GABRR2 in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *J Med Genet* 37:5

Marlhens F, Bareil C, Griffoin JM, Zrenner E, Amalric P, Eliaou C, Liu SY, Harris E, Redmond TM, Arnaud B, Claustres M, Hamel CP. (1997) Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet* 17:139-141

Martínez-Mir A, Bayés M, Vilageliu L, Grinberg D, Ayuso C, Del Río T, Garcia-Sandoval B, Bussaglia E, Baiget M, González-Duarte R, Balcells S (1997) A new locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa (rp19) maps to 1p13 1p21. *Genomics* 40:142-146

Martínez-Mir A, Paloma E, Allikmets R, Ayuso C, del Río T, Dean M, Vilageliu L, González-Duarte R, Balcells S (1998) Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR. *Nature Genet* 18:11-12

Mata NL, Tzekov RT, Liu X, Weng J, Birch DG, Travis GH (2001) Delayed Dark-Adaptation and Lipofuscin Accumulation in *abcr*^{+/-} Mice: Implications for Involvement of ABCR in Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1685-1690

Mata NL, Weng J, Travis GH (2000) Biosynthesis of a major lipofuscin fluorophore in mice and humans with ABCR-mediated retinal and macular degeneration. *Proc of Nat Acad Sci USA*. 97:7154-7159

Maugeri A, Klevering BJ, Rohrschneider K, Blankenagel A, Brunner HG, Deutman AF, Hoyng CB, Cremers FP (2000) Mutations in the ABCA4 (ABCR) Gene Are the Major Cause of Autosomal Recessive Cone-Rod Dystrophy. *Am J Hum Genet* 67:960-966

Maugeri A, van Driel M, van de Pol D, Klevering BJ, van Haren F, Tijmes N, Bergen A, Rohrschneider K, Blankenagel A, Pinckers A, Dahl N, Brunner HG, Deutman AF, Hoyng CB, Cremers F (1999) The 2588G -> C mutation in the ABCR gene is a mild frequent founder mutation in the western European population and allows the classification of ABCR mutations in patients with Stargardt disease. *Am J Hum Genet* 64:1024-1035

McCarty CA, Mukesh BN, Fu CL, Mitchell P, Wang JJ, Taylor HR (2001) Risk factors for age-related maculopathy: the Visual Impairment Project. *Arch Ophthalmol* 119:1455-1462

McLaughlin CR, Martin BR, Compton DR, Abood ME (1994) Cannabinoid receptors in developing rats: detection of mRNA and receptor binding. *Drug Alcohol Depend* 36:27-31

Merin S (1991) *Inherited Eye Diseases: diagnosis and clinical management*. Ed: First. In: Marcel Dekker I. New York:137-279

Meyers SM, Greene T, Gutman FA (1995) A twin study of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 120:757-766

Meyers SM, Zachary AA (1988) Monozygotic twins with age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 106:651-653

Mitchell P, Smith W, Wang JJ (1998) Iris color, skin sun sensitivity, and age-related maculopathy. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 105:1359-13463

Molday LL, Rabin AR, Molday RS (2000) ABCR expression in foveal cone photoreceptors and its role in Stargardt macular dystrophy. *Nature Genet* 25:257-258

Molday RS, Hsu YT (1995) Further Insight into the Structural and Regulatory Properties of the cGMP-Gated Channel. *Behav Brain Sci* 18:500-501

Molday RS, Molday LL (1999) Purification, characterization, and reconstitution of cyclic nucleotide-gated channels. *Methods Enzymol* 294:246-260

Molokanova E, Maddox F, Luetje CW, Kramer RH (1999) Activity-dependent modulation of rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channels mediated by phosphorylation of a specific tyrosine residue. *J Neurosci* 19:4786-4795

Molokanova E, Trivedi B, Savchenko A, Kramer RH (1997) Modulation of rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channels by tyrosine phosphorylation. *J Neurosci* 17:9068-9076

