

Universidad de Valencia  
Facultad de Ciencias Biológicas



**Caracterización molecular de pacientes con síndrome de  
Usher mediante secuenciación Sanger y de nueva generación.  
Análisis de expresión de variantes USH1**

María José Aparisi Navarro

TESIS DOCTORAL

2015

Programa de doctorado en Biotecnología

Directores de tesis:

Dr. José M<sup>a</sup> Millán Salvador

Dra. Teresa Jaijo Sanchis



El Dr. José M<sup>a</sup> Millán Salvador y la Dra. Teresa Jaijo Sanchis, Titulados Superiores de la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

INFORMAN QUE:

El trabajo de tesis doctoral titulado “Caracterización molecular de pacientes con síndrome de Usher mediante secuenciación Sanger y de nueva generación. Análisis de expresión de variantes USH1”, ha sido realizado bajo su codirección en el Grupo de Biomedicina Molecular, Celular y Genómica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, por María José Aparisi Navarro, Licenciada en Ciencias Biológicas. Revisado el presente trabajo, reúne las condiciones necesarias para ser defendido públicamente ante la comisión correspondiente para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Valencia, a 25 de Noviembre de 2014.

Fdo. Dr. José M<sup>a</sup> Millán Salvador

Fdo. Dra. Teresa Jaijo Sanchis

Fdo. María José Aparisi Navarro



- **Agradecimientos**

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis:

A Chema por haberme dado la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación y permitirme realizar la tesis doctoral en su grupo. Gracias por todo el apoyo y la confianza que me has brindado durante todos estos años, por tu ayuda y respeto hacia los demás.

A Teresa por haber tenido la paciencia de enseñarme y formarme, gracias por todos los consejos, las facilidades, tu buen hacer y la ayuda que me has dado en todo este tiempo.

También, me gustaría dar las gracias al resto del equipo de investigación en Enfermedades Neurosensoriales, y a todos los pacientes y familias que han participado en los estudios, por su altruismo y confianza en la investigación biomédica.

A Elena, gracias por las enseñanzas, indicaciones y el apoyo en mi labor investigadora, has sido mi tercera directora. A Regina, por su compañerismo y paciencia para enseñarme el manejo de los cultivos celulares. A Rafa, por sus risas y su buen humor, por sus consejos y su afán investigador. A Loli, mi compañera de chismorreos, ha sido un verdadero placer poder trabajar a tu lado todo este tiempo, gracias por toda la ayuda que me has dado tanto en el laboratorio como a nivel personal. A Cristina, por su motivación en la investigación, por sus recomendaciones y su ayuda. A Carla, por su gran apoyo durante la última parte de mi tesis, espero que consigas todo lo que te propongas. A Lorena, por su simpatía y amabilidad.

A los que pasaron por el laboratorio y tengo un grato recuerdo. A Ana María, Vincenzo y Carmina, por su profesionalidad, esfuerzo y dedicación, y a Guille, mi aprendiz gallego de minigenes, por todos esos buenos ratos, espero verte de nuevo por tierras valencianas.

També voldria donar-li les gràcies a Dolors i Laia, pel seu companyerisme, i en especial a Jorge, el que era el meu company junt a Elena de cotxe des de Xàbia, gràcies per amenitzar-me els viatges d'anada i tornada del treball.

Me gustaría dar las gracias a una persona muy especial, a Gema. Ya son 11 años los que llevamos juntas, desde el primer día de carrera hasta el último de tesis, y siempre has estado ahí para ayudarme, aunque haya sido desde la distancia. Gracias por todos los favores y toda la amistad que me has dado. Sé que conseguirás todo lo que te propongas porque personas como tú hay pocas.

A mis amigos del colegio, María, Gemma, Gracia, Pedro... A mis compañeros de la Universidad, José Fco., Sergio, Ana Elena, Esther, Diego, Nico, Susana, Gema... y en especial a Ana, Teresa, Clara, Gema, Ester y Pilar, más de una década llevamos juntas y muchas son las cosas que han ocurrido, desde terminar la Universidad, empezar algunas con el doctorado y hasta más de una ser madre. Gracias por compartir todos esos buenos momentos.

A mis ximixurris de toda la vida, Mariate y Marta, y mi dinero favorito, Borja. Son tantos años los que hemos pasado juntos que ya he perdido hasta la cuenta. Por eso, gracias por haber estado siempre ahí, por acompañarme en tantos buenos recuerdos, por nuestros veranos, viajes, despedidas, bodas, borracheras, fiestas, cotilleos... y gracias, también, por darme amparo y fuerza en los malos momentos.

A mis moninos, el Gordo, Lon, Luis, Mavi, Nacho, Fati y, en especial, a Ángela, con quien comparto la experiencia de realizar una tesis doctoral y comprende mis penas y alegrías.

Dar las gracias a toda mi familia. A mis tíos, M<sup>a</sup> Carmen, Manoli, Alberto, Toni, Maju, M<sup>a</sup> Dolores, Carlos, Cristi, Tono, Teresa, Ani y, a los que como si fueran, Pepe y Paco. No tengo palabras para agradecerlos lo mucho que hacéis por nosotros. Gracias por hacernos saber y demostrarnos que podemos contar con vosotros. A mis primos, por vuestro gran apoyo.

A mis suegros, Desam y Clemente, a mis cuñados y amigos de la infancia, Nacho y Álvaro, y a mi tercera abuela, Isabel. Gracias por acogerme en vuestra familia, por ayudarme siempre que lo he necesitado y por hacerme sentir como en casa.

A mis niños peluditos de cuatro patas, Elefante y Toribio, con quienes tantos paseos hemos dado por el camí del Rebaldí y la gran vía. Ahora, aunque Toribio ya no está aquí, sé que acompañará a mi padre en sus paseos junto los que ya se fueron, Tomi y Furio. Al nuevo miembro de la familia, mucho ladrador y mucho mordedor, Kimbo.

Agradecer de una manera muy especial a mis padres, a quienes dedico esta tesis. A mi padre, Antonio. Gracias papá por todo, has sido mi pilar y mi modelo a seguir como persona. Gracias por el apoyo y fortaleza que me has dado, gracias por ser mi médico y cuidarme, por educarme, consolarme, aconsejarme y hacerme crecer como persona. Gracias por haber estado todo lo que has podido a mi lado, ojalá hubieras podido estar más tiempo con nosotros. Quiero que sepas que siempre recordaré tus *tonades* de guitarra por la mañana y nuestros paseos con los perros, nuestras conversaciones, nuestras salidas a navegar y de buceo, nuestra Xàbia... Papá no te diré que estamos bien porque te estaría mintiendo pero, estate tranquilo, nos ayudamos a ser fuertes y a seguir hacia delante. Quiero que sepas que tienes una nieta preciosa y que al mirarla me recuerda a ti. Te prometo que le hablaré de ti y

será, casi, como si te hubiera conocido. Papá, te quiero y te echo muchísimo de menos. Siempre te llevaré en mi corazón.

A mi madre, María José. Gracias mamá por ser tan fuerte y cuidarnos, por pensar siempre en los demás antes que en ti misma, por ayudarnos, por estar dispuesta a sacrificarte con tal de vernos felices y que no nos falte de nada. Gracias por todo lo que nos has dado. Te quiero mucho.

A mis hermanos, Toñe y Rafa. No hay recuerdo en mi infancia en el que no estéis. Gracias por estar siempre a mi lado, sé que puedo contar con vosotros siempre que lo necesite, sois los mejores hermanos que podría tener. A M<sup>a</sup> Rosa, gracias por cuidar tanto a mi hermano.

A mi gran amor, Gonzalo. Amore hay tantas cosas que te tendría que agradecer que nunca acabaría pero, sobre todo, gracias por querer pasar toda tu vida conmigo y querer que formásemos una familia. Gracias por escucharme y consolarme, por hacerme reír y sentir mejor. Gracias por cuidar de los míos y gracias por hacerme feliz. Espero poder ser tan buen apoyo para ti, como tú las has sido para mí.

Y a mi vida, Vera. Mi niña eres mi alegría y mi esperanza, eres lo mejor que nos ha pasado. Gracias por hacernos tener ganas de luchar. Por ti lo haremos todo.





# ÍNDICE



---

<b>I.</b>	<b>Introducción</b>	<b>15</b>
1.	El síndrome de Usher	17
2.	El oído	18
2.1	El oído interno: audición y equilibrio	19
2.2	La hipoacusia	23
3.	El globo ocular	25
3.1	Los fotorreceptores	28
3.2	La retinosis pigmentaria	30
4.	Clasificación clínica del síndrome de Usher	32
4.1	Síndrome de Usher tipo I	32
4.2	Síndrome de Usher tipo II	33
4.3	Síndrome de Usher tipo III	33
5.	Clasificación genética del síndrome de Usher	35
5.1	Síndrome de Usher tipo I: loci, genes y proteínas	36
5.1.1	USH1B	36
5.1.2	USH1C	37
5.1.3	USH1D	38
5.1.4	USH1E	39
5.1.5	USH1F	39
5.1.6	USH1G	40
5.1.7	USH1H	41
5.1.8	USH1J	41
5.1.9	USH1K	42
5.2	Síndrome de Usher tipo II: loci, genes y proteínas	42
5.2.1	USH2A	43
5.2.2	USH2C	44
5.2.3	USH2D	44
5.3	Síndrome de Usher tipo III: loci, genes y proteínas	45
5.3.1	USH3A	46
5.3.2	USH3B	46

5.4	Genes asociados al síndrome de Usher	47
5.4.1	<i>PDZD7</i>	47
5.4.2	<i>HARS</i>	48
5.4.3	<i>CEP250</i>	48
5.5	Genes candidatos al síndrome de Usher	49
5.5.1	<i>VEZT</i>	49
5.5.2	<i>MYO15A</i>	49
6.	El interactoma Usher	51
6.1	El interactoma Usher en el oído interno	51
6.2	El interactoma Usher en la retina	54
7.	Diagnóstico molecular del síndrome de Usher	56
8.	Estudios de expresión de variantes identificadas en los genes responsables de síndrome de Usher	60
8.1	Estudios de función y estructura ciliar	62
9.	Modelos animales para el síndrome de Usher	63
10.	Terapias y tratamientos para el síndrome de Usher	65
10.1	Perspectivas de terapia para la retinosis pigmentaria	65
10.2	Tratamiento y perspectivas de terapia contra la hipoacusia	67
<b>II.</b>	<b>Hipótesis y objetivos</b>	<b>69</b>
1.	Hipótesis	71
2.	Objetivos	73
<b>III.</b>	<b>Estudio molecular del gen <i>USH1C</i></b>	<b>75</b>
1.	Contexto	77
2.	Artículo: Novel mutations in the <i>USH1C</i> gene in Usher syndrome patients	79
<b>IV.</b>	<b>Análisis de expresión de variantes <i>USH1</i></b>	<b>93</b>
1.	Contexto	95

2.	Artículo: Study of USH1 Splicing Variants through Minigenes and Transcript Analysis from Nasal Epithelial Cells	97
3.	Fe de errata	127
<b>V.</b>	<b>Secuenciación de nueva generación: diagnóstico molecular del USH</b>	<b>129</b>
1.	Contexto	131
2.	Artículo: Targeted next generation sequencing for molecular diagnosis of Usher syndrome	133
<b>VI.</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>165</b>
1.	Estudio molecular del gen <i>USH1C</i>	167
1.1	Clasificación de las variantes	167
1.2	Implicación del gen <i>USH1C</i> en población española	168
1.3	Espectro mutacional del gen <i>USH1C</i>	169
1.4	Estudios adicionales en el gen <i>USH1C</i>	171
1.5	Terapias para el gen <i>USH1C</i>	172
2.	Análisis de expresión de variantes USH1	174
2.1	Selección de variantes	174
2.2	Análisis mediante minigenes	175
2.3	Análisis del ARN de células epiteliales nasales	177
2.4	Función ciliar	178
2.5	Estudios adicionales: expresión de genes USH en células epiteliales nasales	180
2.6	Aplicación de los estudios funcionales	180
3.	Secuenciación de nueva generación: diagnóstico molecular del USH	182
3.1	Panel de genes	182
3.2	Pacientes	182
3.3	Cobertura media por <i>target</i>	182
3.4	Validación y diagnóstico	185
3.4.1	Grupo control: validación de la estrategia de diagnóstico	185
3.4.2	Grupo de estudio: diagnóstico molecular	185

3.4.3	Espectro mutacional	186
3.4.3.1	Identificación de mutaciones adicionales en otros genes USH	187
3.4.3.2	Identificación de mutaciones en genes asociados a distinto tipo clínico al que pertenece el paciente	188
3.5	Detección de grandes reordenamientos	189
3.6	Casos no resueltos	190
3.6.1	Posibles casos de digenismo	190
3.7	Genes asociados y candidatos al USH	192
3.8	Futuros estudios	192
<b>VII.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>195</b>
<b>VIII.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>199</b>
<b>IX.</b>	<b>Apéndice</b>	<b>225</b>
1.	Trabajo no relacionado con los objetivos de la tesis. Artículo: Two novel disease-causing mutations in the <i>CLRN1</i> gene in patients with Usher syndrome type 3	227
2.	Tabla S1	244
<b>X.</b>	<b>Resumen</b>	<b>245</b>
<b>XI.</b>	<b>Publicaciones relacionadas con la tesis doctoral</b>	<b>257</b>
<b>XII.</b>	<b>Abreviaturas</b>	<b>261</b>
<b>XIII.</b>	<b>Índice de tablas y figuras</b>	<b>267</b>

# **I. INTRODUCCIÓN**





## 1. El síndrome de Usher

El síndrome de Usher (USH) es una enfermedad autosómica recesiva, clínica y genéticamente heterogénea. Se caracteriza por la asociación de hipoacusia neurosensorial, retinosis pigmentaria (RP), y en algunas ocasiones, disfunción vestibular.

