



Joan Ignasi Pieras i Martín

Doctor en biologia molecular i biomedicina (Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío-CSIC- Universidad de Sevilla), llicenciat en biologia, microbiologia i genètica (UAB). Especialista en l'estudi i el diagnòstic de les malalties hereditàries

Introducció

Les distròfies hereditàries de retina (DHR) són un grup de malalties genètiques i fenotípicament molt heterogènies, caracteritzades per la degeneració de les cèl·lules fotoreceptores localitzades a la capa profunda de la retina. Aquesta degeneració condueix a una degeneració retinal i la pèrdua progressiva del camp visual, i porta el malalt a una ceguera parcial o total.

Fins a l'arribada de la genètica molecular, la classificació d'aquestes patologies s'efectuava prenent com a base el fenotip clínic i el model d'herència. Malgrat tot, una classificació basada en la causa genètica subjacent és la millor opció per assegurar un bon consell genètic, un pronòstic més precís i una solució terapèutica en la mesura que sigui possible.

Retinitis pigmentària (RP) és el terme emprat per descriure un tipus de DHR en què els fotoreceptors i les cèl·lules de l'epiteli pigmentari degeneren de manera progressiva. En aquest tipus de malaltia, s'observa l'aparició d'espícules al fons d'ull, degudes a la neurodegeneració (figura 1).

En els casos típics, es veuen afectats primerament els bastons, la qual cosa porta a una ceguera nocturna en els primers estadis de la malaltia així com la pèrdua bilateral de camp visual. A mesura que la malaltia avança, es veuen afectats també els cons, amb la qual cosa la visió diürna i l'agudesia visual queden alterades.



Joan Ignasi Pieras i Martín

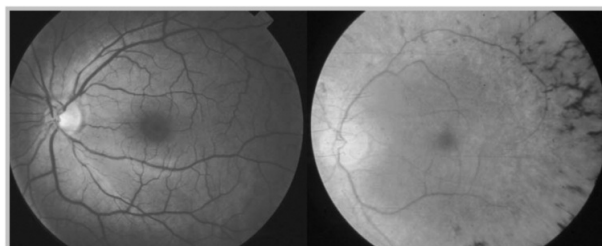


Figura 1. Comparació del fons d'ull d'un ull sa (esquerra), amb un fons d'ull d'un afectat de RP (dreta). Es poden observar els dipòsits de pigment en forma d'espícula òssia

Genètica molecular de la retinitis pigmentosa autosòmica recessiva. Identificació i caracterització del gen EYS com a responsable del locus RP25 i la seva implicació en altres distròfies hereditàries de retina

La prevalença a escala mundial és d'1 de cada 4.000 persones (Hartong et al., 2006), i inclou casos d'herència autosòmica dominant, casos d'herència lligada al cromosoma X, casos d'herència autosòmica recessiva o inclús casos d'herència diginica, disomia uniparental o, fins i tot, d'herència mitocondrial. Aquest grau tan elevat d'heterogeneïtat fa molt difícil fer un estudi de les causes moleculars. De fet, el nombre de gens i loci relacionats amb l'RP no ha fet més que incrementar-se des del 1989, i només es coneix la mutació responsable en el 50% dels casos d'RP (Hamel et al., 2006; Pomares et al., 2007).

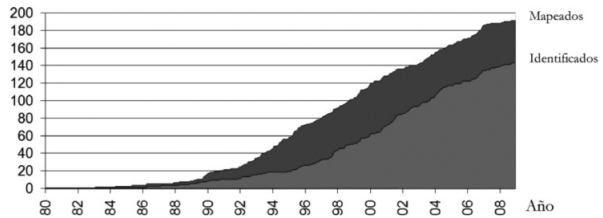


Figura 2. Nombre de gens mapejats i identificats com a responsables de les DHR des de l'any 1980 fins a l'any 2009

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

Combinant diverses estratègies de clonatge funcional i mapeig per homozigosi, el nostre grup d'investigació va localitzar fa més de 15 anys el locus *RP25* en un important grup de famílies RPAR de la nostra cohort. Incloïa una regió de 16.1 cM al braç llarg del cromosoma 6, i el 14% de les famílies RPAR espanyoles van mostrar un lligament positiu per a aquest locus (Ruiz et al., 1998). Estudis posteriors van ajudar a delimitar aquest locus fins a una regió crítica de 2,67 cM, i incloure més famílies lligades a aquest locus, i es va confirmar l'alta prevalença de l'RP25 a la població RPAR Espanyola. A més, es van identificar famílies RPAR d'altres grups ètnics lligats a l'RP25 (Khaliq et al., 2007; Barragan et al., 2005; Abd El Aziz et al., 2007).

Des del descobriment del locus *RP25* l'any 1998, el nostre grup s'ha centrat en la cerca del gen responsable del fenotip *RP25*, així com en noves anàlisis de lligament per mirar d'acotar el locus. A més, en els últims anys s'ha col·laborat amb el grup d'investigació del professor Battacharya, i s'ha augmentat la llista de gens analitzats i exclosos com a responsables de la malaltia.

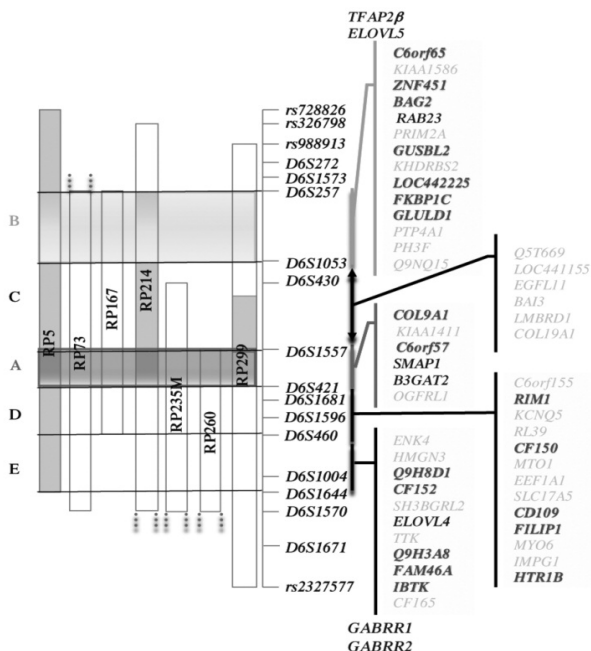


Figura 3. Localització dels gens a les regions crítiques del locus RP25 avaluats com a possibles responsables de la malaltia a les famílies lligades a l'RP25. Els gens anotats representen els gens analitzats pel nostre grup (groc i blau) i els que s'han analitzat en col·laboració amb el grup del professor Bhattacharya (vermell)

