

Gradu Amaierako Lana
Biokimika eta Biologia Molekularra Gradua

**Erretinako distrofia heredagarrien mutazioetarako
etekin handiko baheketa, Axiom Exome
genotipatze mikrotxipetan oinarrituta.**

Egilea:
Garazi Egiguren Urkola
Zuzendaria:
Javier Ruiz Ederra

- Laburpena 1
- Hitz gakoak 1
- Sarrera eta helburuak 1
- Material eta metodoak:
 - Azterketako partaideak 3
 - Axiom Exome mikrotxipak 3
 - Datu-filtraketan analisia 4
 - Adierazgarriak diren aldaeren identifikazioa eta hauen balio patogenikoa ... 7
 - Zuzeneko sekuentziazioa 8
- Emaitzak 9
- Eztatbaida eta ondorioak 11
- Etorkizunari begira 13
- Bibliografia 14

Laburpena:

Axiom Exome DNA Genotipatze mikrotxipetan oinarriturik, etekin handiko baheketa (screening) genetikoa garatu da Excel bidez eginiko filtraketez baliatuta. Modu honetan, erretinako distrofia heredagarriak (EDH) modu eraginkorren diagnostikatzea lortu nahi da. Ikerketa honetan, 55 familia ezberdinetakoak diren 80 EDHdun gaixok eta hauen 108 senitarteko osasuntsuk hartu dute parte. Guztira 188 norbanakoen odol periferikoa bildu eta hauen DNA laginak aztertu dira bi Axiom Exome Genotipatze Mikrotxip erabilita. Mikrotxip honen bidez, erretinako distrofietan zuzeneko eragina duten 181 generi dagozkien 5.044 aldaera aztertu dira. Hauetatik 82 genek Erretinosi Pigmentarioa (EP) izeneko gaixotasuna eragiten dute (sindromikoa edo ez-sindromikoa). Excelen oinarrituriko baheketa estrategia garatuz, gure populazioan EDHak eragiten dituzten aldaerak aurkitzea izan da xedea. Ondoren, aurkikuntza horretan lorturiko aldaera genetikoak, zuzeneko Sanger sekuentziazio bidez egiaztatu dira. Ikerketa honetan lorturiko emaitza nagusia, gaixotasunen eragile diren aldaera genetikoak identifikatzea izan da. Guztira 8 aldaera genetiko aurkitu dira, erretinako gaixotasuna eragiten duten 8 geneetan. 12 familiatako 15 gaixo eta 12 eramailetan aurkitu dira aldaera genetiko hauek. Ondorio modura, DNA genotipatze mikrotxip hauetatik lortzen den datu pila guztitik, biologikoki garrantzitsua den informazioa soilik eskuratu eta identifikatzeko aukera dagoela ikusi da, ikerketa honi esker garatu den Excel bidezko baheketa estrategia erabilita. Beraz, garaturiko Excel bidezko baheketa estrategiak aukera ematen du, EDH heterogeneo hauen karakterizazio molekularra modu eraginkorren gauzatzeko. Erretinarako berariazkoak diren APEX mikrotxipen kostuarekin alderatuta eginiko analisisien kostua 1/5 izatera jaisten da. Honek klinikoki garrantzia handia du, izan ere, ahalik eta gaixo gehien diagnostikatzeko aukera ematen du.

Hitz Gakoak:

Erretinako distrofia heredagarriak (EDH), diagnostiko molekularra, mutazioa, Erretinosi Pigmentarioa (EP), Axiom Exome Mikrotxipak, Affymetrix.

Sarrera eta Helburuak:

Erretinako distrofia heredagarriak (EDH) izeneko ikusmen gaixotasunak, gene jakinetan gertatzen diren hainbat mutazioren eraginez sortzen dira. Mutazio hauen eraginez ftohartzaileen heriotza (makil edota konoena) gertatzen da eta honen ondorioz ikusmen arazoak sortzen dira. Kasu gehienetan, gaixotasun hauen garapena eta larritasuna genetikoki baldintzatuak daude, gaixotasunaren herentzia motak eragina duelarik¹⁻³. Ikerketek erakutsi dutenez, gaixotasun hauek monogenikoak izaten dira normalean. Honen adierazgarri da, EDHen artean ohikoena den Erretinosi Pigmentarioa (EP) gaixotasuna, izan ere, ikusi da 82 gene inguru daudela gaixotasun honen eragile izan daitezkeenak. Erronka handia da EDHen molekula mailako karakterizazioa

egitea^{4,5}, izan ere, gene eta aldaeren kopurua handia izateaz gain, beste faktore askok ere eragina dute gaixotasun hauetan; hala nola, ez-kanonikoak diren patroik Mendeliarrek^{1,3,4}.

“Hurrengo belaunaldiko sekuentziazio” (HBS) tekniken garapenak (Next generation sequencing), gorakada nabarmena eragin du sekuentziazio ahalmenean. Garapen hau baliagarria suertatu da gaixotasun genetiko konplexuen molekula mailako karakterizazioan³. Hain zuzen ere, berriki, erretinako distrofiaren diagnostiko molekularra modu eraginkorrean egin ahal izan da “Exoma osoaren sekuentziazioa” baimentzen duten HBS teknika hauei esker⁶⁻⁸. Alabaina, teknika hauen erabilera klinikoa gora doan heinean, lorturiko emaitzen eta datuen interpretazioaren inguruko zalantzak ere handituz doaz⁹. Honetaz gain, teknika hauen erabilera aukera garestia izan ohi da orain arte lortu nahi izan diren diagnosi helburuetarako. HBS tekniken beste eragozpenetako bat, sortzen duten informazio kopuru altua litzateke; izan ere, denbora asko eskaini behar izateaz gain, beharrezkoa gertatzen da teknika espezializatu eta bioinformatikaren erabilera. Hau dela eta, lan honetan proposatzen denaren moduko lehen mailako baheketa genetikoak, HBS tekniken bidez aztertu beharreko lagin kopurua murrizten lagunduko luke, genoma edo exoma osoa sekuentziatu behar deneko azterketetan.

Giza exoma sekuentziatzeko ekimenek (Exome Chip Design Consortium, NHLBI Exome proiektuak edo 1.000 Genomes proiektuak) exoma/genoma sekuentziazioez baliatzen dira, maiztasun baxukoak eta arraroak diren aldaerak aurkitzeko (Aleloaren maiztasuna gehien jota 0.05 denean, maiztasun baxuko aleloa kontsideratzen da (MAF: minor allele frequency)^{10,11}. Garatu den hipotesiaren arabera, arraroak diren aldaera hauetariko batzuk, baliagarriak izan daitezke aztergai ditugun EDH kasu hauek azaltzeko^{12,13}. Jarduera hauei esker lorturiko zehaztapenez baliaturik garatu dira mikrotxipak. Hainbat patologia eragin ditzaketen aldaerak hauteman daitezke mikrotxip hauei esker. Lan honetan erabilitako mikrotxipak (Axiom Exome Mikrotxipak, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) 300.000 aldaera genetiko aztertzen ditu aldi berean, kodetze ez-baliokideak (non-synonymous coding), moztitsasketa lekuak, amaiera kodoiak eta intsertzio/delezio txikiak barne (1-140 base pare artean). Jakina da hauetatik 5.044 aldaera EDHein erlazionatutako geneetan kokaturik daudela.