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1858 por el oftalmólogo alemán Von Graefe, en una familia en la que se manifestaba ceguera y sordera conjuntamente en varios pacientes. Posteriormente, en 1935, ya fue el oftalmólogo Charles Usher quien observó su carácter hereditario (Usher 1935).

Se considera la forma más común de sordo-ceguera de origen genético, siendo responsable de más del 50% de los individuos sordo-ciegos (Vernon 1969). Su prevalencia varía entre 3,2 a 6,2/100000 nacidos vivos, dependiendo de la población de estudio (Millán *et al.*, 2011). Se estima que en España se encuentra alrededor de 4,2/100000 (Espinós *et al.*, 1998).

El USH se engloba dentro de un grupo de patologías conocidas con el nombre de ciliopatías. Las ciliopatías son enfermedades provocadas por la alteración de los genes implicados en la formación y señalización de los cilios. Esta afección abarca a un gran número de enfermedades como el síndrome de Joubert, síndrome de Meckel, síndrome de Bardet-Biedl, entre otras. El USH ha sido considerado una ciliopatía retiniana en base a la restringida expresión de sus genes causantes a las células ciliadas del oído interno y a los fotorreceptores en la retina, los cuales participan en el desarrollo, estructura, cohesión y función de los estereocilios de las células ciliadas del oído interno y de los fotorreceptores en la retina.

## 2. El oído

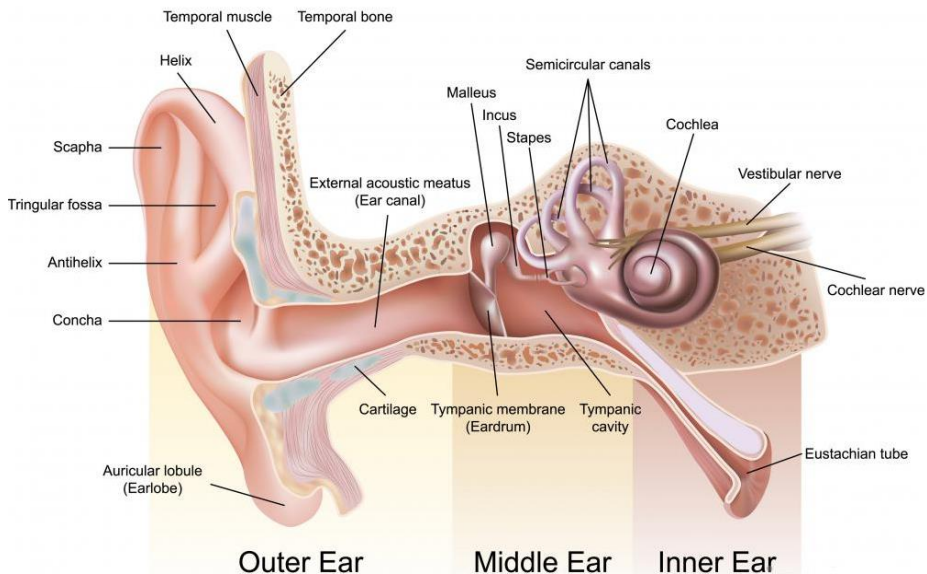
El oído es el órgano responsable de la audición y el equilibrio. Su función principal es convertir las ondas sonoras en señales eléctricas, las cuales son transmitidas a través del nervio auditivo hasta el cerebro, donde son interpretadas.

Desde un punto de vista funcional y anatómico, el oído se divide en tres partes (Figura 1):

**-Oído externo:** comprende el pabellón auditivo y el conducto auditivo externo. Su función principal es captar las ondas sonoras y conducir las hasta la membrana del tímpano a través del conducto auditivo, el cual, además, protege las estructuras internas.

**-Oído medio:** cavidad llena de aire situada entre el oído externo y el oído interno. Está formado por la caja del tímpano, la cual contiene la membrana timpánica, y una cadena de tres huesecillos unidos y articulados (el martillo, el yunque y el estribo), cuya función es amplificar las vibraciones sonoras desde el tímpano hasta el oído interno. También encontramos la trompa de Eustaquio y el antro mastoideo con parte del sistema neumático del hueso temporal.

**-Oído interno:** cavidad hueca situada dentro del hueso temporal, que alberga los órganos implicados en el equilibrio (el aparato vestibular) y la audición (la cóclea).



**Figura 1.** Representación del oído humano. El oído se encuentra dividido en tres partes: externo, medio e interno. Imagen obtenida de <http://www.wisegeek.com>.

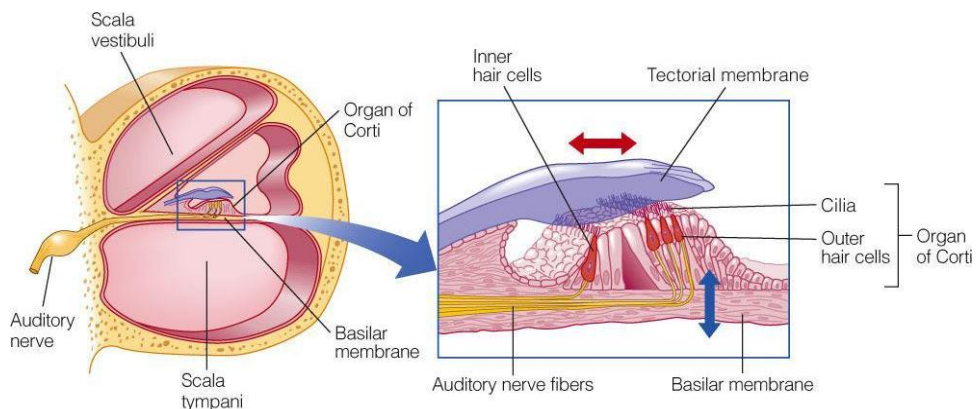
## 2.1 El oído interno: audición y equilibrio

Las ondas sonoras viajan desde el oído externo, a través del conducto auditivo, hasta la membrana timpánica del oído medio, generando vibraciones que son transmitidas y amplificadas hasta el oído interno, el cual las transforma en impulsos nerviosos que son conducidos mediante el nervio auditivo hasta la corteza cerebral para ser interpretados.

Tanto la audición como el equilibrio, son sentidos que nos permiten interactuar con el entorno, siendo el primero esencial para el aprendizaje y el segundo permitiéndonos mantener la orientación en el espacio que nos rodea. En el mantenimiento del equilibrio también participan otros elementos como la visión, la propiocepción y el cerebelo.

En el oído interno podemos diferenciar:

**-La cóclea:** órgano en forma de espiral cuyo interior está dividido en tres cámaras longitudinales: la rama o escala vestibular, la rama o escala timpánica y la rama o escala media, la cual está rellena de endolinfa. Estas tres cámaras se encuentran separadas por dos membranas: la membrana de Reissner, entre la rama vestibular y la rama media, y la membrana basilar, entre la rama media y la rama timpánica. En el interior de la cóclea encontramos el órgano de Corti (Figura 2).

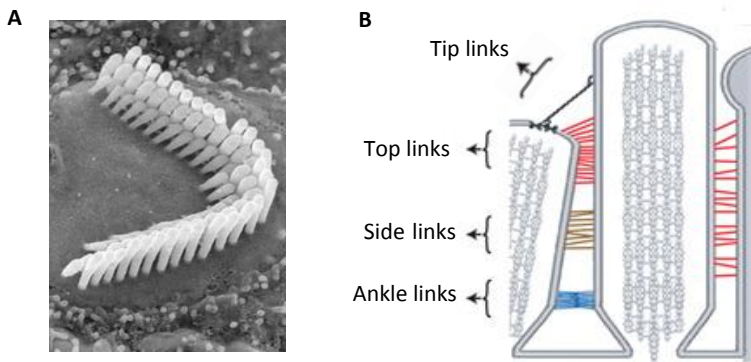


**Figura 2.** Representación del órgano de Corti. Este órgano se sitúa en la cóclea y está formado por células sensoriales ciliadas internas y externas, las cuales poseen estereocilios. Rodeando a estas células nos encontramos las células de sostén. Imagen adaptada de <http://www.studyblue.com>.

El órgano de Corti es el órgano receptor del oído interno, responsable de la audición, y se localiza sobre la membrana basilar, recubierto por la membrana tectorial. En su interior hallamos dos tipos de células sensoriales altamente organizadas: las células

ciliadas internas, situadas en una fila interior a las células pilares de soporte del órgano de Corti, y las células ciliadas externas, situadas en tres filas exteriores respecto a las células pilares (Figura 2).

Tanto las células ciliadas internas como externas, transforman los estímulos mecánicos o vibraciones en impulsos nerviosos, es decir, en variaciones del potencial intracelular. Ambos tipos celulares presentan en su zona apical microvellosidades especializadas denominadas estereocilios. Para su correcta función, los estereocilios se encuentran ordenados en filas y conectados entre sí mediante uniones laterales, estabilizando su estructura y actuando como una unidad funcional (Figura 3A). Existen diferentes tipos de uniones dependiendo del estadio de desarrollo de los estereocilios: uniones basales (*ankle links*), uniones laterales intermedias (*side links o early lateral links*), uniones superiores horizontales (*horizontal top links*) y las uniones apicales (*tip links*) (Figura 3B).



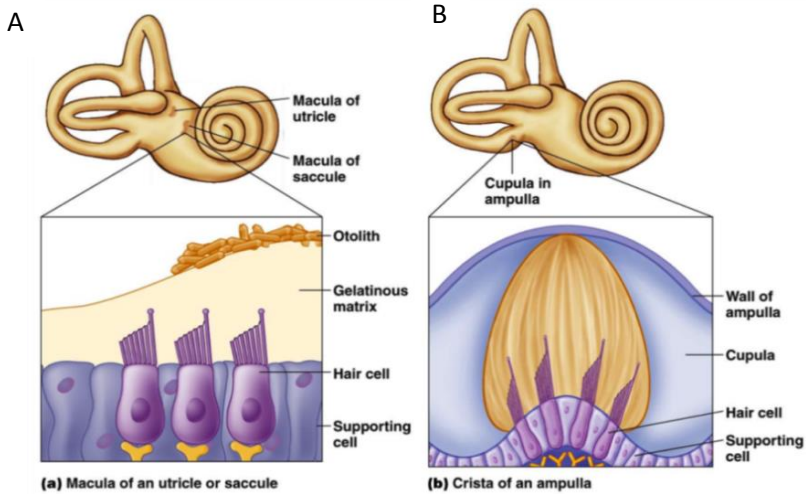
**Figura 3.** Representación de los estereocilios de las células ciliadas del oído interno. A) Imagen a microscopía electrónica de la organización de los estereocilios. B) Representación de las uniones generadas entre los estereocilios: *tip links*, *top links*, *side links* y *ankle links*. Imágenes adaptadas de El-Amraoui *et al.* (2010).