Resultats i discussió

1. Estudis de CNV a la regió RP25 i anàlisi bioinformàtica i molecular dels gens Q5T1H1, Q9H557, Q5TEL3, Q5TEL4, Q5VVG4 i Q5T3C8

En paral·lel als estudis de seqüenciació de gens candidats, una de les nostres hipòtesis va ser que l'alteració podia ser deguda a un canvi en el nombre de còpies d'algun gen en la regió del locus RP25. Seguint aquesta hipòtesi, es va realitzar un estudi d'hibridació genòmica comparativa (CGH) amb la col·laboració de l'equip de Nigel P. Carter del Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge).

Malgrat que la nostra hipòtesi inicial era que un augment en el nombre de còpies podria ser el causant del fenotip, el que va ocórrer és la identificació d'una delecció en homozigosi d'un clon B100-Kb en tots els membres afectes de la família consanguínia RP5, així com una delecció en heterozigosi en els membres afectes de la família RP73 dels clons Chr6tp-10G7, Chr6tp-18D9 i Chr6tp-9B9.

Per tant, la delecció del clon B100-kb (chr6tp-19C7) en tots els

afectes de la família consanguínia RP5 així com la deleció dels clons Chr6tp-10G7, Chr6tp-18D9 i Chr6tp-9B9 en heterozigosi en els membres afectes de la família RP73, van fer-nos suposar que la causa genètica subjacent havia de trobar-se localitzada en aquesta regió, i així vam ser capaços d'acotar la regió crítica a tan sols 200 kb, molt més assequibles per al rastreig directe. La nostra zona inicial de recerca de 160 gens va quedar reduïda a només 6 suposats gens. Això va resultar en una disminució enorme de treball a l'hora de seleccionar, identificar i analitzar nous gens candidats.

Amb totes aquestes dades unides vam poder focalitzar el rastreig en els gens *Q5T1H1*, *Q9H557*, *Q5TEL3*, *Q5TEL4*, *Q5VVG4* i *Q5T3C8*, localitzats en aquesta nova regió.

L'estudi mutacional per seqüenciació directa dels gens *Q5T1H1*, *Q9H557*, *Q5TEL3*, *Q5TEL4*, *Q5VVG4* i *Q5T3C8* en 10 famílies lligades a l'RP25 (RP5, RP167, RP377, RP73, RP214, RP299, RP328, RP349, RP351 i RP355) va donar com a resultat la identificació d'una deleció al gen *Q9H557*. A més a més, va fallar l'amplificació dels 4 exons predits a les bases de dades del gen *Q5TEL3* a tots els membres afectes de la família, que coincideix amb la deleció del clon B100-kb (chr6tp-19C7) trobada mitjançant l'estudi de CGH en aquesta família.

Figura 4. Representació esquemàtica de la regió al cromosoma 6 del clon delecionat. A) Regió RP25 original (blau) i regió acotada per un entrecruament a la família 328 (vermell). B) Gens anotats a la regió coincident del clon delecionat

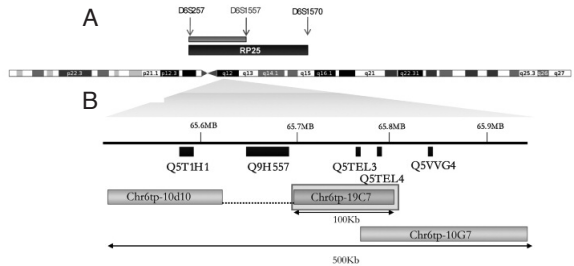
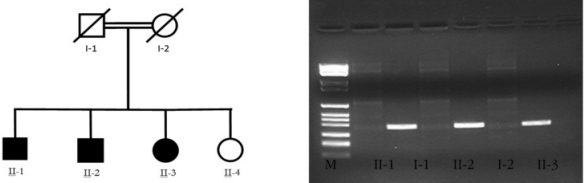


Figura 5. Gel d'electroforesi on es pot observar l'absència d'amplificació per PCR de la regió delecionada en homozigosi en els individus afectats de la família RP5



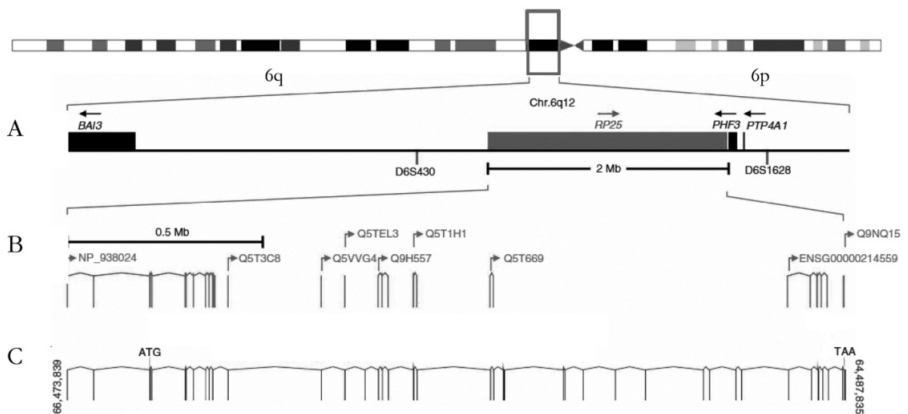
2. Identificació del gen EYS i la proteïna SPAM

Tot i que l'RP és una malaltia amb una heterogeneïtat molt elevada, el fet que en regions tan properes estiguessin implicades de manera independent en l'aparició del fenotip RP25 en diverses famílies, va resultar altament improbable. Per això vam fer les anàlisis de RT-PCR i 5'3' RACE cDNA amplification, amb el propòsit d'esbrinar si es tractava de gens diferents o, en el cas de la nostra hipòtesi, un únic gen que englobaria diversos gens no completament anotats a les bases de dades.