Morimura H, Fishman GA, Grover S, Fulton A, Berson E, Dryja T (1998) Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or Leber congenital amaurosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3088-3093

Murata T, Kimura H, Sakamoto T, Osusky R, Spee C, Stout TJ, Hinton DR, Ryan SJ (1997) Ocular gene therapy: experimental studies and clinical possibilities. *Ophthalmic Res* 29:242-251

N

Nadig MN (1999) Development of a silicon retinal implant: cortical evoked potentials following focal stimulation of the rabbit retina with light and electricity. *Clin Neurophysiol* 110:1545-1553

Nakazawa M, Kikawa E, Chida Y, Wada Y, Shiono T, Tamai M (1996) Autosomal dominant cone-rod dystrophy associated with mutations in codon 244 (Asn244His) and codon 184 (Tyr184Ser) of the peripherin/ RDS gene. *Arch Ophthalmol* 114:72-78

Nasonkin I, Illing M, Koehler MR, Schmid M, Molday RS, Weber BH (1998) Mapping of the rod photoreceptor ABC transporter (ABCR) to 1p21-p22.1 and identification of novel mutations in Stargardt's disease. *Hum Genet* 102:21-26

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

Nishina PM, North MA, Ikeda A, Yan Y, Naggert JK (1998) Molecular characterization of a novel tubby gene family member, TULP3, in mouse and humans. *Genomics* 54:215-220

Noben-Trauth K, Naggert JK, North MA, Nishina PM (1996) A candidate gene for the mouse mutation tubby. *Nature* 380:534-538

North MA, Naggert JK, Yan YZ, Nobentrauth K, Nishina PRA (1997) Molecular characterization of tub, tulp1, and tulp2, members of the novel tubby gene family and their possible relation to ocular diseases. *Proc Nat Acad Sci USA* 94:3128-3133

O

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

P

Paloma E, Martínez-Mir A, Vilageliu L, González-Duarte R, Balcells S (2001) Spectrum of ABCA4 (ABCR) gene mutations in Spanish patients with autosomal recessive macular dystrophies. *Hum Mut* 17:504-510

Papaoiouannou M, Ocaka L, Bessant D, Lois N, Bird A, Payne A, Bhattacharya S (2000) An analysis of ABCR mutations in British patients with recessive retinal dystrophies. *Invest Ophthalmol VisSci* 41:16-19

Payne AM, Downes SM, Bessant DA, Taylor R, Holder GE, Warren MJ, Bird AC, Bhattacharya S. S (1998) A mutation in guanylate cyclase activator 1A (GUCA1A) in an autosomal dominant cone dystrophy pedigree mapping to a new locus on chromosome 6p21.1. *Hum Mol Genet* 7:273-277

Payne AM, Khaliq S, Hameed A, Bessant DA, Mehdi SQ, Bhattacharya SS (1999) Localization of a gene for autosomal recessive cone-rod dystrophy to chromosome 17p12-13.3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:603

Petrukhin K, Koisti MJ, Bakall B, Li W, Xie GC, Marknell T, Sandgren O, Forsman K, Holmgren G, Andreasson S, Vujic M, Bergen A, McGartyDugan V, Figueroa D, Austin CP, Metzker ML, Caskey CT, Wadelius C (1998) Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nature Genet* 19:241-247

Phelan JK, Bok D (2000) A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes. *Molecular Vision* 6:116-124

Pierce EA (2001) Pathways to photoreceptor cell death in inherited retinal degenerations. *Bioessays* 23:605-618

Pittler SJ, Baehr W (1991) Identification of a nonsense mutation in the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase b-subunit gene of the *rd* mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8322-8326

Pittler SJ, Lee AK (1992) Primary structure and chromosomal localization of human and mouse rod photoreceptor cGMP-gated cation channel. *J Biol Chem* 267:6257-6262

Polans A, Baehr W, Palczewski K (1996) Turned on by Ca²⁺! The physiology and pathology of Ca²⁺- binding proteins in the retina. *Trends Neurosci* 19:547-554