Las ondas sonoras producen vibraciones en la membrana basilar, provocando el desplazamiento conjunto de los estereocilios al rozar con la membrana tectorial, señal para la apertura de los canales iónicos de las células ciliadas, con la consiguiente despolarización y liberación de neurotransmisores en la parte basal de la célula, originando el impulso nervioso que viajará por el nervio auditivo hasta llegar a la corteza cerebral.

**-El aparato vestibular:** órgano encargado del equilibrio. Consta de dos estructuras, el vestíbulo y tres canales semicirculares:

- El vestíbulo: se sitúa entre la cóclea y los canales semicirculares. En su interior se distinguen dos estructuras: el sáculo y el utrículo, responsables del equilibrio estático. En ellos se encuentra un órgano receptor denominado mácula. Este órgano contiene células sensoriales receptoras ciliadas, recubiertas por una membrana gelatinosa, sobre la que se sitúan cristales de carbonato cálcico u otolitos, susceptibles a los cambios de gravedad. Al producirse un movimiento, los otolitos desplazan los cilios de las células ciliadas, produciéndose variaciones en los potenciales de acción, que son transmitidos hasta la corteza cerebral donde son descifrados (Figura 4A).
- Tres canales semicirculares: se encuentran orientados en los tres planos del espacio y son los responsables del equilibrio dinámico. Todos ellos se encuentran rellenos de endolinfa. En su parte inferior presentan una dilatación denominada ampolla. En el interior de esta estructura podemos diferenciar una región conocida como cresta ampular, la cual está formada por células sensoriales receptoras ciliadas recubiertas de una membrana gelatinosa. Al producirse un movimiento con la cabeza, la endolinfa de uno de los canales produce el desplazamiento de los estereocilios de estas células ciliadas de la cresta. Esto provoca cambios en el potencial de acción que son transmitidos al cerebro (Figura 4B).

Los defectos producidos tanto en las células ciliadas del órgano de Corti como en las del sistema vestibular, ya sea por agentes externos como fármacos o drogas, ruidos altos, infecciones o agentes internos como envejecimiento o mutaciones en determinados genes, dan lugar a hipoacusias o disfunción vestibular, o ambas conjuntamente.



**Figura 4.** Representación del sistema vestibular. A) Interior del vestíbulo donde encontramos el sáculo y el utrículo, los cuales albergan el órgano de la mácula. En su interior se hallan las células ciliadas recubiertas de la matriz gelatinosa, en cuya superficie se localizan los otolitos. B) Interior de los canales semicirculares donde reside la cresta ampular, la cual contiene las células receptoras sensoriales, embebidas en una cúpula gelatinosa, sensibles al movimiento. Imágenes adaptadas de [www.studyblue.com](http://www.studyblue.com).

## 2.2 La hipoacusia

La hipoacusia es un defecto sensorial en la percepción auditiva. La pérdida de audición es uno de los problemas de salud más comunes y que afecta a personas de todas las edades. Es un problema de especial importancia en la infancia, pues el desarrollo intelectual y social está relacionado con la correcta audición. Según datos de la Organización Mundial de la Salud se estima que 5 de cada 1000 nacidos vivos padecen algún tipo de defecto auditivo, produciéndose un aumento de la incidencia con la edad. Un 60% de los casos de hipoacusia son debidos a causas genéticas, de éstos el 30% son de tipo sindrómico, existen más de 400 síndromes que causan hipoacusia, de los cuales el USH y el síndrome de Pendred son los más frecuentes, y un 70% son de tipo aislado (Brownstein *et al.*, 2011). Hasta la fecha, se conocen 90 genes relacionados con hipoacusia no síndrómica (<http://deafnessvariationdatabase.org>).

Podemos clasificar la hipoacusia según distintos criterios:

- Extensión:
  - o Unilateral: afecta a un oído.
  - o Bilateral: afecta a ambos oídos.
  
- Localización del defecto:
  - o Hipoacusia conductiva o de transmisión: se produce cuando algo impide que las ondas sonoras pasen al oído interno a través del oído externo y medio. Las causas que pueden producir este tipo de hipoacusia incluyen problemas como infecciones del oído medio, tumores, tímpanos perforados, traumatismos y malformaciones del oído medio y externo.
  - o Hipoacusia neurosensorial: se producen por defectos en el oído interno, concretamente en las células ciliadas de la cóclea, o en el nervio auditivo.
  - o Hipoacusia mixta: es una combinación de hipoacusia conductiva e hipoacusia neurosensorial, lo que implica que hay daños tanto en el oído externo o medio como en el oído interno.
  
- Agente causante:
  - o Adquirida o ambiental: edad, ruido, infecciones, traumatismos, fármacos, etc.
  - o Genética: presenta una base hereditaria. La hipoacusia puede estar relacionada con otras anomalías clínicas (sindrómica) o ser un síntoma aislado (no sindrómica). Para la hipoacusia no sindrómica se han descrito los patrones de herencia mendelianos: autosómica dominante, autosómica recesiva, ligada al X o mitocondrial.

Tanto las hipoacusias adquiridas como genéticas pueden ser congénitas o desarrollarse a lo largo de la vida.

- Momento de aparición:
  - Prelocutivas: antes de haber adquirido el habla, aproximadamente antes de los 2 años.
  - Postlocutivas: Cuando el habla ya ha sido adquirida.
  
- Grado de pérdida auditiva: según el BIAP (*Bureau International d'Audiophonologie*), las hipoacusias se pueden clasificar en:
  - Hipoacusia leve: de 20-40dB. No oyen susurros, pero captan conversaciones en volumen normal.
  - Hipoacusia moderada: 40-70 dB. Necesitan que se les hable en voz alta o cerca del oído.
  - Hipoacusia severa: 70-90 dB. Grandes dificultades para la comunicación. Oyen ruidos como motores, tren, secador de pelo...
  - Hipoacusia profunda: >90 dB. Los audífonos son poco eficaces en este nivel. Captan ruido de taladros, motores de avión, disparos...
  - Hipoacusia total o cofosis: >120dB. Pérdida auditiva total.



### 3. El globo ocular

La visión es el sentido mediante el cual podemos conocer el medio que nos rodea y comunicarnos. Los órganos encargados de esta función son el globo ocular y el cerebro. El ojo recibe las señales lumínicas y las transforma en señales eléctricas, que son enviadas al cerebro a través del nervio óptico.

Anatómicamente el globo ocular está formado por tres túnicas o capas concéntricas, de afuera hacia dentro se distinguen (Figura 5):

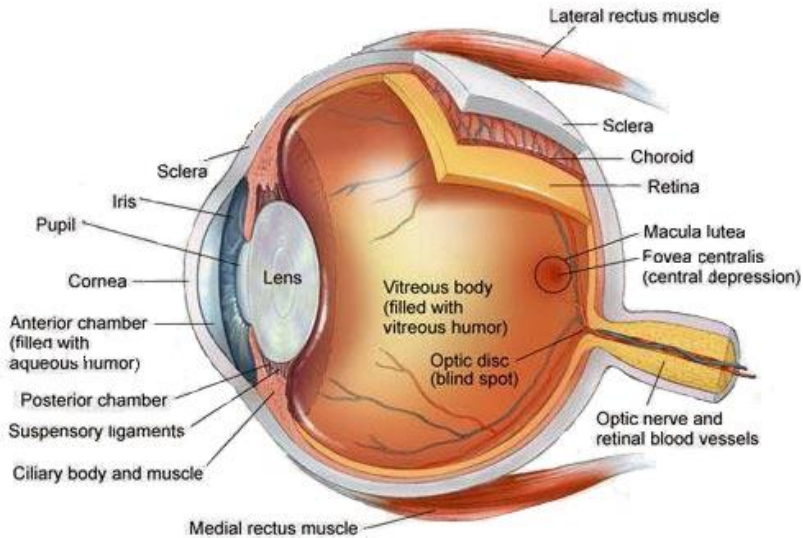
**-Túnica fibrosa:** se compone de dos regiones:

- La esclerótica: es la membrana más externa, de color blanco y opaco. Está formada por fibras de colágeno lo que le da forma y protección al globo ocular. En su parte anterior, la esclerótica se continúa con la córnea.
- La córnea: membrana resistente y avascular, compuesta por cinco capas, a través de la cual la luz penetra en el interior del ojo. Por detrás de ella se sitúa una cámara llena de un fluido claro y húmedo denominado humor acuoso, que da paso al cristalino.

**-Túnica vascular o intermedia:** también conocida como úvea, se diferencian tres regiones:

- Coroides: situada en la porción posterior del globo ocular. Es una membrana de color oscuro fuertemente vascularizada y de tejido conectivo. Se localiza entre la esclerótica y la retina del ojo, en su parte posterior se encuentra perforada por el nervio óptico. Su función es mantener la temperatura constante y nutrir a las tres capas del globo ocular.
- Cuerpo ciliar: situado en la porción anterior del ojo, entre la parte anterior de la retina y hasta la base del iris. Es el responsable de la producción de humor acuoso y la acomodación del cristalino.
- Iris: es una membrana coloreada y circular, situada entre la córnea y el cristalino, y que es continua con el cuerpo ciliar. Presenta una apertura circular central que constituye la pupila, permitiendo la entrada de luz al ojo. El iris tiene dos capas de músculos lisos que actúan abriendo y cerrando dicha pupila a modo de diafragma. Su principal función es controlar la cantidad de luz que penetra en el ojo.

**-Túnica sensorial o retina:** es una lámina translúcida de tejido nervioso que constituye la envoltura interna del globo ocular. Es la membrana fotosensible del ojo.



**Figura 5.** Anatomía del globo ocular humano. Imagen obtenida de <http://thebiologs.blogspot.com.es/2013/09/csec-eye.html>.

Las imágenes pasan a través del cristalino y son enfocadas en la retina, donde las señales luminosas son transformadas en señales eléctricas y enviadas a través del nervio óptico al cerebro.

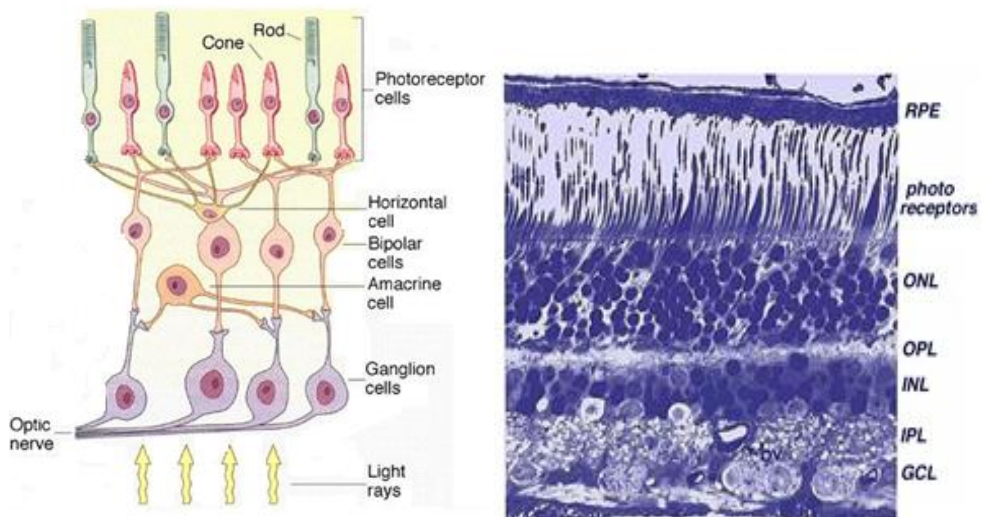
Macroscópicamente la retina está formada por (Figura 5):

- Papila óptica: es la zona por donde entra el nervio óptico al globo ocular. No presenta fotorreceptores por lo que también es denominado punto ciego.
- Fóvea: se sitúa en el área central de la retina (mácula). Se encuentra especialmente capacitada para la visión en color.
- Ora serrata: Es el límite anterior de la retina.