Per tant, es van dur a terme les anàlisis d'RT-PCR RACE a partir de la informació dels gens *Q9H557* i *Q5TEL3*. Aquests estudis, en col·laboració amb el grup del professor Shomi S. Bhattacharya, director del Department of Molecular Genetics, Institute of Ophthalmology (Londres), van revelar l'existència d'un nou gen no anotat prèviament a les bases de dades que incloïa els 6 anteriors. Aquest gen inclouria 30 exons dels predits a les bases de dades com a part dels 9 gens anotats en aquesta regió, així com 13 exons més. Aquest nou gen va ser batejat com a **EYS** i la proteïna que codifica com la proteïna **SPAM**. Vam fer servir aquest nom perquè el gen *EYS* és homòleg del gen *eyes shut* de la drosòfila, que codifica per la proteïna *spacemaker*.

Un cop analitzades totes les dades, el nou gen *EYS*, conformat per 43 exons, tindria una llargària aproximada de 2 megabases al cromosoma 6 (64487835-66473839) i codificaria un transcrit de més de 10 Kb. Aquest seria el gen més gran

Figura 6. A). Representació esquemàtica dels gens i microsatèl·lits flanquejants a la regió RP25. B) Gens predits a la regió RP25. C) Representació dels 43 exons que conformen el gen *EYS*



conegut avui dia que s'expressi a la retina i el cinquè gen conegut més gran de l'èsser humà.

3. Caracterització bioinformàtica de la proteïna

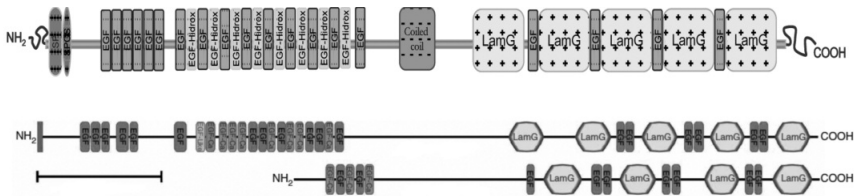
Un cop descobert el nou gen, calia fer un estudi de la proteïna codificada (SPAM) per mirar d'esbrinar les seves funcions i característiques més rellevants.

L'anàlisi bioinformàtica dels dominis, conjuntament amb els coneixements sobre el paper que té el gen homòleg a la drosòfila en l'estructura dels fotoreceptors (Husain et al., 2006), ens indicaria que la proteïna SPAM hi té un paper fonamental.

La proteïna SPAM té un pes molecular de 348398.4 Dalton i un punt isoelèctric teòric de 5.46 i està composta per 3144 aminoàcids. Després de diversos estudis bioinformàtics, vam identificar diversos dominis en aquesta proteïna, agrupats en quatre tipus:

- Seqüència d'unió al pèptid senyal (1-21 aa)
- Dominis EGF (156-606, 643-1197, 1221-1236, 2098-2140, 2335-2408, 2609-2695 i 2877-2593 aa)
- Dominis EGF amb llocs d'hidroxilació d'asparagina i àcid aspàrtic (Asx_Hidroxy) (696-707, 748-759, 905-916, 943-954, 1019-1030 i 1176-1187 aa)
- Domini hèlix superenrotllada (*coiled coil*) (1383-1494 aa)
- Dominis laminina G (1883-2063, 2145-2339, 2419-2609, 2696-2874 i 2954-3144 aa)

Figura 7. Representació esquemàtica dels dominis funcionals de la proteïna SPAM humana i la proteïna SPAM de la drosòfila



Per una banda, l'existència d'almenys 27 motius EGF sembla que té un paper important a l'estructura tridimensional i, per tant, la SPAM podria tenir un paper important en el reconeixement dels receptors i altres molècules. A més a més, els dominis laminina G apareixen associats a mecanismes d'adhesió cel·lular, senyalització, migració i diferenciació

cel·lular. Aquests dominis indicarien que la proteïna SPAM té un rol important en el manteniment, l'estructura i la morfogènesi retinal.

El cas de la troballa del pèptid senyal indicaria que aquesta proteïna, un cop ha madurat, és una proteïna secretada o que posseeix una regió extracel·lular (Jarjanazi et al., 2008). A més a més, apareix a la bibliografia que altres proteïnes secretades com SCUBE (Yang et al., 2002) o CMG-2 (Bell et al., 2001) mostren dominis similars a la nostra proteïna i posseeixen una funció estructural.

Per acabar, la regió d'hèlix superenrotllada reforçaria la idea de la funció de la SPAM en l'organització retinal. Aquest tipus de motius estan implicats en nombroses interaccions proteiques (Mason i Arndt, 2004).

Per tot això, hem arribat a la conclusió que la SPAM hauria de ser una proteïna secretada pels fotoreceptors i que intervindria en l'estructura, el manteniment i la morfogènesi retinal. Al mateix temps, la presència d'aquesta proteïna a la drosòfila, que és secretada pel receptor i que exerceix un paper estructural clau (Husain et al., 2006), donaria més força a la nostra hipòtesi sobre la funció de la SPAM.

4. Immunolocalització i distribució de l'expressió del gen EYS

Un cop descobert el gen EYS i caracteritzada aquesta nova proteïna, el pas següent és saber en quins teixits s'expressa. Per dur a terme aquest treball vam dur a terme l'estudi d'expressió del gen EYS mitjançant RT-PCR i la immunolocalització de la proteïna fent servir uns estudis d'immunohistoquímica

Els estudis mitjançant RT-PCR en cDNA humans de diversos cultius i línies cel·lulars mostren l'expressió d'aquest gen només a la retina i concretament als fotoreceptors (figura 8). D'altra banda, els estudis immunohistoquímics efectuats en retina de porc mostren una expressió de la proteïna SPAM a la capa de fotoreceptors. A més de l'anticòs contra la proteïna SPAM (verd), es va fer servir un anticòs contra la rodopsina (vermell), i les dos proteïnes colocalitzen (figura 9).