Dagoeneko eskuragarri dago merkatuan EDHen diagnosirako tresna, zehazki, “Arrayed Primer Extension-base” APEX genotipatze mikrotxipa (Asper Biotech, Tartu, Estonia)^{14,15}. Alabaina, mikrotxip hauek, aldaera genetiko kopuru mugatua aztertzen dute (200-1.000 aldaera inguru). Hau gutxi balitz, gune kodetzaileak soilik hartzen dituzte kontuan analisi hauek egiterakoan, kodetzaileak ez diren guneak baztertuta. Bestalde, mikrotxip hauetan egiten diren analisiak multzokatuta egin behar izaten dira, pairatzen duten erretinako gaixotasun motaren edo herentzia patroik berdina duten geneen arabera (adb. 414 aldaera dituzte EP autosomiko dominantetarako mikrotxipek, 16 geneetakoak; 594 aldaera dituzte EP autosomiko errezesiboetarako mikrotxipek 19

geneetakoak; bestetik, berariazkoak diren mikrotxipak daude kono-makil distrofien dianostikorako). Hau dela eta, mikrotxip mota bat baino gehiago erabili behar izaten da bai diagnostiko kliniko zehatzik ez duten gaixoetan, bai fenotipo mota ezberdinen gainjarpena dutenetan eta baita aldakortasuna duten gaixoetan ere. Bistakoa denez, honek izugarri emendatzen du diagnostikoaren kostua eta ondorioz, gaixo askorentzat diagnostikoa ez da eskuragarri izaten.

APEX mikrotxipekin alderatuz gero, abantaila anitz aurki daitezke lan honetan erabilitako mikrotxipetan (Axiom Exome array plates, Affymetrix): 1). Kostua: gure lanean erabilitako mikrotxipak 5 aldiz merkeagoak dira APEX mikrotxipak baino; 2). Erretinako distrofiakin zerikusia duten gene ezagun guztiak aztertzen dituzte (181 gene); 3). Ez dira mugatzen kodetzaileak diren geneetara; zenbait aldaera ere aztertzen dira kodeatzaileak ez diren zenbait gene erregulatzaileretan. 4). 96 lagin ezberdin genotipatzea baimentzen du une berean eginiko irakurketa bati esker (95 lagin eta kontrol bat).

Lan honen helburu nagusia, Axiom Exome mikrotxip hauen diagnostikoetarako erabilgarritasuna balioztatzea da. EDH gaixoen kopurua altua deneko azterketetan, lehen mailako baheketa gisa erabiltzeko baliaigarriak diren jakin nahi da, azpimarragarria den kostu-eraginkortasuna kontuan hartuta.

Material eta Metodoak:

Azterketako Partaideak:

Azterketa honetan, EDH pairatzen duten gaixoak Donostiako Ospitalean diagnostikatu dira. Honako irizpide hauetan oinarritu da diagnostikoa: gaueko itsutasuna, ikusmen galera periferikoa, erretinako odol-hodien murrizpena eta elektrotinogramako uhinen anplitude-galera¹⁶. 55 familia ezberdini dagozkien 188 lagin aztertu dira guztira. Horietatik 80k pairatzen dute EHD; beste 108k ez dute inolako gaixotasunik pairatzen, hots, gaixorik ez dauden senitartekoak dira. Gaixoen diagnostiko kliniko hauek izan dituzte: autosomiko errezesiboa den EPa; autosomiko dominantea den EPa eta X kromosomari loturiko EPa. 80 gaixoetatik 3 “Bardet-Biedl sindromearekin” (BBS) diagnostikatu ziren eta hauetatik 2 gaixo, aurrez HRM (High resolution melting) analisi metodoarekin genetikoki karakterizatuta zeudenez, kontrol positibo moduan erabili dira¹⁷.

Giza Laginen Bilketa:

Hasteko, odol laginak eskuratu dira EDH pairatzen duten gaixo eta beren senitartekoengandik. Horretarako, partaide guztien adostasun informatua lortu da. Bestalde, ikerketa hau etika-batzorde batek onartu du, Helsinkiko adierazpenetan oinarrituta. Ondoren, eskuraturiko laginetatik DNA erauzi eta isolatu da “AutoGen Flex Star” (AutoGen, Holliston, MA) eta “Flexigen” (Qiagen, Hilden, Germany) DNA “kit”-ei esker. Jarraian, DNA kontzentrazioak kuantifikatu dira Nanodrop

espektrofotometro bidez (ND-1000, Thermo Scientific NanoDrop Product, Wilmington, DE, 1USA). Azkenik, DNA lagin hauek, -80°C-an gorde dira, behar bezala mantendu daitezzen behar denerako.

Axiom Exome (Affymetrix) Mikrotxipak:

Axiom Exome mikrotxipen plakek, berdina diren 96 mikrotxip dituzte beren baitan. Mikrotxip hauetan funtzionalki ezohikoak diren aldaera ugari azter daitezke: SNPak, intsertzioak, delezioak, etb. Mikrotxip hauen eduki genomikoa giza exomaren 16 sekuentziario inizatibetatik lortu da, sekuentziario hauen emaitzetan lorturiko aldaera berrietan oinarriturik: Exome Chip Design Consortium, the NHLBI Exome Project, the Genetics of Type 2 Diabetes program (GoT2D), the 1.000 Genomes Project, the Cancer Genome Atlas Project, the Sardinia exome study, the Autism Exome Sequencing Study, the UK10K project.

Guztira 188 lagin aztertu dira 2 plaka erabilita. Mikrotxip bakoitzean 95 lagin eta kontrol bat aztertu dira, erabilitako kontrola bi txipetan berdina izanik. Datu gordinen hasierako analisi eta kalitateko kontrolen azterketak ere egin dira "Genotyping Console" softwarea erabilita (Santiagon, 4.1.4. (Affymetrix)).

Mikrotxip hauen bidez, kontsultara etorritako gaixo eta bere senitartekoetan, gaixotasunaren eragile izan daitezkeen aldaerak bilatu dira. Esan bezala, nahiz eta mikrotxip hauek aldaera asko detekta ditzaketen (300.000), EDHrekin zerikusia dutenak soilik hartu dira kontuan (5.044).

Datu-Filtraketan Analisia:

Datuak filtratzeko estrategia bat garatu da Microsoft Excelen bidez. Gure populazioan gaixotasunen erantzule izan daitezkeen aldaerak identifikatu ahal izateko erabili da estrategia hau. Filtraketa egiteko jarraitu den lan fluxuaren diagrama laburtua adierazten da **1. eta 2. irudietan**, aztertu diren familietako bat adibide gisa erabilita. Lehenik eta behin, mikrotxipean dauden 300.000 aldaera genetiko guztietatik, EDHekin zerikusia duten 181 generi dagozkien 5.044 aldaera identifikatu eta hautatu dira. Retnet izeneko datu basea erabili da EDHak eragiten dituzten geneak hautatu eta beren herentzia patroia zehaztu ahal izateko (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>).