R

Rao VR, Cohen GB, Oprian DD (1994) Rhodopsin mutation G90D and a molecular mechanism for congenital night blindness. *Nature* 367:639-642

Rattner A, Sun H, Nathans J (1999) Molecular genetics of human retinal disease. *Annu Rev Genet* 33:89-131

Redmond TM, Hamel CP (2000) Genetic analysis of RPE65: from human disease to mouse model. *Methods Enzymol* 316:705-724

Remé CE, Grimm C, Hafezi F, Wenzel A, Williams TP (2000) Apoptosis in the Retina: The Silent Death of Vision. *News Physiol Sci* 15:120-124

Richards SC, Creel DJ (1995) Pattern dystrophy and retinitis pigmentosa caused by a peripherin/RDS mutation. *Retina* 15:68-72

Rivera A, White K, Stohr H, Steiner K, Hemmrich N, Grimm T, Jurklics B, Lorenz B, Scholl HP, Apfelstedt-Sylla E, Weber BH (2000) A Comprehensive Survey of Sequence Variation in the ABCA4 (ABCR) Gene in Stargardt Disease and Age-Related Macular Degeneration. *Am J Hum Genet* 67:800-813

Rivolta, C, Sweklo EA, Berson EL, Dryja TP (2000) Missense Mutation in the USH2A Gene: Association with Recessive Retinitis Pigmentosa without Hearing Loss. *Am J Hum Genet* 66:1975-1978

Roepman R, Bernoud-Hubac N, Schick DE, Maugeri A, Berger W, Ropers HH, Cremers FP, Ferreira PA (2000) The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) interacts with novel transport-like proteins in the outer segments of rod photoreceptors. *Hum Mol Genet* 9:2095-2105

Rosenfeld PJ, Cowley GS, McGee TL, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP (1992) A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 1:209-213

Rozet JM, Gerber S, Ghazi I, Perrault I, Ducroq D, Souied E, Cabot A, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J (1999a) 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* 36:447-451

Rozet JM, Gerber S, Souied E, Ducroq D, Perrault I, Ghazi I, Soubrane G, Coscas G, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J (1999b) The ABCR gene: a major disease gene in macular and peripheral retinal degenerations with onset from early childhood to the elderly. *Mol Genet Metab* 68:310-315

Rozet JM, Gerber S, Souied E, Perrault I, Chatelin S, Ghazi I, Leowski C, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J (1998) Spectrum of ABCR gene mutations in autosomal recessive macular dystrophies. *Eur J Hum Genet* 6:291-295

Ruiz A, Borrego S, Marcos I, Antiñolo G (1998) A major locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa on 6q, determined by homozygosity mapping of chromosomal regions that contain gamma-aminobutyric acid-receptor clusters. *Am J Hum Genet* 62:1452-1459

S

Sahly I, Gogat K, Kobetz A, Marchant D, Menasche M, Castel MN, Revah F, Dufier JL, Guerre-Millo M, Abitbol MM (1998) Prominent neuronal-specific tub gene expression in cellular targets of tubby mice mutation. *Hum Mol Genet* 7:1437-1447

Santagata S, Boggon TJ, Baird CL, Gomez CA, Zhao J, Shan WS, Myszka DG, Shapiro L (2001) G-protein signaling through tubby proteins. *Science* 292:2041-2050

Sauer CG, Gehrig A, Warneke-Wittstock R, Marquardt A, Ewing CC, Gibson A, Lorenz B, Jurklies B, Weber BH (1997) Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis. *Nat Genet* 17:164-170

Sauve Y, Klassen H, Whiteley SJ, Lund RD (1998) Visual field loss in RCS rats and the effect of RPE cell transplantation. *Exp Neurol* 152:243-50

Schutt F, Davies S, Kopitz J, Holz FG, Boulton ME (2000) Photodamage to human RPE cells by A2-E, a retinoid component of lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:2303-2308

Schwarzer A, Schauf H, Bauer PJ (2000) Binding of the cGMP-gated channel to the Na/Ca-K exchanger in rod photoreceptors. *J Biol Chem* 275:13448-13454

Schwesinger C, Yee C, Rohan RM, Joussem AM, Fernandez A, Meyer TN, Poulaki V, Ma JJ, Redmond TM, Liu S, Adamis AP, D'Amato RJ (2001) Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol* 158:1161-1172

Scriver CR (2001) The metabolic and molecular bases of inherited disease. Ed: 8th. In: McGraw-Hill (eds), New York.