Aquests resultats obtinguts han evidenciat que aquest gen només s'expressa a la retina i, més concretament, a les cèl·lules fotoreceptores. Això demostraria la importància d'aquest gen a la retina i, més específicament, als fotoreceptors.

Bibliografia

- ABD EL-AZIZ, M. M.; BARRAGÁN, I.; O'DRISCOLL, C. A.; GOODSTADT, L.; PRIGMORE, E.; BORREGO, S.; MENA, M.; PIERAS, J. I.; EL-ASHRY, M. F.; SAFIEH, L. A.; SHAH, A.; CHEETHAM, M. E.; CARTER, N. P.; CHAKAROVA, C.; PONTING, C. P.; BHATTACHARYA, S. S.; ANTINOLO, G. "EYS, encoding an ortholog of *Drosophila* spacemaker, is mutated in autosomal recessive retinitis pigmentosa". *Nat Genet.* 40:1285-7, 2008.
- ABD EL-AZIZ, M. M.; EL-ASHRY, M. F.; CHAN, W. M.; CHONG, K. L.; BARRAGÁN, I.; ANTIÑOLO, G.; PANG, C. P.; BHATTACHARYA, S. S. "A Novel Genetic Study of Chinese Families with Autosomal Recessive retinitis pigmentosa". *Ann Hum Genet.* 70:1-14, 2006.
- ABD EL-AZIZ, M. M.; O'DRISCOLL, C.; KAYE R.; BARRAGÁN, I.; EL-ASHRY, M. F.; BORREGO, S.; ANTIÑOLO, G.; PANG, C.; WEBSTER, A. R.; BHATTACHARYA, S. S. "Identification of Novel Mutations in the ortholog of *Drosophila* eyes shut Gene (*EYS*) Causing Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa". *IOVS. Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51:4266-72, 2010.
- ALONSO, M. J.; HEINE-SUNER, D.; CALVO, M., ET AL. "Spectrum of mutations in the *CFTR* gene in Cystic Fibrosis patients of Spanish ancestry". *Ann Hum Genet.* 71:194-201, 2006.
- AUDO, I.; SAHEL, J.-A.; MOHAND-SAÏD, S.; LANCELOT M.-E.; ANTONIO, A.; MOSKOVA-DOUMANOVA, V.; NANDROT, E.; JORDAN DOUMANOV; BARRAGAN, I.; ANTINOLO G.; BHATTACHARYA, S.S.; ZEITZ, C. "EYS is a major gene for rod-cone dystrophies in France". *Human Mutation.* 31:E1406-35, 2010.
- BALDWIN, C. T.; HOTH, C. F.; MACINA, R. A.; MILUNSKY, A. "Mutations in *PAX3* that cause Waardenburg syndrome type I: ten new mutations and review of the literature". *Am J Med Genet.* 58:115-22, 1995.

Aquest fet d'expressió única a la retina passa de la mateixa manera amb un gran nombre de gens implicats en altres DHR sense afectació a cap altre òrgan. Tot això dona suport a la implicació de les mutacions trobades al nostre gen i l'aparició de la patologia retinal del nostre estudi.

D'altra banda, els estudis d'immunolocalització han servit per confirmar, mitjançant una altra tècnica, l'expressió de la nostra proteïna a la capa dels fotoreceptors, concretament al segment extern, així com la colocalització de les proteïnes SPAM i rodopsina.

Figura 8. Gel electroforètic amb el resultat de l'amplificació per RT-PCR fent servir primers específics d'EYS, entre els exons 4 (sentit) i 11 (antisentit) en cDNA de diversos teixits i línies cel·lulars. Com a control positiu apareix la banda de 400 pb que correspon a l'amplificació del gen *PGM1*

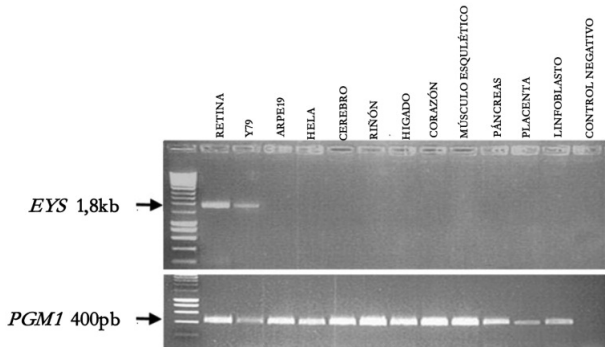
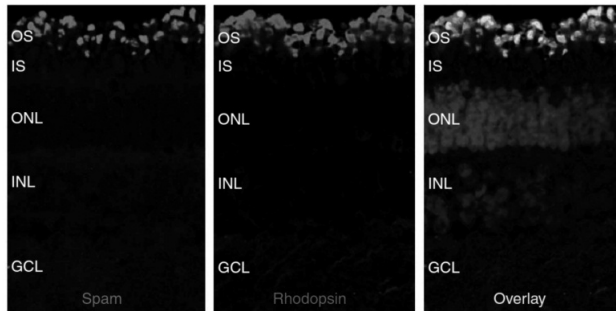


Figura 9. Localització subcel·lular de la proteïna SPAM en la capa de fotoreceptors de la retina de porc fent servir un anticòs contra la SPAM (verd) i un altre contra la rodopsina (vermell). Els dos colocalitzen en el segment extern de la capa de fotoreceptors (groc)



5. Estudi mutacional del gen *EYS* a les famílies lligades al locus *RP25* mitjançant seqüenciació directa

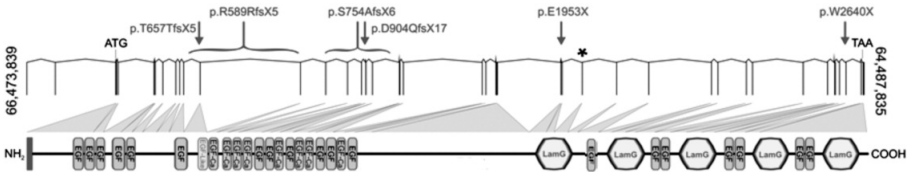
L'estudi mutacional del gen *EYS* a les famílies lligades al locus *RP25* va donar com a resultat la identificació de 4 variants com a possibles causants de la malaltia en 4 de les 12 famílies

incloses a l'estudi (RP214, RP328, RP73, RP349) (taula 1; figura 10).