Microscópicamente podemos diferenciar una serie de capas yuxtapuestas (Figura 6):

- Epitelio pigmentario retiniano (RPE): contiene células pigmentarias.
- Tres capas de células neuronales:
  - Capa nuclear externa (ONL): contiene el núcleo de los fotorreceptores.
  - Capa nuclear interna (INL): contiene el núcleo de las células horizontales, bipolares, amacrinas y las células gliales de Müller.
  - Capa celular ganglionar (GCL): contiene células ganglionares.

- Dos capas de interacciones sinápticas o plexiformes: localizadas entre las tres capas celulares, es donde se realizan la mayor parte de las conexiones sinápticas.
  - Capa plexiforme externa (OPL): zona de unión de los fotorreceptores y las dendritas de las células bipolares y células horizontales.
  - Capa plexiforme interna (IPL): es donde se produce la sinapsis entre los axones de las células bipolares y células amacrinas con las dendritas de las células ganglionares. En este nivel terminan gran cantidad de prolongaciones de las células amacrinas, que modulan la información para ser transferida a las células ganglionares, las cuales envían la información al sistema nervioso a través del nervio óptico.



**Figura 6.** Estructura interna de la retina. Representación de las distintas capas que componen la retina, así como los distintos tipos celulares que la forman. Imagen adaptada <http://psyc150allen.class.arizona.edu/content/sensation-and-perception> y <http://webvision.med.utah.edu/book/part-i-foundations/simple-anatomy-of-the-retina>.

### 3.1 Los fotorreceptores

La luz entra en el ojo a través de la córnea, atraviesa la cámara anterior, el cristalino y el humor vítreo, y finalmente llega a la retina. Una vez allí, se produce la fototransducción, es decir, la conversión de la luz recibida en señales nerviosas.

Este proceso se realiza en el segmento externo (zona apical) de unas células altamente especializadas denominadas fotorreceptores. La captación de los fotones por estas células produce la apertura y cierre de canales iónicos, generándose variaciones en los potenciales de acción y la liberación o retención de neurotransmisores en el terminal sináptico, los cuales llegan hasta los axones de las células ganglionares que constituyen el nervio óptico, a través del cual se envía la información visual al cerebro.

Podemos diferenciar entre dos tipos de fotorreceptores (Figura 7):

- **Bastones:** son los responsables de la visión nocturna (visión escotópica) y visión en blanco y negro. El pigmento fotosensible que presentan en su segmento externo es la rodopsina.
- **Conos:** son los responsables de la visión diurna (visión fotópica), la percepción de los colores y la agudeza visual. Las moléculas fotosensibles que presentan en su segmento externo son las opsinas, dependiendo el pigmento que posean, los conos pueden ser divididos en rojos (64%), verdes (34%) o azules (2%).

En la retina el número de bastones y de conos, así como la distribución de los mismos es muy heterogénea, siendo el número de bastones (120 millones) muy superior al de conos (6-7 millones). A su vez, la distribución de los fotorreceptores en la retina tampoco es uniforme, existiendo una mayor densidad de conos en la región central de la retina, es decir, en la mácula concretamente en la fovea, que es la región de mayor agudeza visual. A medida que nos vamos alejando de la zona central de la retina, el número de bastones va aumentando y el de conos disminuyendo.

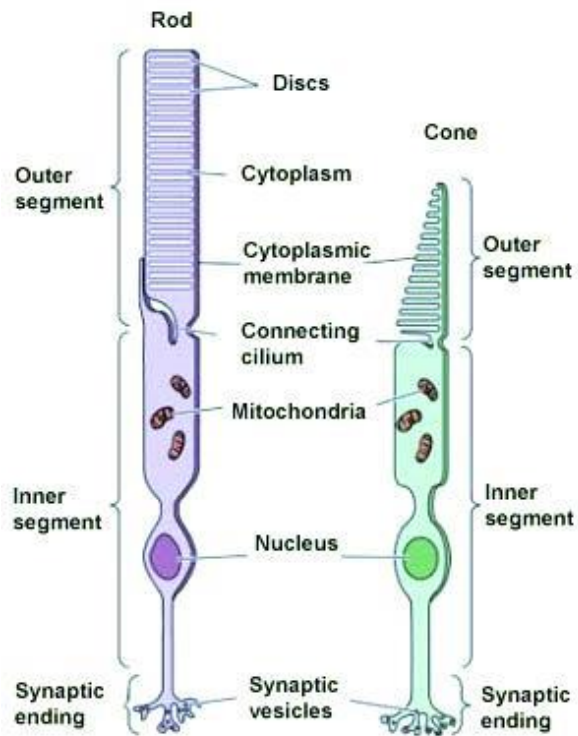
Ambos tipos celulares presentan la misma estructura (Figura 7):

**-Segmento externo:** situado en contacto con el epitelio pigmentario de la retina. Este segmento es de forma alargada en los bastones y cónica en los conos. Está compuesto de discos membranosos que contienen el fotopigmento.

**-Segmento interno:** en el que se diferencian dos partes: el elipsoide, región con gran acúmulo de mitocondrias, y el mioide, donde se encuentra la maquinaria para la síntesis

proteica de la célula. También encontramos en este segmento los terminales sinápticos que conectan con las células bipolares y horizontales.

Separando ambos segmentos se localiza una estructura similar a los cilios o flagelos denominada región del cilio conector, cuya función es permitir el transporte intracelular de vesículas entre ambos segmentos, participando de este modo en la morfogénesis y mantenimiento de los discos del segmento externo.



**Figura 7.** Representación de los dos tipos de fotorreceptores: bastones y conos. Imagen obtenida de <http://thebrain.mcgill.ca>.

### 3.2 La retinosis pigmentaria

La RP es una enfermedad ocular de carácter degenerativo y hereditario, que produce una grave disminución de la capacidad visual, pudiendo conducir a la ceguera. Se caracteriza por la pérdida de fotorreceptores y el acúmulo de depósitos de pigmento.

En la mayoría de casos, la RP suele ser de tipo no síndrómico, con una prevalencia de 1 caso por cada 3000-4000 personas. Se han observado patrones de herencia autosómicos dominantes, autosómicos recesivos, ligados al X, herencia mitocondrial y formas digénicas, identificándose hasta la fecha alrededor de 53 genes responsables de la retinosis no síndrómica. No obstante, existen las formas síndrómicas, como es el caso del USH o síndrome de Bardet-Biedl.

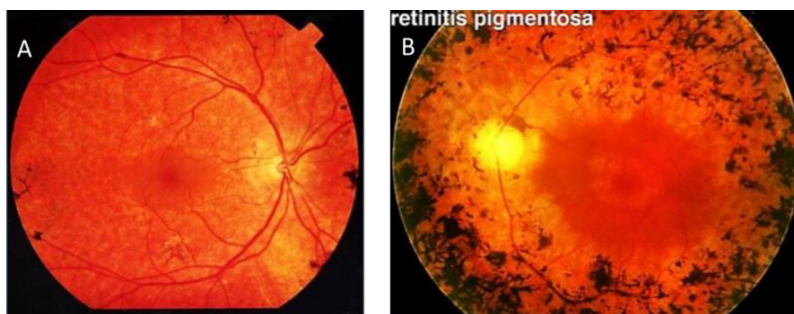
El inicio de esta enfermedad, habitualmente, comienza por la degeneración de los bastones, que conduce a la ceguera nocturna y la pérdida de visión periférica, siguiéndole un empeoramiento progresivo de la visión por la pérdida de los conos, viéndose afectada la visión central, así como la percepción de los colores y la agudeza visual.

La principal sintomatología que provoca esta enfermedad retiniana es:

- **Ceguera nocturna:** suele ser el primer síntoma que se manifiesta. Los pacientes tienen problemas de adaptación a la oscuridad o para ver en ambientes poco iluminados.
- **Disminución del campo visual:** al haberse reducido el número de bastones, el campo visual del paciente se ve disminuido. Es la llamada visión en túnel (Figura 8).
- **Fotofobia:** los pacientes sufren molestias ante excesiva luminosidad.
- **Problemas en la visión en color y pérdida de agudeza visual:** etapa en la que se produce la degeneración de los conos.
- **Alteración del fondo de ojo:** la exploración del fondo de ojo muestra palidez papilar, disminución del calibre de los vasos y depósitos de pigmento en forma de osteoclastos (Figura 9).



**Figura 8.** Representación de la visión normal frente la visión en túnel producida por RP. Imagen obtenida de [http://www.retinitis.cl/retinitis\\_pigmentosa.php](http://www.retinitis.cl/retinitis_pigmentosa.php).



**Figura 9.** Fotografía del fondo de ojo de una persona sana y un afecto de RP. A) Fondo de ojo normal. B) Fondo de ojo de un paciente con RP. Se observan los depósitos de pigmento y la disminución del calibre de los vasos. Imagen obtenida de [www.studyblue.com](http://www.studyblue.com).

#### 4. Clasificación clínica del síndrome de Usher

El USH se caracteriza por la manifestación conjunta de hipoacusia neurosensorial y RP. Sin embargo, en algunas ocasiones, se presenta junto con alteraciones del equilibrio. En base a la edad de inicio, gravedad y progresión de los síntomas clínicos, el USH puede ser dividido en tres tipos clínicos (Davenport *et al.*, 1977) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Tipos clínicos del USH.

Manifestación clínica	Síndrome de Usher tipo I	Síndrome de Usher tipo II	Síndrome de Usher tipo III
Pérdida auditiva	Congénita	Congénita	Postlingual
	Severa a profunda	Moderada a severa	Variable
	Estable	Estable	Progresiva
Inicio de la RP	Prepuberal	Peri-postpuberal	Variable
Función Vestibular	Alterada	Normal	Variable
Lenguaje	Ininteligible	Inteligible	Inteligible

En algunas ocasiones, los pacientes no pueden ser catalogados en ninguno de los tipos anteriores, al no encajar sus manifestaciones clínicas exactamente con las anteriormente descritas, clasificándose estos casos como síndrome de Usher atípico.

##### 4.1 Síndrome de Usher tipo I

El síndrome de Usher tipo I (USH1) se considera la forma más grave de la enfermedad. Estudios poblacionales han estimado que entre un 10-35% de los casos de USH corresponden al subtipo clínico USH1 (Eudy *et al.*, 1998; Spandau *et al.*, 2002; Millán *et al.*, 2011).

Los pacientes diagnosticados de USH1 presentan hipoacusia neurosensorial congénita y estable de severa a profunda, disfunción vestibular y RP de inicio prepuberal.

Estos pacientes, a lo largo de su primera década de vida, pierden los restos de audición, de forma que no son capaces de desarrollar el habla, comunicándose generalmente mediante lenguaje de signos, a menos que sean intervenidos con implantes cocleares. Asimismo, los trastornos del equilibrio ya están presentes desde el nacimiento, manifestándose un retraso en el desarrollo del aparato locomotor, no siendo capaces de



caminar hasta después de los 18 meses. Las anomalías en la retina, aparecen durante la primera década de vida pero, suelen ser diagnosticadas en la segunda década. Sin embargo, mediante el uso de electroretinogramas (ERG) se pueden detectar los defectos en la retina a la edad de 2-3 años (Malm *et al.*, 2011). Todas estas dificultades de comunicación conllevan que los pacientes afectados de USH1 presenten un alto grado de aislamiento social.

#### **4.2 Síndrome de Usher tipo II**

El síndrome de Usher tipo II (USH2) es la forma más frecuente y es menos grave que el USH1 (Rosenberg *et al.*, 1997; Spandau *et al.*, 2002). Se estima que el USH2 representa aproximadamente el 50-65% de los casos de USH (Eudy *et al.*, 1998; Spandau *et al.*, 2002; Millán *et al.*, 2011).

Los pacientes diagnosticados de USH2 presentan hipoacusia neurosensorial congénita y estable de carácter moderado a severo, función vestibular normal e inicio de RP durante o tras la pubertad.