Seddon JM, Ajani UA, Mitchell BD (1997) Familial aggregation of age-related maculopathy. *Am J Ophthalmol* 123:199-206

Seddon JM, Ajani OA, Sperduto RD (1994) Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. *JAMA* 272:1413-1420

Seeliger MW, Grimm C, Stahlberg F, Friedburg C, Jaissle G, Zrenner E, Guo H, Reme CE, Humphries P, Hofmann F, Biel M, Fariss R, Redmond TM, Wenzel A (2001) New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* 29:70-74

Shapiro MB, Senapathy P (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequences statistics and functional implications in gene expression. *Nucl Acids Res* 15:7155-7174

Shastry BS (1997) Signal transduction in the retina and inherited retinopathies. *Cellular And Molecular Life Sciences* 53:419-429

- Shroyer NF, Lewis RA, Allikmets R, Singh N, Dean M, Leppert M, Lupski JR** (1999) The rod photoreceptor ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, and retinal disease: from monogenic to multifactorial. *Vision Research* 39:2537-2544
- Shroyer NF, Lewis RA, Yatsenko AN, Lupski JR** (2001) Null Missense ABCR (ABCA4) Mutations in a Family with Stargardt Disease and Retinitis Pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2757-2761
- Shugart YY, Banerjee P, Knowles JA, Lewis CA, Jacobson SG, Matise TC, Penchaszadeh G, Gilliam TC, Ott J** (1995) Fine genetic mapping of a gene for autosomal recessive retinitis pigmentosa on chromosome 6p21. *Am J Hum Genet* 57:499-502
- Sieving PA, Richards JE, Bingham EL, Naarendorp F** (1992) Dominant congenital complete nyctalopia and Gly90Asp rhodopsin mutation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 33:1397
- Silvestri G, Johnston PB, Hughes AE** (1994) Is genetic predisposition an important risk factor in age-related macular degeneration? *Eye* :564-568
- Simonelli F, Testa F, de Crecchio G, Rinaldi E, Hutchinson A, Atkinson A, Dean M, D'Urso M, Allikmets R** (2000) New ABCR mutations and clinical phenotype in Italian patients with Stargardt disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:892-897
- Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC, Klein BE, Hofman A, Jensen S, Wang JJ, de Jong PT** (2001) Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology* 108:697-704
- Soubrane G, Bressler NM** (2001) Treatment of subfoveal choroidal neovascularisation in age related macular degeneration: focus on clinical application of verteporfin photodynamic therapy. *Br J Ophthalmol* 85:483-495
- Souied EH, Benhamou N, Sterkers M, Oubraham H, Coscas G, Soubrane G, Zittoun J, Echenne B, Rothenberg S** (2001) Retinal degeneration associated with congenital transcobalamin II deficiency. *Arch Ophthalmol* 119:1076-1077
- Souied EH, Benlian P, Amouyel P, Feingold J, Lagarde JP, Munnich A, Kaplan J, Coscas G, Soubrane G** (1998) The epsilon4 allele of the apolipoprotein E gene as a potential protective factor for exudative age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 125:353-359
- Souied EH, Ducroq D, Rozet JM, Gerber S, Perrault I, Munnich A, Coscas G, Soubrane G, Kaplan J** (2000) ABCR gene analysis in familial exudative age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:244-247
- Souied EH, Ducroq D, Rozet JM, Gerber S, Perrault I, Sterkers M, Benhamou N, Munnich A, Coscas G, Soubrane G, Kaplan J** (1999) A novel ABCR nonsense mutation responsible for late-onset fundus flavimaculatus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2740-2744
- Sperduto RD, Hiller R** (1986) Systemic hypertension and age-related maculopathy in the Framingham Study. *Arch Ophthalmol* 104:216-219
- Stargardt K** (1909) Über familiäre, progressive Degeneration in der Maculagegend des Auges. *Arch Ophthalmol* 71:534-550
- Stone EM, Lotery AJ, Munier FL, Heon E, Piguet B, Guymer RH, Vandenberg K, Cousin P, Nishimura D, Swiderski RE, Silvestri G, Mackey DA, Hageman GS, Bird AC, Sheffield VC, Schorderet DF** (1999) A single EFEMP1 mutation associated with both Malattia Leventinese and Doyne honeycomb retinal dystrophy. *Nat Genet* 22:199-202