A més a més, vam utilitzar tècniques per a la cerca de grans delecions o duplicacions, CNV (MLPA- *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), que van confirmar les dos grans delecions ja identificades prèviament mitjançant l'estudi de CGH a les famílies RP5 i RP73, respectivament.

Família	Exó	Canvi nucleotídic	Canvi aminoàcidic	Dominis	Tipus de mutació
RP214	17	c.2710_2726del17	p.D904QfsX17	EGF	Homozigosi
RP5	15-19	c.2260-51191_2992+45990del	p.S754AfsX6	EGF	Homozigosi
RP328	12	c.1971delT	p.T657TfsX5	EGF	Homozigosi
RP73	12	c. 1767-24596_2022+238135del	p.C590YfsX4	EGF	Heterozigosi
	28	c. 5857G>T	p.E1953X	Laminina G	Heterozigosi
RP349	41	c.7919G>A	p.W2640X	EGF	Homozigosi

Taula 1. Mutacions identificades al gen EYS a les famílies lligades al locus RP25



6. Estudi mutacional del gen EYS a les famílies RPAR per seqüenciació directa

Un cop acabat l'estudi de les famílies lligades, vam incloure tota la cohort de famílies RPAR a l'estudi mutacional del gen EYS. Aquest estudi va concloure amb la identificació de 18 variants com a possibles patogèniques a 16 de les 94 famílies incloses a l'estudi (taula 2).

Figura 10. Representació esquemàtica del gen EYS amb la localització de les mutacions identificades a les famílies lligades a l'RP25 incloses al rastreig mutacional

Família	Exó	Posició del canvi	Alteració proteica	Dominis	Tipus de mutació
RP60	12	EYS: c.78-79 insGC	EYS: p.Q27RfsX16	Lloc de tall pel petit senyal	Heterozigosi
	14	PROM1:c.1345G >A	PROM1: p.V449M		
RP81	14	c.2234A>G	p.N745S	EGF	Heterozigosi
RP1237M	14	c.2234A>G	p.N745S	EGF	Heterozigosi
	41	c.7919G>A	p.W2640X	EGF	Heterozigosi
RP367B	26	c.4120C>T	p.R1375X	Hèlix superenrotllada	Heterozigosi
	31	c.6424+1G>T	-	-	Heterozigosi
VRP8	26	c.4450T>C	p.W1484R	Hèlix superenrotllada	Heterozigosi
RP33	26	c.4451G>A	p.W1484X	Hèlix superenrotllada	Heterozigosi
RP84B	29	c.6050G>T	p.G2017V	Laminina G	Homozigosi
RP136B	33	c.6632C>T	p.S2211L	Laminina G	Heterozigosi
	43	c.8834G>A	p.G2945E	EGF	Heterozigosi
RP155B	33	c.6714delT	p.I2239SfsX17	Laminina G	Homozigosi
RP296	36	c.7222A>G	p.T2408A	EGF	Heterozigosi
RP358B	37	c.7361delA	p.H2454PfsX8	Laminina G	Heterozigosi
RP383	38	c.7507G>A	p.E2503K	Laminina G	Heterozigosi
RP461M	43	c.8914 T>A	p.Y2993N	Laminina G	Heterozigosi
RP460	43	c.9059 T>C	p.I3041T	Laminina G	Heterozigosi
RP194B	43	c.9468T>A	p.Y3135X	Laminina G	Homozigosi
RP1052	43	c.9178- 9181delATAA	p.N3061TfsX3	Laminina G	Heterozigosi

Taula 2. Mutacions identificades al gen EYS en la població afectada a l'RPAR. En negreta apareixen els resultats que provoquen un codó d'aturada prematur

7. Anàlisi de grans delecions/duplicacions en la nostra cohort de famílies RPAR mitjançant MLPA

Per trobar grans delecions/duplicacions en l'estudi mutacional d'EYS, vam fer servir la tècnica MLPA, utilitzant el Kit P328-X1. Aquest rastreig va donar com a resultat la identificació de 6 variants com a possibles causants de la malaltia a 6 de les 91 famílies incloses. A més a més, vam confirmar les delecions trobades amb anterioritat mitjançant la tècnica de CGH.

Família	Exó	Posició del canvi	Alteració proteica	Tipus de mutació
<i>RP228F</i>	3-4	c.-332-?_748+?del*	-	Het
	20	c.3003T>A	p.C1001X	Het
<i>RP199B</i>	3-4	c.-332-?_748+?dup*	-	Het
	43	c. c.8834G>A	G2945E	Het
<i>RP618F</i>	4	c.547delT	p.C183AfsX74	Het
	9	c.1300-?_1459+?del**	-	Het
<i>RP73</i>	12	c.1767-24596_2023+238135del	p.C590YfsX4	Het
	28	c.5857G>T	p.Q1953X	Het
<i>RP735F</i>	12	c.1767-?_2023+?del	p.C590YfsX4	Hom
<i>RP228B</i>	13-14	c.2024-?_2259+?del	p.G676EfsX9del	Hom
<i>RP5</i>	15-19	c.2260-51191_2992+45990del	p.S754AfsX6	Hom
<i>RP51</i>	16-19	c.2382-?_2992+?del	p.C795HfsX4	Het
<i>RP360F</i>	26	c.A827_4830delTTCA	p.S1610FfsX7	Het
	33	c.6572-?_6725+?del***	-	Het
<i>RP115F</i>	32-33	c.6572-?_6725+?del	p.D2142AfsX14	Hom