En este caso, el grado de hipoacusia que padecen los pacientes, incrementa de moderada en frecuencias bajas, a severa en frecuencias más elevadas, tendiendo a permanecer estables, dando lugar a unas imágenes típicas en los audiogramas de pendiente descendientes, denominadas “*down sloping*” (Abadie *et al.*, 2012). Aunque la hipoacusia es de tipo congénito, les permite el desarrollo del habla y mediante audífonos el grado de audición mejora apreciablemente. Los síntomas de la RP son detectados más tarde que en el tipo I, generalmente en la segunda década de vida, y la función vestibular es normal, no apreciándose retraso en el desarrollo locomotor.

#### **4.3 Síndrome de Usher tipo III**

El síndrome de Usher tipo III (USH3) se considera la manifestación clínica menos frecuente de la enfermedad, se estima que corresponde a un 2-5% de los casos de USH. Sin embargo, en poblaciones como la finlandesa o la población de judíos Ashkenazi representa el 40% de los casos de USH debido a un efecto fundador (Eudy *et al.*, 1998; Spandau *et al.*, 2002; Millán *et al.*, 2011).

Los pacientes afectados de USH3 presentan hipoacusia neurosensorial postlingual progresiva, un inicio de la RP variable y la función vestibular puede estar afectada o no.

La pérdida de audición puede manifestarse desde la primera década de vida hasta la tercera, con una progresión muy variable que puede llegar a la hipoacusia profunda.

Generalmente, el habla es inteligible al producirse normalmente la disminución de la audición tras la adquisición del lenguaje. La disfunción vestibular es variable presentándose en un 50% de los pacientes con USH3, así como el inicio de la RP, aunque suele aparecer en la segunda década de vida (Joensuu 2002).

## 5. Clasificación genética del síndrome de Usher

El USH es altamente heterogéneo tanto a nivel clínico como a nivel genético, puesto que cada tipo clínico puede ser dividido en distintos subtipos genéticos.

Hasta la fecha se han descrito 10 genes y 3 loci adicionales como responsables de la enfermedad. Para el USH1 se han identificado 6 genes causantes (*MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH1G* y *CIB2*) y 2 loci descritos, USH1E y USH1H. Para el USH2 se han descrito 3 loci y se han localizado los 3 genes responsables (*USH2A*, *GPR98* y *DFNB31*) y para el USH3 se han descrito 2 loci pero solo se conoce un gen implicado, *CLRN1* (Tabla 2).

**Tabla 2.** Subtipos genéticos del USH.

Tipo clínico	Locus	Localización	Gen	Proteína
USH1	USH1B	11q13.5	<i>MYO7A</i>	Miosina VIIA
	USH1C	11p15.1	<i>USH1C</i>	Harmonina
	USH1D	10q22.1	<i>CDH23</i>	Cadherina 23
	USH1E	21q21	---	---
	USH1F	10q21.1	<i>PCDH15</i>	Protocadherina 15
	USH1G	17q25.1	<i>USH1G</i>	SANS
	USH1H	15q22-23	---	----
	USH1J	15q24	<i>CIB2</i>	CIB2
	USH1K	10p11.21-q21.1	---	---
USH2	USH2A	1q41	<i>USH2A</i>	Usherina
	USH2C	5q14.3	<i>GPR98</i>	VGLR1
	USH2D	9q32	<i>DFNB31</i>	Whirlina
USH3	USH3A	3q25.1	<i>CLRN1</i>	Clarina 1
	USH3B	20q	---	---

Los loci USH1A y USH2B fueron, en un principio, asociados al USH. Sin embargo, más tarde se descartó su implicación en la enfermedad (Gerber *et al.*, 2006; Kremer *et al.*, 2006).

## 5.1 Síndrome de Usher tipo I: loci, genes y proteínas

Hasta la fecha, un total de 9 loci han sido descritos para el USH1, identificándose 6 de los genes responsables. Se ha visto que muchos de los genes responsables de este tipo clínico son, a su vez, causantes de hipoacusias no sindrómicas autosómicas dominantes (DFNA) o recesivas (DFNB).

La implicación de cada uno de estos genes en el USH1 es distinta. En todos los estudios realizados hasta la fecha, el gen *MYO7A* resulta ser responsable de un porcentaje mayor de casos que el resto de genes USH1, situándose éste en torno al 53-63%, seguido del gen *CDH23* entre un 7-20%, *PCDH15* con un 7-12%, *USH1C* con un 1-15% y *USH1G* con un 0-4% (Bonnet *et al.*, 2011; Roux *et al.*, 2011; Le Quesne Stabej *et al.*, 2012). La implicación del gen *CIB2*, identificado recientemente, es desconocida, ya que hasta la fecha, sólo ha sido descrito en una familia (Riazuddin *et al.*, 2012).

### 5.1.1 USH1B

El locus USH1B fue localizado en el cromosoma 11q13.5 en varias familias que presentaban ligamiento a esa región (Kimberling *et al.*, 1992). Posteriormente, Weil *et al.* (1995) identificaron el gen responsable de este subtipo genético, *MYO7A*. Se observó que este gen era, también, responsable de hipoacusias no sindrómicas de carácter autosómico dominante y recesivo, DFNA11 y DFNB2, respectivamente (Liu *et al.*, 1997a; Liu *et al.*, 1997b).

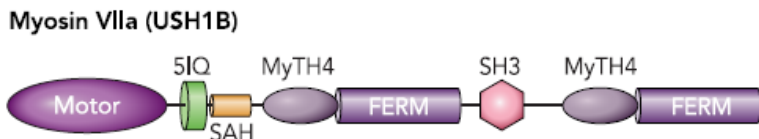
El gen *MYO7A* abarca un total de 87Kb de ADN genómico. Está formado por 49 exones, 48 de los cuales codifican para la proteína miosina VIIa, consistente en 2215 aminoácidos (254kDa) (Kelley *et al.*, 1997).

La proteína codificada por este gen presenta en su extremo N-terminal un dominio motor altamente conservado, seguido de la región denominada cuello y cola. La miosina VIIa interacciona con la actina a través de su dominio motor, el cual presenta sitios de unión a la actina y al ATP. La hidrólisis del ATP le permite desplazarse a lo largo de los filamentos de F-actina.

La región del cuello se encuentra implicada en la unión de la calmodulina, presentando 5 motivos isoleucina-glutamina (IQ). Asimismo, la cola presenta un dominio alfa-hélice sencilla (SAH) implicado en la homodimerización y una repetición en tándem de MyTH4 (*Myosin Tail Homology4*) y FERM (4.1, *Ezrin, Radixin, Moesin*), separados por un dominio SH3 (*Src Homology 3*), esta región participa en la interacción con otros

dominios proteicos ricos en prolina (Figura 10) (Kelley *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2012).

Se ha postulado la posible función de la miosina VIIa en los estereocilios de las células ciliadas del oído interno y en los fotorreceptores de la retina, sugiriéndose una implicación en la mecanotransducción y morfogénesis de los estereocilios del oído interno y en la distribución, migración de los melanosomas y regulación del transporte de opsinas en los fotorreceptores (Liu *et al.*, 1999; Heissler *et al.*, 2012).



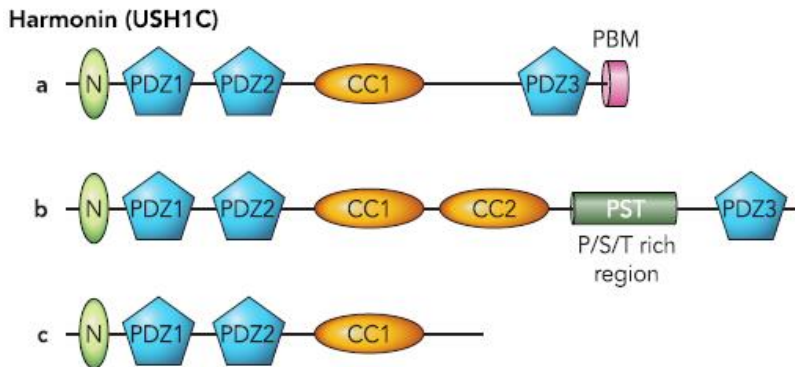
**Figura 10.** Representación de la proteína miosina VIIa. Imagen adaptada de Pan *et al.* (2012).

### 5.1.2 USH1C

El locus USH1C fue identificado en la región cromosómica 11p15.1 mediante análisis de ligamiento en población acadiana (Smith *et al.*, 1992). Posteriormente, el gen responsable, *USH1C*, fue identificado simultáneamente por dos grupos distintos (Bitner-Glindzicz *et al.*, 2000; Verpy *et al.*, 2000). Se observó que este gen se encontraba asociado a hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva, DFNB48 (Jain *et al.*, 1998).

El gen *USH1C* comprende 28 exones, con un tamaño total de 51Kb y codifican para la proteína harmonina. Veinte de estos exones son constitutivos y los 8 restantes presentan *splicing* alternativo dando origen a un gran número de transcritos específicos de tejido (Verpy *et al.*, 2000; Zwaenepoel *et al.*, 2001; Blaydon *et al.*, 2003; Reiners *et al.*, 2003). Las distintas isoformas de la harmonina se clasifican dentro de tres subtipos (*a*, *b* y *c*), dependiendo de la composición de dominios funcionales que la componen, siendo la isoforma *b* la más larga. Las isoformas de la clase *a* presentan 3 dominios PDZ (*PSD95*, *Disc Large*, *ZO-1*(*Zonula ocludens-1*)), implicados en las interacciones proteína-proteína, un dominio *coiled-coil* (CC), relacionado con la dimerización de la proteína, y un motivo PMB (*PDZ Binding Motif*). Las isoformas de tipo *b* contienen 3 dominios PDZ, 2 dominios *coiled-coil*, un dominio PST (*Prolin Serin Threonine-rich*), que le confiere la propiedad de interactuar con los filamentos de actina, y un motivo PBM terminal de unión a PDZ (Verpy *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2012). Las del tipo *c* únicamente presentan 2 dominios PDZ y un *coiled-coil* (Figura 11).

Tanto en las células ciliadas del oído interno como en los fotorreceptores de la retina, se han identificado distintas isoformas de la harmonina, siendo una proteína esencial en el interactoma Usher y pareciendo desempeñar una importante función en el ensamblaje de las demás proteínas USH, en estos dos tipos celulares. Además esta proteína participa tanto en la morfogénesis como en la mecanotransducción de los estereocilios y en la fotoconversión de los fotorreceptores.



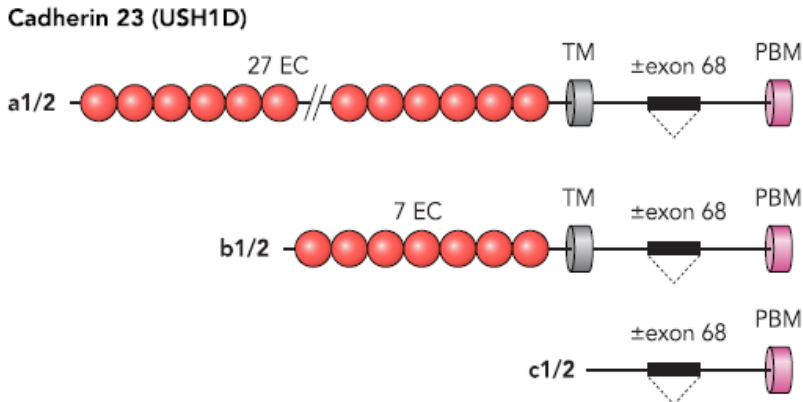
**Figura 11.** Esquema de las tres isoformas de la harmonina (a, b y c). Imagen adaptada de Pan *et al.* (2012).

### 5.1.3 USH1D

En 1996, Wayne *et al.* identificaron mediante estudios de cartografiado, en una familia pakistaní, el locus USH1D, en el cromosoma 10q22.1. Se observó que esta región estaba asociada a hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva, DFNB12 (Chaïb *et al.*, 1996). Posteriormente, se describió el gen causante de este subtipo, *CDH23*, por dos grupos distintos al mismo tiempo (Bolz *et al.*, 2001; Bork *et al.*, 2001), al detectarse mutaciones tanto en familias USH1 como en familias diagnosticadas de DFNB12.