Stone EM, Nichols BE, Kimura AE, Weingeist TA, Drack A, Sheffield VC (1994) Clinical features of a Stargardt-like dominant progressive macular dystrophy with genetic linkage to chromosome 6q. *Arch Ophthalmol* 112:765-772

Stone EM, Webster AR, Vandenburg K, Streb LM, Hockey RR, Lotery AJ, Sheffield VC (1998) Allelic variation in ABCR associated with Stargardt disease but not age-related macular degeneration [letter]. *Nat Genet* 20:328-329

Sun H, Molday RS, Nathans J (1999) Retinal stimulates ATP hydrolysis by purified and reconstituted ABCR, the photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt disease. *J Biol Chem* 274:8269-8281

Sun H, Nathans J (1997) Stargardts abcr is localized to the disc membrane of retinal rod outer segments. *Nature Genet* 17:15-16

Sun H, Nathans J (2001) The challenge of macular degeneration. *Sci Am* 285:68-75

Sun H, Smallwood PM, Nathans J (2000) Biochemical defects in ABCR protein variants associated with human retinopathies. *Nat Genet* 26:242-246

Sundelin SP, Nilsson SE (2001) Lipofuscin-formation in retinal pigment epithelial cells is reduced by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 31:217-225

Sundin OH, Yang JM, Li YY, Zhu DP, Hurd JN, Mitchell TN, Silva ED, Maumenee IH (2000) Genetic basis of total colourblindness among the Pingelapese islanders. *Nature Genet.* 25:289-293

Sung CH, Davenport CM, Nathans J (1993) Rhodopsin Mutations Responsible for Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa - Clustering of Functional Classes Along the Polypeptide Chain. *J Biol Chem* 268:26645-26649

Suter M, Reme C, Grimm C, Wenzel A, Jaattela M, Esser P, Kociok N, Leist M, Richter C (2000) Age-related macular degeneration. The lipofusion component N-retinyl-N-retinylidene ethanolamine detaches proapoptotic proteins from mitochondria and induces apoptosis in mammalian retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem* 275:39625-39630

Swanson DA, Freund CL, Steel JM, Xu S, Ploder L, McInnes RR, Valle D (1997) A differential hybridization scheme to identify photoreceptor-specific genes. *Genome Res* 7:513-521

Szlyk JP, Fishman GA, Alexander KR, Peachey NS, Derlacki DJ (1993) Clinical subtypes of cone-rod dystrophy. *Arch Ophthalmol* 111:781-788

T

Tan E, Wang Q, Quiambao AB, Xu X, Qtaishat NM, Peachey NS, Lem J, Fliesler SJ, Pepperberg DR, Naash MI, Al-Ubaidi MR (2001) The Relationship between Opsin Overexpression and Photoreceptor Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:589-600

Travis GH, Brennan MB, Danielson PE, Kozak CA, Sutcliffe JG (1989) Identification of a photoreceptor-specific mRNA encoded by the gene responsible for retinal degeneration slow (rds). *Nature* 338:70-73