Lagin bakoitzerako *Forced Forward Strand Base Calls (FBC)* zutabea hautatu da, genotipatzeko kontsolatik (4.1.4. Affymetrix) lortutako datuak erabilita (**1.A. Irudia**). Segidan, *FBC* balioak familiaka sailkatu dira (*Family Base Calls*) (**1.B. Irudia**): probandoa (P) eta bere senitartekoak segidan jarriz (adb: anaia (B), gurasoak (F/M) edo ahaideak (R)). Apropos hautatu dira *FBC* balioak nahiz eta faltsu positiboaren kopurua emendatzen duten. Izan ere, modu honetan, datuen galera ahal den heinean murriztu nahi izan da, metodoaren sentsibilitatea handitzeko helburuarekin. Ondoren, lorturiko emaitza guztiak egiaztatzerakoan, faltsu positiboak hauteman eta baztertu egiten dira zuzeneko Sanger sekuentziario bidez.

A Base calls

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Probe Set ID	Call Codes	p	FC Codes	Log Ratio	Strength	Base Calls	FBC
2	AX-11088783	AA	0	AA	3.475	9.958	AA	AA
3	AX-11090310	BB	0	BB	-1.775	9.697	GG	GG
4	AX-11091845	BB	0	BB	-1.165	9.196	GG	GG
5	AX-11098882	AA	0	AA	2.675	10.372	AA	AA

B Family base calls

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Probe Set ID	P	B	R1	M	F	R2	R3
2	AX-11088783	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AG
3	AX-11090310	GG	GG	GG	GG	GG	GG	AG
4	AX-11091845	GG	AG	AG	AA	AG	AG	GG
5	AX-11098882	AA	AG	AG	AG	AA	AA	AA

1. Irudia: Datuak filtratzeko lan fluxua 12. familia adibidetzat hartuta:

Analisi prozesua, erretinako gaixotasunen eragile diren 181 gene ezberdinetako 5.044 aldaerekin hasten da. Lagin bakoitzerako *Forced Forward Strand Base Calls (FBC)* zutabea hautatu da.

Norbanakoek, aldaera bakoitzerako zein zigositate duten jakin nahi da, ondorengo filtraketa parametro horren arabera egin ahal izateko (zigositatea: WT, HET, HOM). Horretarako, Excel lan-orri bat diseinatu da (*Reference Zygosity Template*) (2.A. Irudia - lauki gorria) eta bertan bi zutabe gehitu dira: bat aldaera bakoitzeko maiztasun altueneko aleloentzat eta bestea maiztasun baxueneko aleloentzat (A1 eta A2). Aurrez, alelo bakoitzaren maiztasuna kalkulatzeko, 188 parte-hartzaileek zein aldaera dituzten hartu da kontuan. Segidan, lau zutabe berri sortu dira A1 eta A2 balioen konbinazio posible guztietan oinarrituta (WT; H1; H2 eta HO zutabeak). WT (wild-type; adb AA) maiztasun altueneko 2 aleloen presentziari dagokio; H1 eta H2 (heterozigoto 1 eta 2; adb AG edo GA) maiztasun altueneko alelo bat eta maiztasun baxueneko alelo bat izatearen presentziei dagokie; eta HO berriz (homozigotoa; adb GG), maiztasun baxueneko 2 aleloen presentziari.

Segidan, "Erreferentziazko Zigositate" (*Reference Zygosity*) zutabetako balioak, "Senitartekoen" (*Family Base Calls*) zutabeetako balioekin alderatu dira. Modu honetan, aldaera bakoitzerako, norbanako bakoitzaren zigositatea zein den jakin ahal izan da (*Zygosity columns*).

"Erreferentziazko Zigositate" (*Reference Zygosity*) eta "Senitartekoen" (*Family Base Calls*) zutabeak konparatzeko formula berezi bat erabili da. Formula hau berariaz sortu da, konparaketak modu automatizatuan gauzatzeko. Aldaera genetiko bakoitzak izan ditzakeen alelo-konbinazio posible guztiak aztertzen dira formula hau erabilita eta norbanakoek aldaera bakoitzerako duten zigositatea zehazten da modu azkarrean.

=IF((S=\$W);"WT";IF((S=\$H1);"HET";IF((S=\$H2);"HET";IF((S=\$H3);"HOM";" "))))

Formulan adierazten den WT (wild-type; adb. AA) maiztasun altueneko bi aleloen presentziari dagokio; HET1 (heterozigotoa, adb. AG) maiztasun altueneko alelo eta maiztasun baxueneko aleloaren presentziari; HET2 (heterozigotoa, adb. GA) maiztasun baxueneko alelo eta maiztasun

altueneko aleloaren presentziari; HOM (homozigotoa, adb. GG), maiztasun baxueneko bi aleloen presentziari; S intereseko laginak duen balioari eta W, H1, H2 eta H3, wild type, heterozigoto1, heterozigoto2 eta genotipo homozigotoei dagokie hurrenez hurren.

Oftalmologoarekin izandako elkarlanari esker, familiaz familia gaixo eta senitartekoak aztertu dira. Kasu bakoitzean pairatzen duten gaixotasunaren herentzia patroia zehaztu eta pedigriak osatu dira (errezesiboa, dominantea, X kromosomari lotua). Honela, senitarteko bakoitzarentzat aurrez zehazturiko zigositate balioak filtratu dira (Zygosity columns; **2.A. Irudia, eskuma**) herentzia patroia araberaren arabera. (Adb. familia baten gaixotasunak herentzia dominantea jarraitzen badu, pedigriaren zehazturikoaren arabera, gaixotasunarekin batera segregatzen diren geneen artetik, dominanteak diren geneak soilik hartuko dira kontuan eta errezesiboak diren gene guztiak baztertu egingo dira).

Honi jarraiki, gaixotasunarekin batera segregatzen diren aldaera genetikoaren hautaketa egin da. (Adb. Gaixotasun dominante batean, gaixoa denak ezin du WT izan; Kontrol osasuntsuek WT izan behar dute). Bestalde, familia bakoitzean osasuntsuak diren norbanakoekin batera segregatzen diren aldaerak hautaketatik kanpo utzi dira. (Adb. Gaixotasunak herentzia autosomiko errezesiboa jarraitzen badu, osasuntsuak diren norbanakoetan homozigoto moduan agertzen diren aldaerak baztertu egin dira). Modu honetan, baztertu egin dira segregazio logikoarekin bat ez datozen balizko gene eragileak (**2. B. Irudia**). Esporadikoak izan edota herentzia patroia zehaztu ezin izan den kasuetan, 3 filtro mota erabili dira: autosomiko errezesiboa, autosomiko dominantea eta X kromosomari loturikoa. Bestalde, 30 pertsona osasuntsuren laginak ere erabili dira erreferentzia kontrol gisa filtraketa hauek egiterako garaian eta honi esker hautemandako aldaerak egiaztatzeaz gain, senitarteko gutxi edo senitartekorik ez zuten gaixoen emaitzak ere fidagarriagoak izatea lortu da.