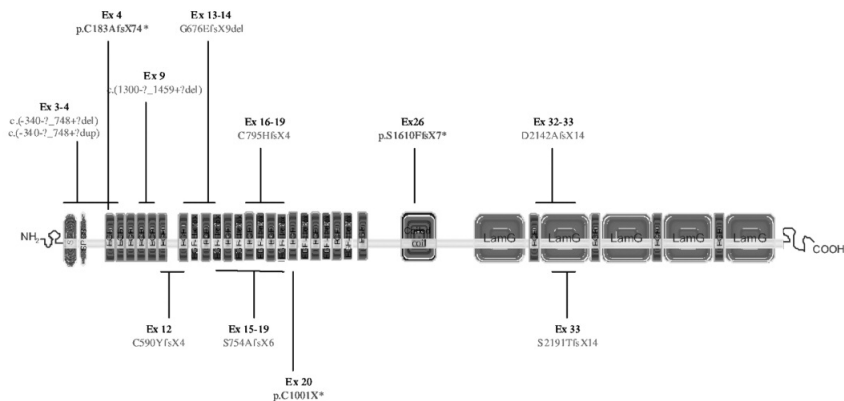
Taula 3. Mutacions identificades en el gen EYS a la població RPAR en l'estudi d'MLPA

* No hi ha sondes per detectar possibles delecions/duplicacions en els exons 5 i 6

** No hi ha sondes per detectar possibles delecions/duplicacions en l'exó 10

*** No hi ha sondes per detectar possibles delecions/duplicacions en l'exó 32

Figura 11. CNV identificats mitjançant MLPA a la nostra cohort



8. Anàlisi de l'estudi de les variants resultants del rastreig mutacional d'EYS

En total hem identificat 117 variants de seqüència, de les quals n'hem considerat 35 com les mutacions causants de DHR a 34 de les 129 famílies d'aquest estudi. De totes aquestes mutacions, nou corresponen a grans delecions

BANDAH-ROZENFELD, D.; LITTINK, K. W.; BEN-YOSEF, T.; STROM, T. M.; CHOWERS, I.; COLLIN, R. W.; DEN HOLLANDER, A. I.; VAN DEN BORN, I.; ZONNEVELD, M. N.; MERIN, S.; BANIN, E.; CREMERS, F. P.; SHARON, D. 2010. "Novel null mutations in the EYS gene are a frequent cause of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Israeli population". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:4387-94, 2010.

BARRAGÁN, I.; ABD EL-AZIZ, M. M.; BORREGO, S.; EL-ASHRY, M. F.; O'DRISCOLL, C.; BHATTACHARYA, S. S.; ANTIÑOLO, G. "Linkage validation of RP25 Using the 10K genechip array and further refinement of the locus by new linked families". *Ann Hum Genet.* 72:454-62, 2008.

BARRAGÁN, I.; BORREGO, S.; ABD EL-AZIZ, M. M.; EL-ASHRY, M. F.; ABU-SAFIEH, L.; BHATTACHARYA, S. S.; ANTIÑOLO, G. "Genetic analysis of FAM46A in Spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa: characterisation of novel VNTRs". *Ann Hum Genet.* 72:26-34, 2008.

BARRAGÁN, I.; MARCOS, I.; BORREGO, S.; ANTIÑOLO G. "Molecular analysis of RIMI in autosomal recessive retinitis pigmentosa". *Ophthalmic Res.* 37: 89-93, 2005.

BARRAGÁN, I.; MARCOS, I.; BORREGO, S.; ANTIÑOLO, G. "Mutation screening of three candidate genes, ELOVL5, SMAP1 and GLULD1 in autosomal recessive retinitis pigmentosa". *Int J Mol Med.* 16:1163-7, 2005.

BARRAGÁN, I.; BORREGO, S.; PIERAS, J. I.; GONZÁLEZ-DEL POZO, M.; SANTOYO, J.; AYUSO, C.; BAIGET, M.; MILLÁN, J. M.; MENA, M.; ABD EL-AZIZ, M. M.; SEITZ, C.; DOPAZO, J.; BHATTACHARYA, S. S.; ANTIÑOLO, G. "Mutation Spectrum of EYS in Spanish Patients with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa". *Hum Mutat.* 31:E1772-800, 2010.

identificades per CGH i MLPA, sis són petites deleccions/insercions, sis corresponen a canvis puntuals sense sentit (*nonsense*), dotze són canvis d'aminòcid, un és un canvi en la regió reguladora i un és un canvi en la regió donadora de l'empalmament (*splicing*).

Cal remarcar que un canvi s'ha considerat patogènic quan compleix tres criteris:

- La segregació del canvi en la família en cas de disposar de mostres familiars.
- L'absència de canvis a la població dels controls (200 controls) i la no-inclusió de la variant a les bases de dades d'SNP existents.
- La possible implicació en l'estructura i/o funció de la proteïna o canvis que puguin alterar fenòmens en la traducció d'aquesta proteïna.

En el cas de les mutacions que generarien un codó d'aturada prematur, es generaria una proteïna més curta i probablement no funcional. El fet que sigui una malaltia autosòmica recessiva, fa menys probable que el fenotip sigui causat per una acumulació i un efecte tòxic de la proteïna truncada sinó, més aviat, l'absència de funció. Aquesta absència pot ser ocasionada perquè la proteïna truncada no pot dur a terme la seva funció, encara que és molt possible que la gran majoria del transcrit sigui eliminat sense arribar a traduir-se mitjançant el procés de **Nonsense-mediated mRNA decay** (NMD) (Frischmeyer et al., 2002).

En el cas de la substitució aminoacídica, seria suficient per alterar la funcionalitat de la proteïna i, per tant, produiria el fenotip RP. Aquest efecte patogènic d'aminòcid ha estat prèviament descrit a mutacions similars d'altres gens implicats en diverses malalties (Baldwin et al., 1995; Alonso et al., 2006) i, més específicament, en gens implicats en l'aparició de casos RPAR (Sun et al., 1997; Molday et al., 2000; Fishman et al., 2003).