Travis GH, Christerson L, Danielson PE, Klisak I, Sparkes RS, Hahn LB, Dryja TP, Sutcliffe JG (1991) The Human Retinal Degeneration Slow (RDS) Gene - Chromosome Assignment and Structure of the Messenger RNA. *Genomics* 10:733-739

V

Valverde D, Baiget M, Seminago R, del Río E, García-Sandoval B, del Río T, Bayés M, Balcells S, Martínez-Mir A, Grinberg D, Ayuso C (1996b) Identification of a novel ARG552GLN in exon 13 of the b-subunit of rod phosphodiesterase gene in a Spanish family with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Mut* 8:393-394

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

van Driel MA, Maugeri A, Klevering BJ, Hoyng CB, Cremers FP (1998) ABCR unites what ophthalmologists divide(s). *Ophthalmic Genet* 19:117-122

VandenLangenberg GM, Mares-Perlman JA, Klein R, Klein BE, Brady WE, Palta M (1998) Associations between antioxidant and zinc intake and the 5-year incidence of early age-related maculopathy in the Beaver Dam Eye Study. *Am J Epidemiol* 148:204-214

Verma L, Das T, Binder S, Heriot WJ, Kirchhof B, Venkatesh P, Krebs I, Stolba U, Jahn C, Feichtinger H, Kellner L, Krugluger H, Pawelka I, Frohner U, Kruger A, Li W, Tewari HK (2000) New approaches in the management of choroidal neovascular membrane in age-related macular degeneration. *Indian J Ophthalmol* 48:263-278

Vervoort R, Lennon A, Bird AC, Tulloch B, Axton R, Miano MG, Meindl A, Meitinger T, Ciccodicola A, Wright AF (2000) Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 25:462-466

Vollrath D, Feng W, Duncan JL, Yasumura D, D'Cruz PM, Chappelow A, Matthes MT, Kay MA, LaVail MM (2001) Correction of the retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of Mertk. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12584-12589

W

Wang M, Lam TT, Tso M, Naash MRA (1997) Expression of a mutant opsin gene increases the susceptibility of the retina to light damage. *Visual Neuroscience*. 14:55-62

Wang Q, Chen Q, Zhao K, Wang L, Traboulsi EI (2001) Update on the molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Genet* 22:133-154

Warburg M, Sjo O, Tranebjaerg L, Fledelius HC (1991) Deletion Mapping of a Retinal Cone-Rod Dystrophy - Assignment to 18q211. *Am J Med Genet* 39:288-293

Weber B, Sander S, Kopp C, Walker D, Eckstein A, Wissinger B, Zrenner E, Grimm T (1996) Analysis of 21 Stargardt's disease families confirms a major locus on chromosome 1p with evidence for non-allelic heterogeneity in a minority of cases. *Br J Ophthalmol* 80:745-749

Weber BHF, Vogt G, Pruett RC, Stohr H, Felbor U (1994) Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy. *Nature Genet* 8:352-356

Webster AR, Heon E, Lotery AJ, Vandeburgh K, Casavant TL, Oh KT, Beck G, Fishman GA, Lam BL, Levin A, Heckenlively JR, Jacobson SG, Weleber RG, Sheffield VC, Stone EM (2001) An Analysis of Allelic Variation in the ABCA4 Gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1179-1189

Weeks DE, Conley YP, Mah TS, Paul TO, Morse L, Ngo-Chang J, Dailey JP, Ferrell RE, Gorin MB (2000) A full genome scan for age-related maculopathy. *Hum Mol Genet* 9:1329-1349

Weissenbach J (1993) Microsatellite polymorphisms and the genetic linkage map of the human genome. *J Med Genet* 30:385-387

Weleber RG (1994) Stargardt's macular dystrophy. *Arch Ophthalmol* 112:752-754

Weleber RG, Carr RE, Murphey WH, Sheffield VC, Stone EM (1993) Phenotypic Variation Including Retinitis-Pigmentosa, Pattern Dystrophy, and Fundus Flavimaculatus in a Single Family with a Deletion of Codon 153 or 154 of the Peripherin/RDS Gene. *Arch Ophthalmol* 111:1531-1542