A Filtratu gabeko aldaerak

`=IF((Q6=$F6),"WT",IF((Q6=$G6),"HET",IF((Q6=$H6),"HET",IF((Q6=$I6),"HOM",,""))))`

				REFERENCE ZYGOSITY						FAMILY BASE CALLS						ZYGOSITY							
				A1	A2	WT	H1	H2	H3	P	B	R1	M	F	R2	R3	P	B	R1	M	F	R2	R3
2			##%genome-version-ncbi=37																				
3			##%genome-version-ucsc=hg19																				
4			##Axiom_Exome_1A.na32.annot.db																				
5	GENE	Inher.	Probe Set ID	A1	A2	WT	H1	H2	H3	A	A	A	NA	NA	NA	NA	A	A	A	NA	NA	NA	NA
6	GPR98	ar	AX-11088783	A	G	AA	AG	GA	GG	AA	AA	AG	AA	AA	AA	AA	WT	HET	WT	WT	WT	WT	WT
7	PEX2	ar	AX-11091845	G	A	GG	GA	AG	AA	GG	AG	GG	AG	AA	AG	AG	WT	HET	WT	HET	HOM	HET	HET
8	ALMS1	ar	AX-11098882	A	G	AA	AG	GA	GG	AA	AG	AA	AG	AG	AA	AA	WT	HET	WT	HET	HET	WT	WT
9	RPGRI1	ar	AX-11105632	C	A	CC	CA	AC	AA	CC	CC	AA	CC	CC	AC	CC	WT	WT	HOM	WT	WT	HET	WT
10	ADAM9	ar	AX-11106934	C	T	CC	CT	TC	TT	TC	TC	TT	CC	TT	TC	TT	HET	HET	HOM	WT	HOM	HET	HOM
5045	RHO	ad/ar	AX-83235320	A	G	AA	AG	GA	GG	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
5046	CDH23	ar	AX-83236679	T	-	TT	T-	-T	-	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
5047	SAG	ar	AX-83236744	G	A	GG	GA	AG	AA	AG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	HET	WT	WT	WT	WT	WT	WT
5048	ABCA4	ar	AX-83236797	C	T	CC	CT	TC	TT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
5049	BBS12	ar	AX-83236838	C	T	CC	CT	TC	TT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
5050																							

B Filtratutako aldaerak

			REFERENCE ZYGOSITY						FAMILY BASE CALLS						ZYGOSITY							
			A1	A2	WT	H1	H2	HC	P	B	R1	M	F	R2	R3	P	B	R1	M	F	R2	R3
6	EYS	ar- AX-11194988	G	A	GG	GA	AG	AA	AA	AA	AA	AG	AG	AG	GG	HOM	HOM	HOM	HET	HET	HET	WT
7	EYS	ar AX-15415882	T	A	TT	TA	AT	AA	AA	AA	AA	AT	AT	TT	TT	HOM	HOM	HOM	HET	HET	WT	WT
8	EYS	ar- AX-15416113	A	G	AA	AG	GA	GG	GG	GG	GG	AG	AG	AA	AG	HOM	HOM	HOM	HET	HET	WT	HET
9	EYS	ar- AX-15419847	T	G	TT	TG	GT	GG	GG	GG	GG	TG	TG	TT	TT	HOM	HOM	HOM	HET	HET	WT	WT
10	EYS	ar- AX-15419849	A	G	AA	AG	GA	GG	GG	GG	GG	AG	AG	AA	AA	HOM	HOM	HOM	HET	HET	WT	WT
11	EYS	ar- AX-15420705	G	A	GG	GA	AG	AA	AA	AA	AA	AG	AG	AG	GG	HOM	HOM	HOM	HET	HET	HET	WT

2. Irudia: Datuak filtratzeko lan fluxua 12. familia adibidetzat hartuta:

Formula logiko bat erabilia, erreferentziako zigositare balioak (adb: AA; AG; GA eta GG, karratu urdina; gorria; berdea eta laranja), “family base call” datuekin konparatu dira (adb. karratu urdin argia AA), lagin bakoitzeko zigositare finkatuz.

Adibide honetan, hasierako aldaera kopurua 1.000 aldiz murriztea lortu da (5.044tik 6ra) egindako filtraketei esker: 1). Gaixotasunaren herentzia patrioarekin bat datorren geneko aldaera izatea (herentzia errezesiboa bada, aldaera horri dagokion geneak errezesiboa izan behar du); 2). Segregazio logikoa jarraitzea; 3). Aldaera patogenikoa ala patogeniko izateko probabilitate handia izatea; 4). Gaixoaren fenotipoarekin bat datorren genea izatea. Adibide honetan, “tatxatutako” aukerak ez dute aurrez azaldutako irizpideren bat betetzen, horregatik ezabatu dira aukera posibleetatik.

Adierazgarriak diren Aldaeren Identifikazioa eta hauen Balio Patogenikoa:

Aurrez hautemandako aldaera guztien artetik, gaixotasunaren eragile izan daitezkeen eta fenotipokoki koherenteak diren aldaerak hautatu dira. Hautaketa honako irizpideak jarraituz egin da¹⁸: 1). Argitalpenetan “patogeniko” moduan azaltzen diren aldaerak; 2). Zentzu gabeko mutazioak (non-sense mutation), irakurtarau-aldaketa eragiten dutenak edota moztitsasketa gunekoak diren aldaerak; 3). 0.05en azpiko MAF balioa duten aldaerak; 4). Patogeniko izateko probabilitate handia duten aldaerak (patogenizitate maila neurtzeko, web bidezko baliabide hauek erabili dira: Ensembl, NCBI, Exome Sequencing Project (ESP) eta SNP nexus (SIFT<0,05 eta Polyphen2>0,750)); 5). Hautaturiko genearen herentzia patrioarekin bat datozen aldaerak eta 6). Paziente bakoitzaren ezagutza klinikoarekin koherentzia mantentzen duten aldaerak.

Zuzeneko Sekuentziak:

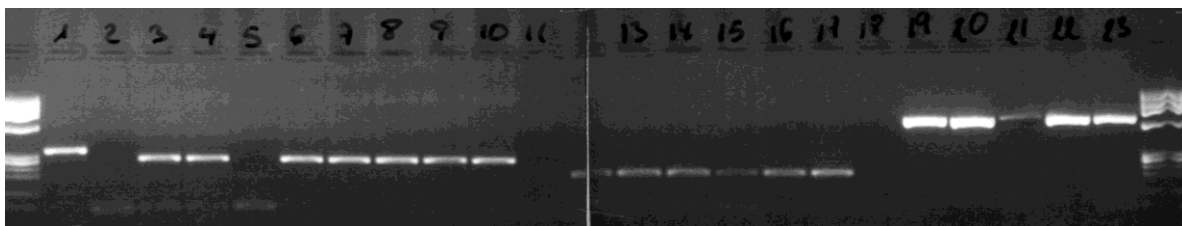
Honen ostean, Axiom Exome mikrotxipetan hautemandako aldaera genetikoek gaixotasunarekiko duten lotura egiaztatu da zuzeneko Sanger sekuentziak bidez. Horretarako, “16-capillary ABI 313xl” plataforma erabili da (Applied Biosystems).