El gen *CDH23* contiene 69 exones codificantes, que dan origen a varios transcritos alternativos, siendo la isoforma *a* la más larga, con un total de 3354 aminoácidos. Esta isoforma comprende un dominio extracelular formado por 27 repeticiones EC (*Extracellular Cadherin Repeats*), los cuales poseen el motivo de unión a  $\text{Ca}^{+2}$  mediando la adhesión célula-célula, un dominio transmembrana (TM) y una región intracelular, la cual contiene un motivo PBM con el que interactuar con los dominios PDZ de la harmonina. La isoforma *b* se diferencia de la *a*, al poseer únicamente 7 de las 27 repeticiones EC y la *c* solo posee la región intracelular (Figura 12) (Böeda *et al.*, 2002; Adato *et al.*, 2005a).

En los fotorreceptores, se ha localizado la cadherina 23 en la región del cilio conector y la región sináptica (Reiners *et al.*, 2003). En las células ciliadas del oído interno, se ha observado que desempeña un papel en la mecanotransducción y en las uniones adyacentes de los estereocilios, al estar presente junto con la protocadherina 15 en los *transient lateral links* y en los *tip link* (Kazmierczak *et al.*, 2007).



**Figura 12.** Representación de las isoformas codificadas por el gen *CDH23*. Imagen adaptada de Pan *et al.* (2012).

### 5.1.4 USH1E

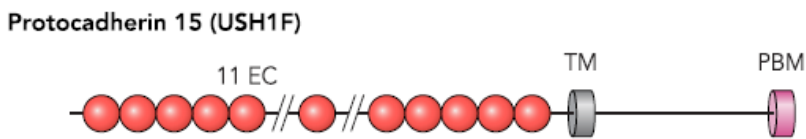
El locus *USH1E* se identificó en la región cromosómica 21q21, en una familia consanguínea marroquí (Chaïb *et al.*, 1997). Este locus se localiza en una región comprendida entre los marcadores D21S1905 y D21S1913, con una extensión de unos 15cM y unos 48 genes conocidos. Sin embargo, el gen responsable del *USH1* para este subtipo genético todavía no ha sido identificado.

### 5.1.5 USH1F

Este subtipo genético fue localizado en el cromosoma 10q21.1 mediante análisis de ligamiento en varias familias *USH1* consanguíneas. A partir de las cuales, se identificó el gen responsable, *PCDH15* (Ahmed *et al.*, 2001; Alagramam *et al.*, 2001a). Se descubrió que este locus estaba asociado a hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva, *DFNB23* (Ahmed *et al.*, 2003).

Inicialmente, se habían descrito 33 exones para el gen *PCDH15* con *splicing* alternativo. Posteriormente, Ahmed *et al.* (2008) caracterizaron 6 exones adicionales y sus diferentes isoformas. Las principales isoformas son la *CD1*, *CD2* y *CD3*, todas ellas están compuestas por 11 dominios EC, una región TM y un corto motivo intracelular PBM, de unión a PDZ. Esta región intracelular es la que difiere entre las tres isoformas (Figura 13).

Como la cadherina 23, la protocadherina 15 está presente en las uniones extracelulares de los estereocilios del oído interno, regulando su morfogénesis (Kazmierczak *et al.*, 2007). En los fotorreceptores, la encontramos en el segmento externo y en la región sináptica (Ahmed *et al.*, 2003).



**Figura 13.** Representación de la proteína protocadherina 15. Imagen adaptada de Pan *et al.* (2012).

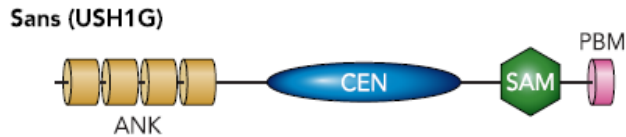
### 5.1.6 USH1G

Mustapha *et al.* (2002a) identificaron en una familia palestina el locus USH1G, en el cromosoma 17q25.1. Posteriormente, se identificó el gen responsable de este subtipo, *USH1G* (Weil *et al.*, 2003).

El gen *USH1G* comprende 3 exones, 2 de ellos codificantes para la proteína SANS de 461 aminoácidos. Es una proteína de las denominadas *scaffolding proteins* (proteínas de andamiaje), formada por 4 repeticiones ankirina (ANK), implicadas en la interacción proteína-proteína, una región central (CEN), con la que interacciona con la miosina VIIa, un motivo SAM (*Sterile Alpha Motif*), implicado en la transducción de señal célula-célula, y un dominio PBM, con el que se une a los dominios PDZ de la harmonina y whirlina (Figura 14) (Pan *et al.*, 2012).

Tanto en las células ciliadas del oído interno como en los fotorreceptores, SANS presenta un papel estructural de soporte y unión al resto de proteínas USH que forman parte del interactoma. Es una proteína citoplasmática que muestra asociación con los microtúbulos. En el oído interno, se localiza tanto en las células ciliadas externas como en el cinetocilio y en las sinapsis de las células ciliadas internas (Adato *et al.*, 2005a). En los fotorreceptores, la hallamos tanto en el cuerpo basal ciliar como en el cilio conector y región sináptica (Maerker *et al.*, 2008).





**Figura 14.** Representación de la proteína SANS codificada por el gen *USH1G*. Imagen adaptada de Pan *et al.* (2012).

### 5.1.7 USH1H

Ahmed *et al.* (2009) identificaron, a partir de dos familias consanguíneas pakistaníes un nuevo locus denominado USH1H. Se localizó en el cromosoma 15q22-23, abarcando unos 4.92cM. Hasta la fecha, no se ha identificado el gen responsable.

### 5.1.8 USH1J

Riazuddin *et al.* (2012) identificaron un nuevo locus, denominado USH1J, en la región crítica para el locus USH1H, concretamente en el cromosoma 15q24. Posteriormente, se identificaron mutaciones en el gen *CIB2* en varias familias de origen pakistaní con hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva, DFNB48 (Ahmad *et al.*, 2005).

Se realizaron estudios de ligamiento en aquellas familias en las que se había descrito el locus USH1H, descartando la implicación del nuevo locus descrito. Sin embargo, en una familia USH1 se detectó una mutación en homocigosis en el gen *CIB2*, dando origen a un nuevo locus, USH1J, con un nuevo gen responsable *CIB2* y una sordera no sindrómica asociada, DFNB48.

El gen *CIB2* comprende 6 exones y codifica para la proteína CIB2 de la familia de las *calcium and integrin binding protein*. Presenta tres isoformas *a*, *b* y *c*, las cuales contienen 3-4 dominios *EF-hand* de unión a  $\text{Ca}^{+2}$  (Figura 15).

Se postula una posible función en la mecanotransducción y en la fotoconversión, al estar implicada en la señalización de  $\text{Ca}^{+2}$ . Además, es capaz de interactuar con las proteínas whirlina y miosina VIIa. CIB2 se ha localizado tanto en los estereocilios de las células ciliadas internas como externas, así como en las células ciliadas vestibulares. En los

fotorreceptores se ha identificado tanto en el segmento externo como en el interno (Riazuddin *et al.*, 2012).



**Figura 15.** Representación de la proteína codificada por el gen *CIB2*. Imagen adaptada de El-Amraoui *et al.* (2014).

### 5.1.9 USH1K

En el 2012, Jaworek *et al.* identificaron en el cromosoma 10p11.21-q21.1 un nuevo locus, denominado USH1K, que abarca una región de 11.74cM, a partir de análisis de ligamiento de dos familias USH1 consanguíneas de origen pakistaní.

Este nuevo locus abarca una región de 20.20Mb, en el que se localiza el gen *PCDH15*, responsable de USH1F y DFNB23, pero no se han encontrado mutaciones en ninguna de estas dos familias en las que se identificó el locus USH1K. Además, se ha observado que este locus solapa con el locus, ya descrito, para hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva, DFNB33 (Belguith *et al.*, 2009). En esta región se encuentran 85 genes conocidos, 53 de los cuales se expresan en el oído interno. No obstante, el gen responsable de este subtipo no ha sido identificado hasta el momento.

### 5.2 Síndrome de Usher tipo II: loci, genes y proteínas

Para el USH2 se han descrito hasta la fecha 3 loci con sus respectivos genes implicados (*USH2A*, *GPR98* y *DFNB31*). Algunos de ellos son, a su vez, responsables de hipoacusias o RP no sindrómicas.

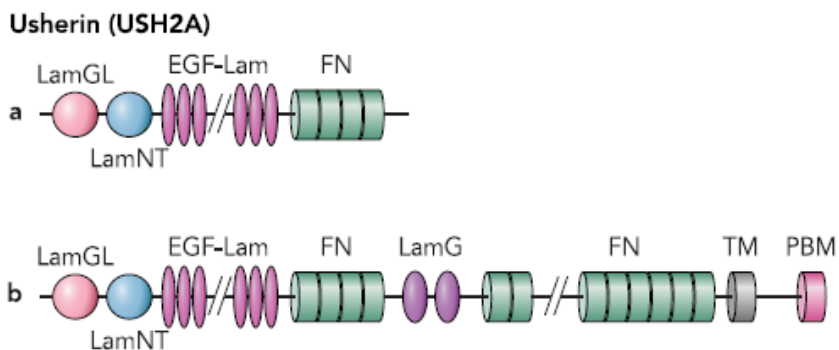
El gen *USH2A* es el mayor responsable de los casos USH2, con una prevalencia entre el 57-79%, seguido del gen *GPR98* con valores en torno 6.6-19% y por último, el gen *DFNB31* con un 0-9.5% (Bonnet *et al.*, 2011; Le Quesne Stabej *et al.*, 2012; García-García *et al.*, 2013).

### 5.2.1 USH2A

A partir de estudios de ligamiento en familias diagnosticadas de USH2 se pudo localizar el locus USH2A en el cromosoma 1q41 (Kimberling *et al.*, 1995). Posteriormente, se identificó el gen responsable, *USH2A* (Eudy *et al.*, 1998; van Wijk *et al.*, 2004). Se observó que este gen, también se encontraba implicado en RP no sintomática (Rivolta *et al.*, 2000).

El gen *USH2A* consta de 72 exones y codifica para la proteína usherina. Presenta 2 isoformas distintas, la isoforma *a* y la isoforma *b*. La isoforma *a* está compuesta por 21 exones que codifican para una proteína de 1546 aminoácidos, en esta proteína distinguimos un péptido señal (SP), un dominio similar a laminina G (*LamG*), un dominio laminina N-terminal (*LamNT*), 10 dominios laminina tipo EGF-like (*EGF-Lam*) y 4 dominios fibronectina tipo III (*FN3*) (Eudy *et al.*, 1998). Sin embargo, la isoforma *b* consta de 72 exones, de los cuales 70 codifican para una proteína de 5202 aminoácidos. Esta proteína, además de poseer los dominios anteriores, presenta 2 dominios *LamG*, 28 *FN3*, una región *TM* y un dominio intracelular, con un motivo *PBM* de unión a *PDZ* en el extremo C-terminal (Figura 16) (van Wijk *et al.*, 2004). Asimismo, este gen presenta un exón 71 alternativo específico de oído interno (Adato *et al.*, 2005b).

Estudios de localización proteica han determinado tanto en los fotorreceptores como en las células ciliadas del oído interno, un papel estructural y de soporte de la usherina en estos tipos celulares (Bhattacharya *et al.*, 2004). La isoforma *b* ha sido localizada en los *ankle links* de los estereocilios, la región apical y sinapsis de las células ciliadas internas, y en las células de soporte (Adato *et al.*, 2005b). En los fotorreceptores, se ha observado la presencia de la usherina en la región periciliar, en el cilio conector, en el cuerpo basal y en la región sináptica (van Wijk *et al.*, 2006).



**Figura 16.** Representación de la isoforma corta (a) y larga (b) de la usherina. Imagen adaptada de Pan *et al.* (2012).

### 5.2.2 USH2C

Pieke-Dahl *et al.* (2000) identificaron el locus USH2C en el cromosoma 5q14.3-q21, en pacientes diagnosticados de USH2. Cuatro años más tarde, se descubrió el gen causante de este subtipo genético, *VLGR1* (*Very Large G-Coupled Receptor*) (Weston *et al.*, 2004). Posteriormente, este gen pasó a ser conocido como *GPR98* (*G-Protein Coupled Receptor 98*).