En aquests casos, hem trobat una major incidència de les mutacions a la part final de la proteïna (9/12), i hem reforçat la hipòtesi en què plantejarem que la regió c-terminal seria crucial per a la funció d'aquesta proteïna. A més a més, aquesta regió és la més conservada evolutivament i, per tant, és lògic pensar que és molt més sensible a alteracions de seqüència. Finalment, hem fet servir les prediccions bioinformàtiques de

programes com Netphos2.1 o SIFT per predir el grau de "tolerabilitat" d'aquests canvis a la seqüència proteica i el seu impacte en la funció de la proteïna. Aquests programes ajuden a predir si els canvis descrits com a patogènics es correlacionen amb una alta probabilitat d'alterar la funció o l'estructura de la proteïna.

Respecte a l'estudi de CNV, en total s'han descrit tres grans deleccions/duplicacions en tres famílies RPAR de la nostra cohort, així com tres grans deleccions en famílies d'una cohort francesa, portadores d'una mutació truncant en heterozigosi i remeses a la nostra unitat pel grup d'investigació de Christina Zeitz.

Amb aquestes dades vam poder establir una prevalença d'aquest fenomen en un ~4% del total dels casos RPAR. A més, es van identificar tres CNV en heterozigosi com a segon canvi patogènic en les 22 famílies espanyoles i franceses que ja portaven un primer canvi en heterozigosi. D'aquesta manera, podem establir una prevalença del ~15% a les famílies amb un sol canvi identificat per seqüenciació directa i que seria indetectable mitjançant les tècniques estàndard basades en PCR i seqüenciació. Això demostra l'eficàcia i la necessitat de l'ús de tècniques com l'MLPA per trobar mutacions en les famílies RPAR i amb especial interès en les famílies en què només s'ha trobat una mutació patogènica en un dels dos al·lels.

Totes les dades en conjunt d'aquest estudi reflecteixen una prevalença del gen EYS en les famílies afectes a l'RPAR del 15,9% si només tenim en compte els canvis detectats mitjançant PCR i seqüenciació, i un 4% més si afegim els canvis detectats mitjançant MLPA. Per tot això, postulem el gen EYS com el gen més important fins ara en l'aparició de casos RPAR.

9. Estudis en altres poblacions i identificació de mutacions recurrents

Des de la nostra publicació a la revista *Nature Genetics*, l'octubre del 2008, de l'article anomenat "EYS, encoding an ortholog of *Drosophila* spacemaker, is mutated in autosomal recessive retinitis pigmentosa", amb el descobriment del gen EYS i la seva implicació en el fenotip RPAR, altres autors (ja sigui en grups col·laboradors o grups independents), han publicat els seus resultats del rastreig d'aquest gen a les

BELL, S. E.; MAVILA, A.; SALAZAR, R.; BAYLESS, K. J.; KANAGALA, S.; MAXWELL, S. A.; DAVIS, G. E. "Differential gene expression during capillary morphogenesis in 3D collagen matrices: regulated expression of genes involved in basement membrane matrix assembly, cell cycle progression, cellular differentiation and G-protein signaling". *J Cell Sci* 114:2755-2773, 2001.

FISHMAN, G.A.; STONE, E. M.; ELIASON, D. A.; TAYLOR, C. M.; LINDEMAN, M.; DERLACKI, D. J. "ABCA4 gene sequence variations in patients with autosomal recessive cone-rod dystrophy". *Arch Ophthalmol.* 121:851-5, 2003.

FRISCHMEYER, P. A.; VAN HOOF, A.; O'DONNELL, K.; GUERRERIO, A. L.; PARKER, R.; DIETZ, H. C. "An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons". *Science.* 22:2258-2261, 2002.

HAMEL, C. "Retinitis pigmentosa". *Orphanet J Rare Dis.* 1:40, 2006.

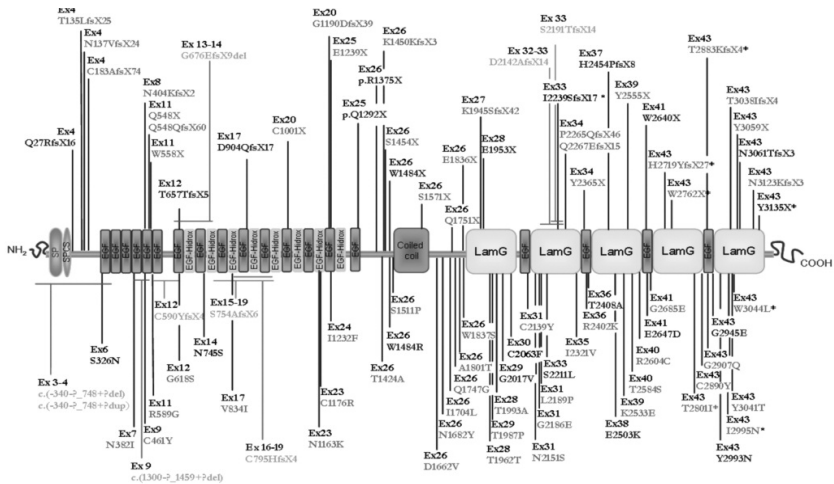
HARTONG, D. T.; BERSON, E. L.; DRYJA, T. P. "Retinitis pigmentosa". *Lancet* 368: 1795-809, 2006.

HUSAIN, N.; PELLIKKA, M.; HONG, H.; KLIMENTOVA, T.; CHOE, K.M.; CLANDININ, T. R.; TEPASS, U. "The agrin/perlecan-related protein eyes shut is essential for epithelial lumen formation in the *Drosophila* retina". *Dev Cell.* 11:483-93, 2006.

JARJANAZI, H.; SAVAS, S.; PABALAN, N.; DENNIS, J. W.; OZCELİK, H. "Biological implications of SNPs in signal peptide domains of human proteins". *Proteins.* 70:394-403, 2008.

KHALIQ, S.; HAMEED, A.; ISMAIL, M.; MEHDI, S. Q.; BESSANT, D. A.; PAYNE, A. M.; BHATTACHARYA, S. S. "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: 571-4, 1999.