Egiaztapen prozesu hau aurrera eramateko behar diren hasleak egin ahal izateko, hautemandako aldaeren kokapenak zehaztu dira Ensemble gene sekuentzien data basea erabilia (<http://www.ensembl.org>). Kontuan izan da, erabili den sekuentziatzaile kapilarraren muga 500bp ingurukoa dela. Beraz, 500bp-tik gorako zatiak sekuentziatu nahi izan direnetan, 2 hasleak erabili behar izan dira sekuentziatzerako orduan (forward eta reverse), bakoitzarekin sekuentzia zati bat irakurri eta bien artean sekuentzia guztiz osatu ahal izateko.

Ikerketa hau aurrera eramateko behar izan diren hasleak, Primer Express 3.0 softwarea erabilia diseinatu dira (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), hauteman diren aldaerak amplifikatu eta aztertu ahal izateko. Hasleak diseinatu ondoren, espezifikotasuna ebaluatzeko, “NCBI e-PCR” softwarea erabili da, intereseko guneko genomikoa soilik amplifikatuko dela ziurtatzeko (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/e-pcr>). Bestalde, “end-point PCRa” ere egin da, eraginkortasuna eta hasle dimeroen existentzia posiblea aztertzeko. Bete behar hauek betetzen ez zituzten hasleak birdiseinatu egin dira, harik eta hauen funtzionaltasuna hobetzea lortu den arte.

Hasle egokiak diseinatu ostean, hautemandako aldaerak agertzen direneko gene sekuentzia zatiak PCR bidez amplifikatu dira intereseko laginetan.

Agarosan eginiko elektroforesi bidez, intereseko aplikoi tamaina lortu dela behatu da. Gainera, lagina kutsatu ez dela ikusteko, kontrol negatiboak erabili dira.

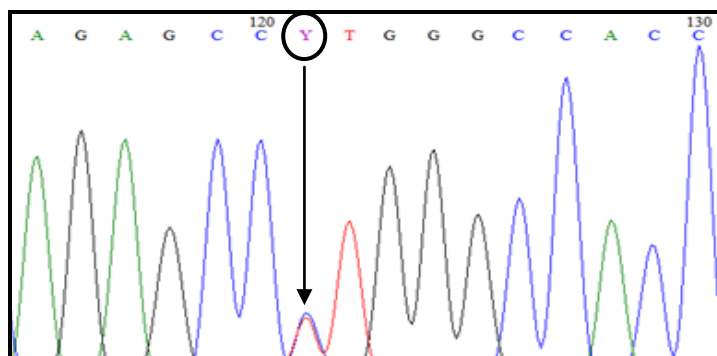


3. Irudia: PCR bidez amplifikatutako lagin batzuen elektroforesia agarosazko gelean:

1. kalem (126. gaixoa): RIMS1 geneko aldaera dagoen 337 bp-ko aplikioia.
2. kalea, 5.a, 11.a eta 18.a: kontrol negatiboak (hasle dimeroen bandak azpian).
3. kalem (9. gaixoa), 4.ean (10. gaixoaren aita), 6.ean (12. gaixoa), 7.ean (19. gaixoa), 8.ean (22. gaixoa), 9.ean (77. gaixoa), 10.ean (91. gaixoa): RDH12 geneko aldaera dagoen 278 bp-ko aplikioia.
12. kalem (13. gaixoa), 13.ean (21. gaixoaren 2.alaba), 14.ean (92. gaixoaren alaba), 15.ean (55. gaixoa), 16.ean (96. gaixoa), 17.ean (96. gaixoaren semea): CNG1 geneko aldaera dagoen 197 bp-ko aplikioia.
19. kalem (14. gaixoa), 20.ean (19. gaixoa), 21.ean (19. gaixoaren semea), 22.ean (27. gaixoaren 2. semea), 23. ean (27. gaixoaren 3. semea): EYS geneko aldaera dagoen 661 bp-ko aplikioia.

Aldi bakoitzean lorturiko aplikoiak, intentsitate egokia dutela ikusi ostean, behar bezala sekuentziatu ahal izateko, Exosap “kit”-a erabiliz purifikatu dira.

Esan bezala, Axiom Exome mikrotxipekin lortutako emaitzak zuzeneko Sanger sekuentziazio bidez egiaztatu dira “16-capillary ABI 313xl” plataforma erabilia (Applied Biosystems). Sangerrek emandako elektroferograman, Axiom Exome mikrotxipetan ikusitako aldaera bilatu da, mikrotxipetan lortutako emaitzak egiaztatu ahal izateko. (Elektroferogramak ikusteko programa: Bio Edit Sequence Alignment Editor //ABI Chromatogram).



4. Irudia: Elektroferograma: 48. gaixoaren Sanger sekuentzazio emaitza:

NR2E3 geneko 6. exoian, 121. posizioan C→T aldaketa du heterozigosian. Aztergai dugun Axiom Exome mikrotxiparen bidez lortutako emaitza egiaztatu da.

Beraz, zuzeneko Sanger sekuentziazioz lorturiko emaitzak aztertuta, aurrez Axiom Exome mikrotxiparen bidez lorturiko emaitzak egiaztatu edo baliogabetu dira. Esaterako, Axiom Exome mikrotxiparen bidez paziente gaixo bat, aldaera batekiko heterozigotoa dela eta Sangerren bidez aldaera horrekiko WT dela ikusi bada, aldaera hori baliogabetu egin da, ez da kontsideratu gaixotasunaren eragile.

Gauzak horrela, erabilitako metodoarekin zenbait paziente, gaixotasun eragile den aldaera hauteman gabe geratu dira. Kasu hauetan, gaixotasunaren eragile diren aldaerak hautemateko, egun, beste metodo batzuk erabiltzen ari dira (Illumina, Ion Torrent, HRM, MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification...)).

Emaitzak:

Guztira 7 aldaera genetiko hauteman dira bi Axiom Exome mikrotxip erabilita. Aldaera hauek patogeniko moduan sailkatuta zeuden edota patogenikoak izateko probabilitate handia erakutsi dute. Erretinako gaixotasunei loturiko geneetan aurkitu diren aldaera hauek, 14 gaixo eta 11 eramailetan hauteman dira. Guztira, 11 familia kalteturi dagozkie emaitza hauek.

Gaixotasunaren eragile gisa identifikatu diren aldaera genetiko hauen laburpena **1. Taulan** ageri da.