Este gen consta de 90 exones y codifica para la proteína VLGR1. Presenta tres isoformas distintas, siendo la isoforma *b* la más larga, formada por 6306 aminoácidos. Es una proteína transmembrana que consta de una región extracelular, formada por un péptido señal y 35 dominios CalX-B (*Calcium Exchanger*  $\beta$ ), junto con un dominio LamG/TspN/PTX y 7 EAR/EPTP (*Epilepsy Associated Repeat/Epitempin Repeat*). En la región C-terminal presenta un dominio GPS (*Glutathione S-Transferase*), 7 regiones TM y un dominio PBM de unión a PDZ (Figura 17) (McMillan *et al.*, 2002; Weston *et al.*, 2004).

Esta proteína se encuentra en la base de los estereocilios y en las uniones del cilio conector en los fotorreceptores, así como en las regiones sinápticas, formando parte junto con la usherina, de las uniones *ankle links* de los estereocilios (Yagi *et al.*, 2007; Maerker *et al.*, 2008).



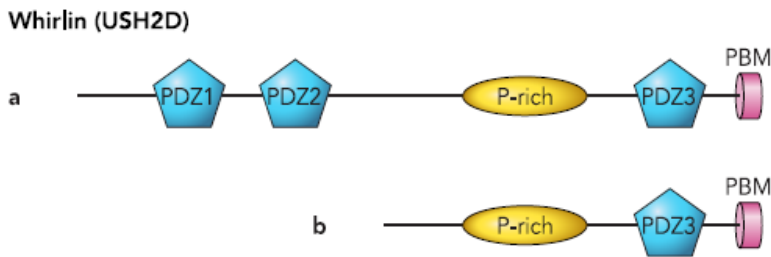
**Figura 17.** Representación de la proteína VLGR1b codificada por el gen *GPR98*. Imagen adaptada de Pan *et al.* (2012).

### 5.2.3 USH2D

El locus USH2D se identificó en el cromosoma 9q32-34 en una familia procedente de Jordania, inicialmente como un locus asociado a hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva (DFNB31) (Mustapha *et al.*, 2002b). Posteriormente, se detectaron mutaciones en el gen *DFNB31* en pacientes con hipoacusia autosómica recesiva no sindrómica (Mburu *et al.*, 2003). Sin embargo, no fue hasta el 2007 cuando Ebermann *et al.* identificaron en este gen mutaciones en pacientes afectados de USH2.

El gen *DFNB31* consta de 12 exones y codifica para la proteína whirlina. Existen dos isoformas: la isoforma *a* de 907 aminoácidos, es la más larga y consta de 3 dominios PDZ, una región rica en prolina (*P-rich*) y un dominio PBM, y la isoforma *b*, es la más corta, contiene la región rica en prolina, el tercer dominio PDZ y el dominio PBM (Figura 18).

Se ha visto que la proteína whirlina es primordial tanto en las células ciliadas del oído interno como en la retina, participando como proteína de andamiaje en la red de proteínas USH. Presenta un importante papel en la elongación de los estereocilios, en la dinámica de los filamentos de actina y en el desarrollo de las células ciliadas internas del oído interno, formando parte de las uniones *ankle links* (Michalski *et al.*, 2007) En los fotorreceptores, se halla en la región periciliar, en el cilio conector, en el cuerpo basal y en las regiones sinápticas, participando como proteína central del interactoma (Maerker *et al.*, 2008; Manor *et al.*, 2011).



**Figura 18.** Representación de las dos isoformas codificadas por el gen *DFNB31*. Imagen adaptada de Pan *et al.* (2012).

### 5.3 Síndrome de Usher tipo III: loci, genes y proteínas

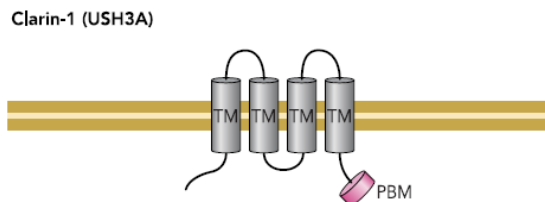
Para este subtipo clínico se han descrito dos loci pero, únicamente se ha identificado uno de los genes responsables. La implicación que presenta el USH3 es muchísimo menor al resto de tipos clínicos. Sin embargo, en algunas poblaciones como la finlandesa o los judíos Ashkenazi supone el 40% de los pacientes afectados de USH, debido a las mutaciones fundadoras, p.Y176X y p.N48K, en el gen *USH3A* en cada una de estas poblaciones (Joensuu *et al.*, 2001; Ness *et al.*, 2003).

### 5.3.1 USH3A

En 1995, Sankila *et al.* identificaron mediante análisis de ligamiento en familias de origen finlandés, el locus USH3A, concretamente, en el cromosoma 3q25.1. Posteriormente, se localizó el gen responsable de este subtipo, denominado *CLRN1* (Joensuu *et al.*, 2001).

El gen *CLRN1* es complejo, y presenta al menos 11 isoformas distintas. El principal transcrito está formado por 3 exones que codifican para una proteína de 232 aminoácidos, la proteína clarina-1. Esta proteína pertenece a las proteínas transmembrana y presenta 4 motivos TM y un dominio PBM en la región C-terminal (Figura 19).

Se ha observado que clarina-1 se expresa tanto en los estereocilios como en la retina. A lo largo de los años, se han postulado diferentes funciones para esta proteína. Adato *et al.* (2002) sugirieron un posible papel en las sinapsis de las células ciliadas y de los fotorreceptores, y Geng *et al.* (2012) propusieron esta proteína como esencial para la estructura mecanosensorial de los estereocilios. Phillips *et al.* (2013) demostraron la presencia de clarina-1 en la zona apical y basal de los estereocilios de *zebrafish*. Recientemente, Orgun *et al.* (2014) sugirieron que clarina-1 podría estar involucrada en una gran variedad de procesos celulares: regulación de la actividad del canal de mecanotransducción, correcto desarrollo y mantenimiento de las sinapsis, reciclaje de vesículas, modulador de la ciliogénesis y funciones de *scaffold protein*. Estos autores demuestran en células ciliadas de modelos murinos y de morfolinis de *zebrafish* la interacción existente entre clarina-1 y protocadherina 15.



**Figura 19.** Representación de la clarina-1. Imagen adaptada de Pan *et al.* (2012).

### 5.3.2 USH3B

La existencia de un segundo locus (USH3B) fue propuesta al observar ligamiento al cromosoma 20q. Sin embargo, no se ha podido identificar el gen responsable (Petit *et al.*, 2001).

## 5.4 Genes asociados al síndrome de Usher

Recientemente, se han asociados una serie de genes al USH, en base a su homología con otras proteínas USH, su contribución a la red proteica de estas proteínas, su implicación en la estructura ciliar y/o a la identificación de mutaciones supuestamente responsables de la enfermedad. Estos genes son: *PDZD7*, *HARS* y *CEP250*.

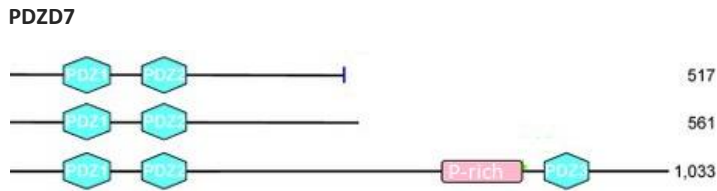
### 5.4.1 *PDZD7*

El gen *PDZD7* se localiza en el cromosoma 10q24.31 y consta de 18 exones que presentan *splicing* alternativo, dando origen a 3 isoformas distintas. El transcrito más largo da lugar a una proteína de 1033 aminoácidos, denominada *PDZD7 (PDZ Domain-Containing Protein 7)*, con 3 dominios PDZ y un dominio rico en prolina (Figura 20) (Ebermann *et al.*, 2010).

Este gen había sido propuesto como candidato para el USH debido a su homología con las proteínas harmonina y whirlina, y a sus interacciones con whirlina, *VLGR1* y *usherina* dentro del interactoma (Ebermann *et al.*, 2010). Además se expresa en la base de los cilios y en las uniones *ankle links* junto las demás proteínas USH, sugiriéndose una posible función en la organización de los complejos USH2 de las células ciliadas de la cóclea, así como en el desarrollo y morfogénesis de estas células (Grati *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2014). También se ha visto expresión de la proteína *PDZD7* en el segmento externo de los fotorreceptores, pero se desconoce su localización exacta (Zou *et al.*, 2014).

Ebermann *et al.* (2010), demostraron la implicación de este gen en el USH, al identificar en un paciente con una sola mutación *frameshift* en el gen *GPR98*, otra mutación *frameshift* en el gen *PDZD7*, cada una de las cuales fue heredada de un progenitor, sugiriéndose una herencia digénica. Este gen, también ha sido propuesto como posible modificador del fenotipo en pacientes con clínica tipo USH2, al identificar diferencias fenotípicas en dos hermanas homocigotas para la misma mutación en *USH2A* e identificar en una de ellas, un codón de parada prematuro en *PDZD7*, agravando el fenotipo retiniano.

Recientemente, el equipo de Zou *et al.* (2014) llevaron a cabo estudios con ratones heterocigotos digénicos portadores de mutaciones en el gen *PDZD7* y en distintos genes USH (*USH2A*, *GPR98*, *DFNB31* y *USH1G*). Sin embargo, en ninguno de los casos, los ratones exhibían hipoacusia neurosensorial congénita, resultados que no apoyan la hipótesis de herencia digénica en los genes USH.



**Figura 20.** Representación de las tres isoformas de la proteína PDZD7. Imagen adaptada de Ebermann *et al.* (2010).

### 5.4.2 HARS

El gen *HARS* se localiza en el cromosoma 5q31.1 y consta de 13 exones. Presenta *splicing* alternativo dando origen a distintas isoformas que codifican para una proteína citoplasmática de la familia de las aminoacil ARN de transferencia (ARNt) sintetasa. Esta enzima es básica para la incorporación del aminoácido histidina al ARNt.

*HARS* ha sido propuesto como nuevo gen causante del USH3, al identificarse una mutación *missense* (p.T454S) en homocigosis, en dos pacientes con clínica asociada al tipo 3 (Puffenberger *et al.*, 2012).

### 5.4.3 CEP250

El gen *CEP250* se localiza en el cromosoma 20q11.22 y codifica para la proteína C-Nap1, componente activa del centrosoma, requerida para la cohesión de centriolo-centriolo durante el ciclo celular.

Recientemente, se ha visto que C-Nap1 se expresa en los fotorreceptores e interacciona con otras proteínas ciliares como la *rootletin* y *NEK2*. Ambas proteínas son esenciales en la retina como componentes estructurales del cuerpo basal de los fotorreceptores. Por ahora, no se ha visto expresión de *CEP250* en el oído interno pero sí en los cuerpos basales de los cilios como otras proteínas USH (Khateb *et al.*, 2014).

Khateb *et al.* (2014) pudieron relacionar el gen *CEP250* con el USH atípico, al identificar una mutación *nonsense* en homocigosis en una gran familia judío iraní con hipoacusia neurosensorial temprana y degeneración retiniana. Se observó, que los pacientes homocigotos para *CEP250* manifestaban una forma leve de RP mientras que los pacientes en los que, además se había identificado otra mutación *nonsense* en homocigosis en el gen



*C2orf71*, es decir, dobles homocigotos para mutaciones en *CEP250* y *C2orf71*, presentaban una RP más grave de inicio temprano. Se ha visto, que el gen ciliar *C2orf71* es uno de los genes responsables de RP no sindrómica autosómica recesiva (ARRP) con una severidad variable y se ha postulado que se expresa, principalmente, en el segmento externo de los fotorreceptores, no asociándose a sordera ni hipoacusia (Collin *et al.*, 2010; Nishimura *et al.*, 2010).

## 5.5 Genes candidatos al síndrome de Usher

Se han seleccionado diversos genes como candidatos para el USH, en base a la homología con las proteínas USH o a su implicación dentro de la red proteica formada por éstas. Estos genes son: *VEZT* y *MYO15A*.

### 5.5.1 *VEZT*

El gen *VEZT* se localiza en el cromosoma 12q22 y codifica para la proteína vezatina. Este gen consta de 13 exones y codifica para 4 isoformas distintas, siendo la más larga de 779 aminoácidos.