Figura 12. Representació esquemàtica de la proteïna SPAM amb la localització de les mutacions identificades. En taronja s'indiquen les deleccions trobades amb MLPA. En verd es descriuen els canvis trobats per altres grups d'investigació a la seva cohort de pacients RPAP. En blau trobem els canvis patològics identificats a la nostra cohort



seves cohorts de pacients afectats de DHR, i han identificat múltiples canvis patològics.

A més a més, el descobriment de vuit canvis truncants, així com set canvis d'aminoàcids classificats com patològics en el gen EYS en dos famílies RP o més en diverses poblacions (espanyola, holandesa, francesa, britànica, israeliana i xinesa), reforça encara més la nostra hipòtesis que l'EYS és el gen de major prevalença en població RPAP (Abd-el Aziz et al.,2008; Collin et al., 2008; Audo et al., 2010; Abd El-Aziz et al., 2010; Littink et al., 2010; Bandah-Rozenfeld et al., 2010).

Conclusions

Els estudis d'RT-PCR i 5'3' Race de la regió delimitada mitjançant CGH han permès la caracterització del gen EYS, format per 43 exons a l'interval entre 64487835-66473839 del cromosoma 6q12, amb una llargària de ~2 Megabases, la qual cosa fa del gen EYS el més gran conegut d'expressió en retina, així com el cinquè gen més gran del cos humà.

Els estudis d'RT-PCR demostren que l'EYS s'expressa de manera exclusiva a la retina. De la mateixa manera, els estudis d'immunohistoquímica han revelat la localització de la seva proteïna SPAM al segment extern de la capa dels fotoreceptors, colocalitzant amb el gen de la rodopsina.

La caracterització estructural mitjançant l'estudi bioinformàtic

de la proteïna SPAM ha revelat un patró concret i molt conservat evolutivament, estructurat en tres regions: una regió N-terminal rica en dominis tipus EGF, un domini central amb una estructura tipus hèlix superenrotllada, i una regió C terminal amb intercalació de dominis tipus EGF i laminina G. La caracterització funcional a través de l'estudi *in silico* dels dominis de la proteïna SPAM, la presència d'un pèptid senyal, i el paper de la proteïna SPAM a la drosòfila, ens permet concloure que la SPAM seria una proteïna secretada pels fotoreceptors que intervé en l'estructura, el manteniment i la morfogènesi retinal.

L'estudi mutacional mitjançant una seqüenciació directa a les onze famílies lligades al locus RP25 ha permès trobar quatre canvis de seqüència a quatre famílies que podrien ser responsables del fenotip.

L'estudi poblacional del gen EYS mitjançant una seqüenciació directa en la nostra cohort ha permès la identificació de diversos canvis a 21 de les 94 famílies com a possibles responsables de l'aparició del fenotip. Aquests canvis inclouen variants que generen un codó d'aturada prematur, delecions, insercions, canvis d'aminoàcid i mutacions a la regió donadora d'empalmament (*splicing*). A la vegada, aquest estudi revela l'alta prevalença del gen EYS a les famílies RPAR espanyoles.

L'estudi poblacional del gen EYS mitjançant l'ús de la tècnica MLPA ha permès la identificació de tres CNV com a possibles canvis patogènics en tres de les 78 famílies RPAR analitzades, i s'ha establert una prevalença d'aquest fenomen en un ~4% del total dels casos RPAR.

L'anàlisi de les famílies espanyoles i franceses on hi havia descrit un canvi patogènic en un sol al·lel mitjançant seqüenciació directa, ha donat com a resultat la troballa de 3 CNV com a segon canvi patogènic en 3 de les 20 famílies analitzades. D'aquesta manera, el ~15% de les famílies portadores d'un canvi patogènic puntual detectat per PCR-seqüenciació en un dels dos al·lells són portadores de grans CNV en l'altre.

La troballa de 68 mutacions en el gen EYS en altres poblacions, reportades per altres grups des del descobriment del gen, reforcen la hipòtesi que EYS és el gen de major prevalença en RPAR amb valors que oscil·len entre el 5% i el 20% del total dels casos RPAR.

LITTIK, K. W.; VAN DEN BORN, L.; KOENEKOOP, R. K.; COLLIN, R. W.; ZONNEVELD, M. N.; BLOKLAND, E. A.; KHAN, H.; THEELEN, T.; HOYNG, C. B.; CREMERS, F. P.; DEN HOLLANDER, A. I.; KLEVERING, B. J. 2010. "Mutations in the EYS Gene Account for Approximately 5% of Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa and Cause a Fairly Homogeneous Phenotype". *Ophthalmology*. 117: 2026-33, 2033-7, 2010.

MASON, J. M.; ARNDT, K. M. "Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications". *ChemBiochem* 5:170-176, 2004.

MOLDAY, L. L.; RABIN, A. R.; MOLDAY, R. S. "ABCR expression in foveal cone photoreceptors and its role in Stargardt macular dystrophy". *Am J Ophthalmol*. 130:689, 2000.

POMARES, E.; MARFANY, G.; BRION, M. J.; CARRACEDO, A.; GONZÁLEZ-DUARTE, R. "Novel high-throughput SNP genotyping cosegregation analysis for genetic diagnosis of autosomal recessive retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis". *Hum Mutat*. 28: 511-6, 2007.

RUIZ, A.; BORREGO, S.; MARCOS, I.; ANTIÑOLO, G. "A major locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa on 6q, determined by homozygosity mapping of chromosomal regions that contain γ -aminobutyric acid-receptor clusters". *Am J Hum Genet*. 62: 1452-1459, 1998.

SUN, H.; NATHANS, J. "Stargardt's ABCR is localized to the disc membrane of retinal rod outer segments". *Nat Genet*. 17:15-16, 1997.

YANG, R. B.; NG CK; WASSERMAN, S. M.; COLMAN, S. D.; SHENOY, S.; MEHRABAN, F.; KOMUVES, L. G.; TOMLINSON, J. E.; TOPPER, J. N. "Identification of a novel family of cell-surface proteins expressed in human vascular endothelium". *J Biol Chem*. 277:46364-46373, 2002.