Gaixoa	Genea	Diagnostikoa	Aldaketa	Id	Herentzia	Zigositatea	MAF	Iragarpena	Erreferentzia
23, 31	AIP1	Cone-rod/LCA	p.Arg324Leu	rs150427474	ad/ar	Het	0,01	Probably damaging	HGVS; ESP
4, 4B, 46	BBS1	BBS	p.Met390Arg	rs113624356	ar	Hom	<0,01	Pathogenic	25
49	C8orf37	RP/Cone-rod	p.Pro19Ala	rs36096184	ar	Hom	0,03	Regulatory region variant	1000 Gen; ESP
32, 73	CERKL	RP/Cone-rod	p.Arg257*	rs121909398	ar	Hom	<0,01	Pathogenic	23, 24
12, 12B, 12R, 63, 87	EYS	RP	p.Ser2556Cys	rs66462731	ar	Hom	0,11	Probably damaging	1000 Gen; ESP
73	GNAT2	Other retinopathy	p.Leu107Ile	rs3738766	ar	Hom	0,05	Probably damaging	1000 Gen; ESP
61	USH2A	Usher syndrome	p.Cys759Phe	rs80338902	ar	Hom	<0,01	Pathogenic	21, 22

1. Taula: Aurkikuntza genetiko esanguratsuak:

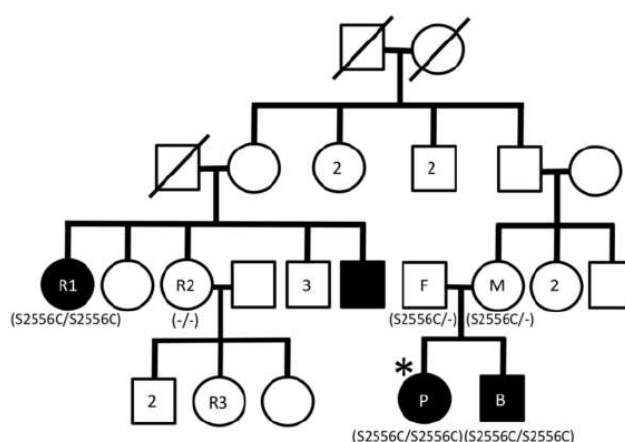
11 familiari dagozkien 14 gaixo eta 11 eramailetan, EDHei loturiko 7 geneetan aldaerak hauteman dira.

Laburdurak: ad: Autosomiko dominante; ar: Autosomiko errezesibo; BBS: Bardet-Biedl Sindromea; ESP: Exome Sequencing Project; Het: Heterozigotoa; Hom: Homozigotoa; HGVS: The Human Genome

Azaldutako lan fluxuaz baliatuz, aurrez patogeniko moduan sailkatutako 3 mutazio hauteman ahal izan dira EDH gaixotasuna pairatzen zuten 6 norbanakotan: 1). 1/6k Cys759Phe mutazioa pairatzen zuen (rs80338902)¹⁹, Usher Syndromearekin uztartzen den USH2A genean, 2). 2/6k p.Arg283ter mutazioa zuen (rs121909398)^{20,21}, EPrekin uztarturiko CERKL genean, eta 3). 3/6k p.Met390Arg mutazioa zuen (rs113624356)²² Bardet-Biedl Sindromearekin erlazionatzen den BBS1 genean. Lorturiko 3 emaitza hauetatik 2 kontrol positiboak ziren eta aurrez HRM bidez diagnostikaturiko gaixoetatik lortuak izan dira.

Honetaz gain, patogenikoak izateko probabilitate handia duten 3 mutazio hauteman dira EDH gaixotasuna pairatzen duten 8 norbanakotan: 1). 5/8k p.Ser2556Cys mutazioa zuten EPrekin lotura duen EYS genean, 2). 2/8k p.Arg324Leu mutazioa zuen (rs150427474) ftohartzaileen distrofiakin lotzen den AIPL1 genean²³ eta 3). 1/8-k p.Leu107Ile mutazioa zuen (rs3739766) Akomatopsiari loturiko GNAT2 genean.

Amaitzeko, gaixo baten gune erregulatzailan mutazio bat aurkitu da: EPri loturiko C8orf37 genean hain zuzen ere.



5. Irudia: 12. familiaren pedigria:

Klinikoki EP autosomiko errezesibo moduan diagnostikatua.

EYS genean, patogenikoa izateko probabilitate handia zuen aldaera (S2556C) hauteman da (probandoa; anaia eta 1. senitartekoan); osasuntsuak diren 2. eta 3. senitartekoez ez dute aldaera hori; eta bi gurasoak heterozigotoak direla ikusi da. Laburdurak: B: brother (anaia); F: father (aita); P: proband (probandoa; R1-3: senitartekoak. Beltzez margotutako formek, gaixorik daudela adierazten dute.

Eztabaida eta Ondorioak:

Ikerketa honetan, EDHen eragile izan daitezkeen mutazioak hautemateko Excel-en oinarrituriko baheketa estrategia garatu da. Modu honetan, Axiom Exome mikrotxiparen (Affymetrix) erabilera balioztatu nahi izan da, EDHen diagnosi molekularra egiteko tresna azkar eta eraginkor gisa.

Excelen oinarririk datu filtraketa bidez, 55 familiari dagozkien 188 lagin aztertu ahal izan dira. Guztira, 7 aldaera adierazgarri hauteman dira 11 familiari dagozkien 14 gaixo eta 11 eramailetan. Hori guztia, kostu baxu eta modu eraginkorrean.

Espero bezala, hautemandako aldaera genetiko gehienak EP gaixotasunari loturiko geneetan daude, izan ere, lorturiko DNA laginak EP diagnostiko klinikoa zuten gaixoetatik lortu dira. Halere, lan honetan erabiltzen diren mikrotxipei esker, hondo genetiko anitzeko gaixoen diagnostiko molekularra egitea ahalbidetzen da. Mikrotxipek EDHei loturiko mutazio ezagun guztiak testatzen dituztenez, diagnosi kliniko zaila zuten zenbait gaixotan, EPri lotu gabeko beste zenbait genetiko mutazioak aurkitzea ahalbidetu da. Uste gabeko lorpen hau abantaila handia izan da, modu honetan, diagnostikoa gaixo mota gehiagotara zabaltzea lortu baita, EP zuten gaixoetara soilik mugatu gabe.

Lan honetan lorturiko datuek iradokitzen dute Axiom Exome mikrotxipak aukera ona direla lehenengo mailako baheketa genetiko egiteko, EDH ezberdinak pairatzen dituzten gaixoen kopuru handia aztertu behar denean. Alde batetik, berariazkoak diren mikrotxipekin alderatuta, abantaila nabaria dute, 5 aldiz merkeagoak baitira. Bestetik, gaixotasuna pairatzen duten pazienteak beren senitartekoekin batera mikrotxip berean azter daitezkeenez, errazagoa da gaixotasunaren erantzule izan daitezkeen aldaera genetiko eragileak aurkitzea, izan ere, erraztu egiten du gaixotasunarekin batera segregatzen diren aldaeren detekzioa. Hau gutxi balitz, mikrotxip hauetan kontuan hartzen diren EDHen eragile izan daitezkeen 5.044 aldaeren artean, kodetzailak ez diren zenbait gene ere aztertzen dira, merkatuan dauden beste mikrotxipetan gertatzen ez den bezala¹⁴⁻¹⁵. Azpimarratzekoa da gene kodetzailatik at dauden gene hauek (promotorea egoten deneko eremua, erregulazio geneak eta UTRak), geroz eta garrantzia handiagoa hartzen ari direla gaixotasun ezberdinetako patofisiologiari duten inplikazioagatik³¹.