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

Weng J, Mata NL, Azarian SM, Tzekov RT, Birch DG, Travis GH (1999) Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. *Cell* 98:13-23

Wissinger B, Gamer D, Jagle H, Giorda R, Marx T, Mayer S, Tippmann S, Broghammer M, Jurklics B, Rosenberg T, Jacobson SG, Sener EC, Tatlipinar S, Hoyng CB, Castellan C, Bitoun P, Andreasson S, Rudolph G, Kellner U, Lorenz B, Wolff G, Verellen-Dumoulin C, Schwartz M, Cremers FP, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Salati R, Sharpe LT, Kohl S (2001) Cnga3 mutations in hereditary cone photoreceptor disorders. *Am J Hum Genet* 69:722-737

Wissinger B, Jagle H, Kohl S, Broghammer M, Baumann B, Hanna DB, Hedels C, Apfelstedt-Sylla E, Randazzo G, Jacobson SG, Zrenner E, Sharpe LT (1998) Human rod monochromacy: linkage analysis and mapping of a cone photoreceptor expressed candidate gene on chromosome 2q11. *Genomics* 51:325-331

Wissinger B, Muller F, Weyand I, Schuffenhauer S, Thanos S, Kaupp UB, Zrenner E (1997) Cloning, chromosomal localization and functional expression of the gene encoding the alpha-subunit of the cGMP-gated channel in human cone photoreceptors. *Eur J Neurosci* 9:2512-2521

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

Wright AF (2000) For want of a disc, the cell was lost. *Nat Med* 6:508-510

Wroblewski JJ, Wells JA, Eckstein A, Fitzke F, Jubb C, Keen TJ, Inglehearn C, Bhattacharya S, Arden GB, Jay M, Bird AC (1994) Macular Dystrophy Associated with Mutations at Codon 172 in the Human Retinal Degeneration Slow Gene. *Ophthalmology* 101:12-22

Y

Yates R, Moore A (2000) Genetic susceptibility to age related macular degeneration. *J Med Genet* 37:83-87

Yatsenko AN, Shroyer NF, Lewis RA, Lupski JR (2001) Late-onset Stargardt disease is associated with missense mutations that map outside known functional regions of ABCR (ABCA4). *Hum Genet* 108:346-355

Yefimova MG, Jeanny JC, Keller N, Sergeant C, Guillonneau X, Beaumont C, Courtois Y (2002) Impaired retinal iron homeostasis associated with defective phagocytosis in Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:537-545

Young MJ, Ray J, Whiteley SJ, Klassen H, Gage FH (2000) Neuronal differentiation and morphological integration of hippocampal progenitor cells transplanted to the retina of immature and mature dystrophic rats. *Mol Cell Neurosci* 16:197-205

Z

Zar JH (1984) The binomial distribution. Ed: Second. In: Prentice- Hall, Inc. (eds), *Biostatistical Analysis*. New Jersey: 369-405

Zhang K, Bither PP, Park R, Donoso LA, Seidman JG, Seidman CE (1994) A dominant Stargardt's macular dystrophy locus maps to chromosome 13q34. *Arch Ophthalmol* 112:759-764

Zhang K, Garibaldi DC, Kniazeva M, Albin T, Chiang MF, Kerrigan M, Sunness JS, Han M, Allikmets R (1999) A novel mutation in the ABCR gene in four patients with autosomal recessive Stargardt disease. *Am J Ophthalmol* 128:720-724

Zhang K., Kniazeva M, Han M, Li, W, Yu Z, Yang Z, Li Y, Metzker ML, Allikmets R, Zack DJ, Kakuk LE, Lagali PS, Wong PW, MacDonald IM, Sieving PA, Figueroa DJ, Austin CP, Gould RJ, Ayyagari R, Petrukhin K (2001) A 5-bp deletion in ELOVL4 is associated with two related forms of autosomal dominant macular dystrophy. *Nat Genet* 27:89-93