Ikusi bezala, metodologia hau erabilita aurkitu diren aldaera genetiko adierazgarrienak EPri loturiko geneetan daude eta hauen artean EYS genea izan da nagusi. EYS genearekiko homozigotikoa den zentzu aldaketa mutazioa (missense mutation) (p.Ser2556Cys; rs66462731) 3 familiatako 5 gaixotan hauteman da. Kasu honetan, nahiz eta MAF balioak (0,11) guk ezarritako atalasea gainditzen duen (0,05), ezin hobeto segregatzen da gaixotasunarekin batera, **5. Irudian** ikus daitezkeen moduan. Gainera, aldaera hau patogenikotzat hartu da, aurreikuspeneko balio fidagarriak dituela kontuan izanda (Polyphen = 0,927 eta SIFT=0). Orain gutxi argitaraturiko lan batean adierazitakoa sostengatuz, EYS genea (EP autosomiko errezesiboari loturiko gene eragilea) maiztasun handienaz agertzen dela ikusi da. Europa Mendebaldeko populazioan %5eko maiztasuna²⁴ eta Iberiar penintsulako populazioan %15eko maiztasuna du²⁵.

Lortutako emaitzen arabera, 2. aldaera ugariena CERKL genean gertatzen da Iberiar penintsulako gaixoetan. 2 gaixoren CERKL genean p.Arg257ter zentzu gabeko mutazioa (nonsense mutation) (rs121909398) aurkitu da homozigosian. Aldaera honen patogenotasuna, sortzen den amaiera-kodoi goiztiarrari dagokiola pentsatzen da. Izan ere, amaiera-kodoi goiztiarrak, proteina azkarregi moztea eragiten du (532 aminoazidotatik 257. posizioan → position 257 of 532 aa) eta honek zeramida, esfingosina eta diazilglicerol kinasetan guztiz kontserbakorra den domeinu katalitikoa kaltetzen du²¹.

EP sindromikoari dagokionez, aurrez patogeniko moduan sailkatuta zeuden 2 aldaera homozigotiko identifikatu dira, BBS1 (p.Met390Arg) eta USH2A (p.Cys759Phe) geneetan. BBS1, mutazio gehien jasaten dituen genea da eta Europar jatorria duten %25 BBS gaixotan aurkitu da^{26,27}. Gene honetan p.Met390Arg mutazioa da ohikoena, zehazki, gaixoen %80k pairatzen du. USH2A geneari dagokionez berriz, p.Cys759Phe aldaera da gertatzen den mutazio ohikoena²⁸.

Analisi honen bidez, EDHeekin erlazionaturiko 180 genetik gora aztertu dira paziente bakoitzean. Hemendik bi ondorio nagusi atera dira: batetik, frogatu da, mikrotxip hauen erabilerak EDH guztien azterketa baimentzen duela eta ez EP gaixotasunarena bakarrik (merkatuan dauden beste mikrotxipetan gertatzen denaren kontra); bestetik, ikusi da, diagnosi kliniko zaila duten gaixoetan, mikrotxip hauek baliogarriak direla espero ez ziren geneak gaixotasunaren eragile direla hautemateko. Hain zuzen ere, hau izan da bi gaixoren kasua, hasieran EP gaixoen taldean sailkatu baziren ere, ikusi da aldaera patogenikoa kono-makil distrofiarekin loturiko genean dutela (AIPL1).

Bestalde, aztertutako gaixoen artetik seik ez dute izan eskuragarri inongo senitartekoren DNA laginik. Kasu hauetan, kontrol moduan erabili diren 30 pertsona osasuntsuren DNA lagina hartu da. Honi esker, egoera honetan aurkitzen diren 6 gaixotatik 3tan, gaixotasunaren eragile diren aldaerak hautematea lortu da.

Baheketa estrategia honen abantaila nagusietako bat, paziente bakoitzeko duen kostu baxua da; izan ere, 60 euroko kostua du lagineko. Berariazkoak diren mikrotxipen aldean, 5 aldiz merkeagoak dira. Honek berebiziko garrantzia du, hartara, ospitale batean gaixotasun hauen diagnostikoa ahal den paziente gehienei egin ahal izango baitzaie eta ez da mugatuko ekonomikoki aukera duten gaixoetara soilik. Lagin bakoitzaren analisiak kostu baxua izateak, baheketa gaixo eta bere senitartekoekin aldi berean gauzatzeko aukera ematen du. Honi esker, potentzialki patogenikoak diren aldaerak modu errazean hauteman daitezke; izan ere, gaixotasunarekin batera segregatzen diren aldaerak begi-bistan geratzen dira.

Honez gain, Excelen oinarrituriko metodoa erabilia oso azkarra eta automatizatu den datu baheketa garatu ahal izan da. Modu honetan, azterketa hauek burutzeko askoz ere denbora gutxiago behar da beste baheketa edo sekuentziazio metodoekin baino (APEX mikrotxipak, Sanger sekuentziazioa, HBS teknikak...).

Gainera, metodologia honen bidez, aztertutako familien %20an lortu da gaixotasunaren eragilea den aldaera genetiko aurkitzea. Lorturiko ratio hau, erretinarako espezifikoak diren "APEX-based" mikrotxip komertzialen bidez lorturiko ratioen antzekoa da (%12-25)^{14,15}.

Beraz, garatutako metodoak duen kostu baxua eta gaixotasunaren eragile diren aldaeren detekziorako baliagarritasuna kontuan hartuta, ondorioztatu da, Axiom Exome mikrotxipen estrategia berritzaile hau aproposa dela lehen mailako baheketa genetiko moduan erabiltzeko.

Etorkizunari begira:

Etorkizun batean, garaturiko estrategia hau nahikoa edo baliogarria ez den kasuetan, espezifikoagoa den bigarren mailako baheketa egitea komenigarria izan liteke; gaixotasunekiko espezifikoak diren mikrotxipak (Asper)^{14,15}, pazienteentzat berariaz diseinaturiko mikrotxipak²⁹ edo HBS teknikak erabilia²⁰⁻²². Gauzak horrela, garatu berri dugun metodoa espezifikoagoa den beste metodo batekin konbinatuta erabiliz gero, helburu diagnostikoetarako aproposa den estrategia baten aurrean egongo ginateke, erabilgarria, azkarra, eraginkorra eta kostu baxukoa dena.

Pazientearentzat berariaz diseinaturiko birsekuentziazio mikrotxipak ez dira mugatzen aldaera genetiko jakinetara, baizik eta gene osoa sekuentziatu eta aztertzen dute. Honez gain, honelako mikrotxipek kostua handia dute (1.000-1.500€/pazienteko) eta honek erabilera mugatzen du baliabide ekonomiko jakinak dituzten pazienteetara. Gainera, mikrotxip hauen diagnostikatzeko gaitasuna gure estrategia bidez lorturikoaren oso antzekoa da; hautemate ratioak gehienetan %14-25 artean daude bi kasuetan³²⁻³⁴. Hau gutxi balitz, birsekuentziazio teknikak, denbora asko eskatzen duten bi pauso dituzte: batetik, mikrotxipean dauden geneen exoi guztiak anplifikatu ahal izateko hasle horien guztien diseinu eta testatzea eta bestetik, lortzen den datu kopuru altua antolatzea.

Hau guztia kontuan hartuta, garatu berri dugun teknika, berariazkoak diren mikrotxipekin konbinatuta erabiltzea, etorkizun batean, interesgarria izan daitekeelakoan gaude. Izan ere, diseinatu berri dugun lehen mailako baheketa metodoa erabilia, beste metodo garesti eta geldoekin aztertu beharreko lagin kopurua murriztea lortuko litzateke.

Bibliografia:

1. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet*. 2006; 368:1795-1809.
2. Chang S, Vaccarella L, Olatunji S, Cebulla C, Christoforidis J. Diagnostic challenges in retinitis pigmentosa: genotypic multiplicity and phenotypic variability. *Curr Genomics*. 2011; 12:267-275.
3. Daiger SP, Sullivan LS, Bowne SJ. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clin Genet*. 2013; 84:132-141.
4. Ferrari S, Di Iorio E, Barbaro V, Ponzin D, Sorrentino FS, Parmeggiani F. Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Curr Genomics*. 2011; 12:238-249.
5. Anasagasti A, Irigoyen C, Barandika O, Lopez de Munain A, Ruiz-Ederra J. Current mutation discovery approaches in Retinitis Pigmentosa. *Vision Res*. 2012; 75:117-129.
6. Corton M, Nishiguchi KM, Avila-Fernandez A, et al. Exome sequencing of index patients with retinal dystrophies as a tool for molecular diagnosis. *PLoS One*. 2013; 8:e65574.
7. de Castro-Miro M, Pomares E, Lores-Motta L, et al. Combined genetic and high-throughput strategies for molecular diagnosis of inherited retinal dystrophies. *PLoS One*. 2014; 9:e88410.
8. Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS, et al. Application of Next-Generation Sequencing to Identify Genes and Mutations Causing Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa (adRP). *Advances in experimental medicine and biology*. 2014; 801:123-129.
9. Dewey FE, Grove ME, Pan C, et al. Clinical interpretation and implications of whole-genome sequencing. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2014; 311:1035-1045.
10. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012; 491:56-65.
11. Tennessen JA, Bigham AW, O'Connor TD, et al. Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science*. 2012; 337:64-69.
12. Bodmer W, Bonilla C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nature*. 2008;40:695-701.
13. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009; 461:747-753.
14. Blanco-Kelly F, Garcia-Hoyos M, Corton M, et al. Genotyping microarray: mutation screening in Spanish families with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Vis*. 2012; 18:1478-1483.
15. Ogino K, Oishi A, Makiyama Y, et al. Genotype screening of retinal dystrophies in the Japanese population using a microarray. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*. 2013; 117:12-18.
16. Hamel C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis*. 2006; 1:40.
17. Anasagasti A, Barandika O, Irigoyen C, et al. Genetic Highthroughput Screenig In Retinitis Pigmentosa Based On High Resolution Melting (HRM) Analysis. *Exp. Eye Res*. 2013; 116:386-394.
18. Bell J, Bodmer D, Siermans E, Ramsden SD (eds). *Practice guidelines for the interpretation and reporting of unclassified variants (UVs) in clinical molecular genetics*. Leeds: Clinical Molecular Genetics Society. 2007.
19. Rivolta C, Sweklo EA, Berson EL, Dryja TP. Missense mutation in the USH2A gene: association with recessive retinitis pigmentosa without hearing loss. *Am J Hum Genet*. 2008; 66:1975-1978.
20. Avila-Fernandez A, Riveiro-Alvarez R, Vallespin E, et al. CERKL mutations and associated phenotypes in seven Spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49:2709-2713.
21. Tuson M, Marfany G, Gonzalez-Duarte R. Mutation of CERKL, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26). *Am J Hum Genet*. 2004; 74:128-138.
22. Mykytyn K, Nishimura DY, Searby CC, et al. Identification of the gene (BBS1) most commonly involved in Bardet-Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome. *Nat Genet*. 2002; 31:435-438.
23. Kirschman LT, Kolandaivelu S, Frederick JM, et al. The Leber congenital amaurosis protein, AIPL1, is needed for the viability and functioning of cone photoreceptor cells. *Hum Mol Genet*. 2010; 19:1076-1087.

24. Littink KW, van den Born LI, Koenekoop RK, et al. Mutations in the EYS gene account for approximately 5% of autosomal recessive retinitis pigmentosa and cause a fairly homogeneous phenotype. *Ophthalmology*. 2010; 117:2026-2033.
25. Barragan I, Borrego S, Pieras JI, et al. Mutation spectrum of EYS in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Mutat*. 2010; 31:1772-1800.
26. Beales PL, Badano JL, Ross AJ, et al. Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet*. 2003; 72:1187-1199.
27. Ajmal M, Khan MI, Neveling K, et al. Exome sequencing identifies a novel and a recurrent BBS1 mutation in Pakistani families with Bardet-Biedl syndrome. *Mol Vis*. 2013; 19:644-653.
28. Aller E, Najera C, Millan JM, et al. Genetic analysis of 2299delG and C759F mutations (USH2A) in patients with visual and/or auditory impairments. *Eur J Hum Genet*. 2004; 12:407-410.
29. Clark GR, Crowe P, Muszynska D, et al. Development of a diagnostic genetic test for simplex and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*. 2010; 117:2169-2177.
30. Chatterjee S, Pal JK. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol* 2009;101:251-262.
31. Scheper GC, van der Knaap MS, Proud CG. Translation matters: protein synthesis defects in inherited disease. *Nat Rev Genet*. 2007; 8:711-723.
32. Glockle N, Kohl S, Mohr J, et al. Panel-based next generation sequencing as a reliable and efficient technique to detect mutations in unselected patients with retinal dystrophies. *Eur J Hum Genet* 2013.
33. Song J, Smaoui N, Ayyagari R, et al. High-throughput retina-array for screening 93 genes involved in inherited retinal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52:9053-9060.
34. Chen X, Zhao K, Sheng X, et al. Targeted sequencing of 179 genes associated with hereditary retinal dystrophies and 10 candidate genes identifies novel and known mutations in patients with various retinal diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54:2186-2197.

Interneteko Baliabideak:

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

Ensembl, <http://www.ensembl.org/>

NCBI dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD.

SNP Nexus, <http://www.snp-nexus.org>