La proteína vezatina es una proteína transmembrana que se halla en abundancia entre las uniones de las células ciliadas internas y las células de soporte en el oído interno (Küssel-Andermann *et al.*, 2000), concretamente en las uniones adherentes y en los *ankle links* de los estereocilios. Se ha observado que interacciona con la miosina VIIa, miosina XVa y usherina, y presenta adherencia a los complejos cadherina-catenina (Michalski *et al.*, 2007). En los fotorreceptores, además, forma uniones con la miosina VIIa en la región del cilio conector (Maerker *et al.*, 2008).

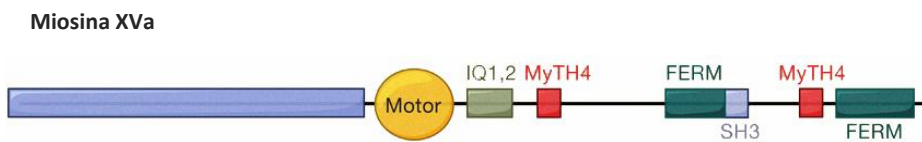
El gen *VEZT* ha sido propuesto como posible gen candidato debido a su papel dentro del interactoma Usher de las células del oído interno, participando en el mantenimiento y soporte de las uniones adherentes entre los estereocilios (Bahloul *et al.*, 2009).

### 5.5.2 *MYO15A*

El gen *MYO15A* se localiza en el cromosoma 17p11.2 y contiene 66 exones. Presenta *splicing* alternativo y codifica para la proteína miosina XVa. Este gen está asociado a hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva, DFNB3 (Wang *et al.*, 1998).

Esta miosina no convencional posee una larga extensión N-terminal, seguida de 2 motivos IQ. Asimismo, presenta 2 repeticiones en tándem MyTH4 y FERM separadas por un dominio SH3 (Figura 21).

La miosina XVa parece desempeñar un papel en la organización de la actina en las células ciliares de la cóclea y en la regulación de la tensión de la membrana citoplasmática (Delprat *et al.*, 2005). Además, en el polo apical de los estereocilios en crecimiento, se han localizado los complejos de whirlina-miosina XVa que parecen ser esenciales en el proceso de elongación de los mismos, siendo necesarios para su morfogénesis (Belyantseva *et al.*, 2005; van Wijk *et al.*, 2006).



**Figura 21.** Representación de la proteína miosina XVa. Imagen adaptada de Gillespie *et al.* (2009).

Held *et al.* (2011) mediante ensayos con ratas portadoras de mutaciones en el gen *MYO15A*, mostraron fenotipos compatibles con el USH. Estas ratas *LEW/Ztm-Myo15ci2* exhibían fenotipos de sordera, disfunción vestibular y, en algunas ocasiones, distrofia de retina. La degeneración de los fotorreceptores observada en las ratas portadoras de mutaciones en el gen *MYO15A*, podría ser debida a la interacción de la miosina XVa con la whirlina en el interactoma, junto con factores ambientales desconocidos, pues no todas las ratas de una misma camada, criadas en ambientes distintos, mostraban una degeneración retiniana.

## 6. El interactoma Usher

La mayoría de las proteínas codificadas por los genes USH interactúan con al menos otra de ellas en una red proteica, denominada interactoma Usher. Esta red de proteínas se localiza en las células ciliadas del oído interno y en los fotorreceptores de la retina, y es fundamental para el correcto funcionamiento, formación y estructura de estas células sensoriales.

El centro del interactoma está formado por las proteínas de andamiaje o *scaffold proteins*, harmonina y whirlina, las cuales presentan dominios PDZ de unión a los motivos PBM de otras proteínas USH. También está formado por la proteína SANS de adhesión a microtúbulos (Kremer *et al.*, 2006; Millán *et al.*, 2011). El resto de proteínas USH (miosina VIIa, cadherina 23, protocadherina 15, usherina, VLGLR1 y clarina-1) interactúan con estas proteínas de andamiaje y entre sí. Se desconoce todavía, si existe una interacción concreta de la proteína CIB2 dentro de esta red proteica (Adato *et al.*, 2002; Geng *et al.*, 2012; Riazuddin *et al.*, 2012; Orgun *et al.*, 2014).

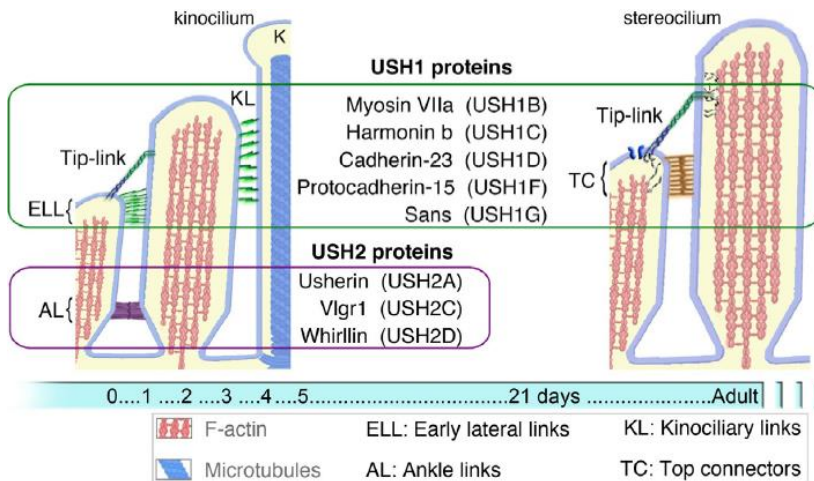
Se han identificado otras proteínas de unión a esta red proteica USH como son la proteína PDZD7, vezatina y miosina XVa.

### 6.1 El interactoma Usher en el oído interno

Las proteínas USH son esenciales para la formación y mantenimiento de las uniones que se crean entre los estereocilios. Distintos modelos animales han demostrado que mutaciones en los genes codificantes de estas proteínas generan un retraso en el desarrollo y una cohesión anómala de los estereocilios (Cosgrove *et al.*, 2014).

En las primeras etapas del desarrollo de los estereocilios, participa un cilio denominado cinetocilio, que es primordial para la correcta orientación de los mismos, desapareciendo en la edad adulta. Las primeras uniones que se crean entre los estereocilios son las uniones laterales tempranas (*early lateral links*) y las uniones estereocilio-cinetocilio (*kinociliary links*), en las que participan la mayoría de las proteínas USH1. En este estadio embrionario también se forman las *tip links*, que conectan las regiones superiores de los estereocilios entre sí. A medida que los estereocilios van desarrollándose, las uniones laterales y las uniones al cinetocilio desaparecen, dando paso a otras nuevas uniones en la base, denominadas *ankle links*, formadas, principalmente, por las proteínas USH2. En estado adulto, estas últimas uniones desaparecen, generándose las uniones *horizontal top connector*, que conectan, junto con las *tip links*, las regiones superiores de los estereocilios entre sí, y en las que participan, principalmente, las proteínas USH1 (Figura

22) (Kremer *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2008; Gillespie *et al.*, 2009; Grati *et al.*, 2012; Cosgrove *et al.*, 2014; El-Amraoui *et al.*, 2014).



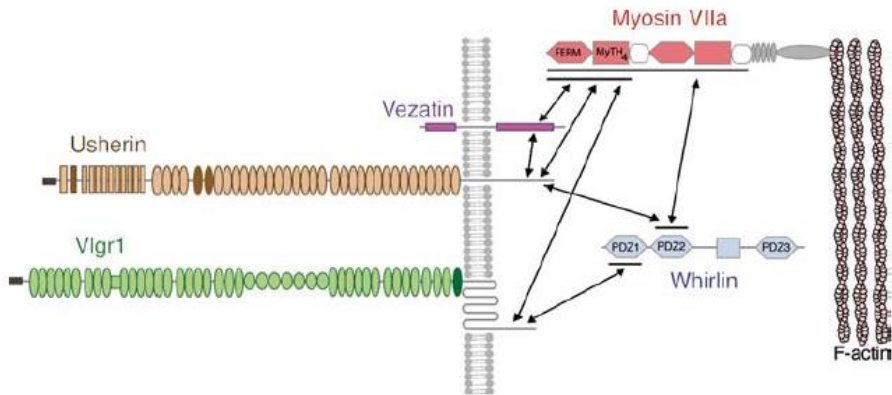
**Figura 22.** Representación de las uniones formadas entre los estereocilios y cinetocilio a lo largo de su desarrollo. Imagen adaptada de El-Amraoui *et al.* (2014).

En el oído interno podemos distinguir entre dos tipos de interactomas:

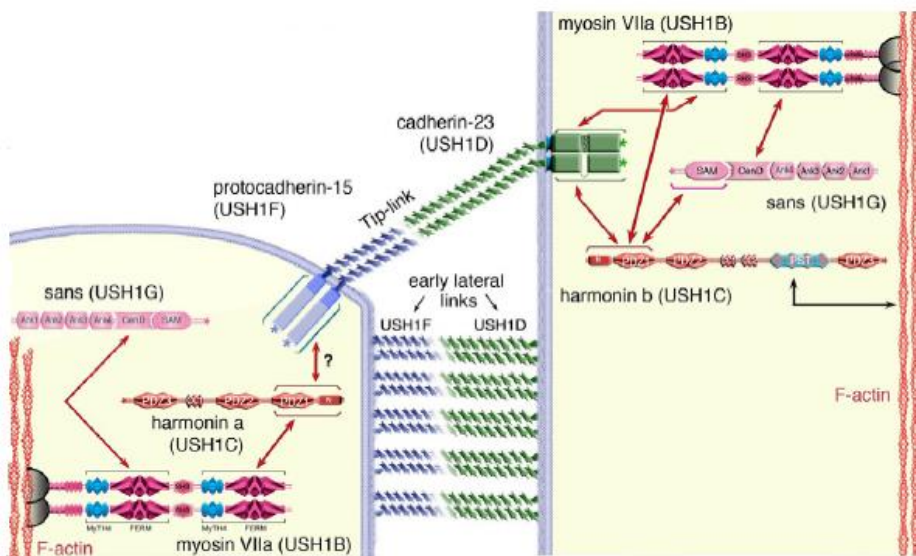
Uno de ellos estaría formado por las proteínas USH2, donde la whirlina actuaría como proteína de andamiaje, uniéndose mediante sus dominios PDZ a las proteínas transmembrana VLGR1 y usherina. También se asociaría a la miosina VIIa, que a su vez, interaccionaría con la proteína vezatina y las demás proteínas de la matriz extracelular (Figura 23). En los estereocilios de las células ciliadas del oído interno, la proteína PDZD7 ha sido localizada en la base de los estereocilios y en las uniones *ankle links*, donde se ha observado este tipo de interactoma formado, principalmente, por las proteínas USH2, por lo que se ha propuesto una posible función estructural junto con otras proteínas como VLGR1 (Grati *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2014).

El otro interactoma estaría formado por las proteínas USH1, y se localizaría, principalmente, en las *tip links*, las *early lateral links* y en las *top connector*. En este caso, las proteínas de andamiaje serían harmonina y SANS, que interactuarían con sus respectivos dominios, PDZ y SAM-PBM, con cadherina 23, protocadherina 15 y con la miosina VIIa. Esta última proteína también interactúa con cadherina 23 y protocadherina 15, anclando el interactoma a los filamentos de actina (El-Amraoui *et al.*, 2014). En la formación de las uniones *tip links* se ha postulado que clarina-1 podría estar involucrada a

través de la regulación de vesículas y activación del canal de mecanotransducción, interaccionando con protocadherina 15 (Orgun *et al.*, 2014). Asimismo, se ha propuesto la presencia de varias miosinas, como la miosina XVa, que participarían en la adaptación a la mecanotransducción, en las uniones laterales y en el transporte de vesículas (Kazmierczak *et al.*, 2007; Alagramam *et al.*, 2011) (Figura 24).



**Figura 23.** Interactoma formado por las proteínas USH2 en las *ankle links*. Imagen adaptada de Michalsky *et al.* (2007).



**Figura 24.** Interactoma formado por las proteínas USH1 en la diferenciación del estereocilio. Imagen adaptada de El-Amraoui *et al.* (2014).

## 6.2 El interactoma Usher en la retina

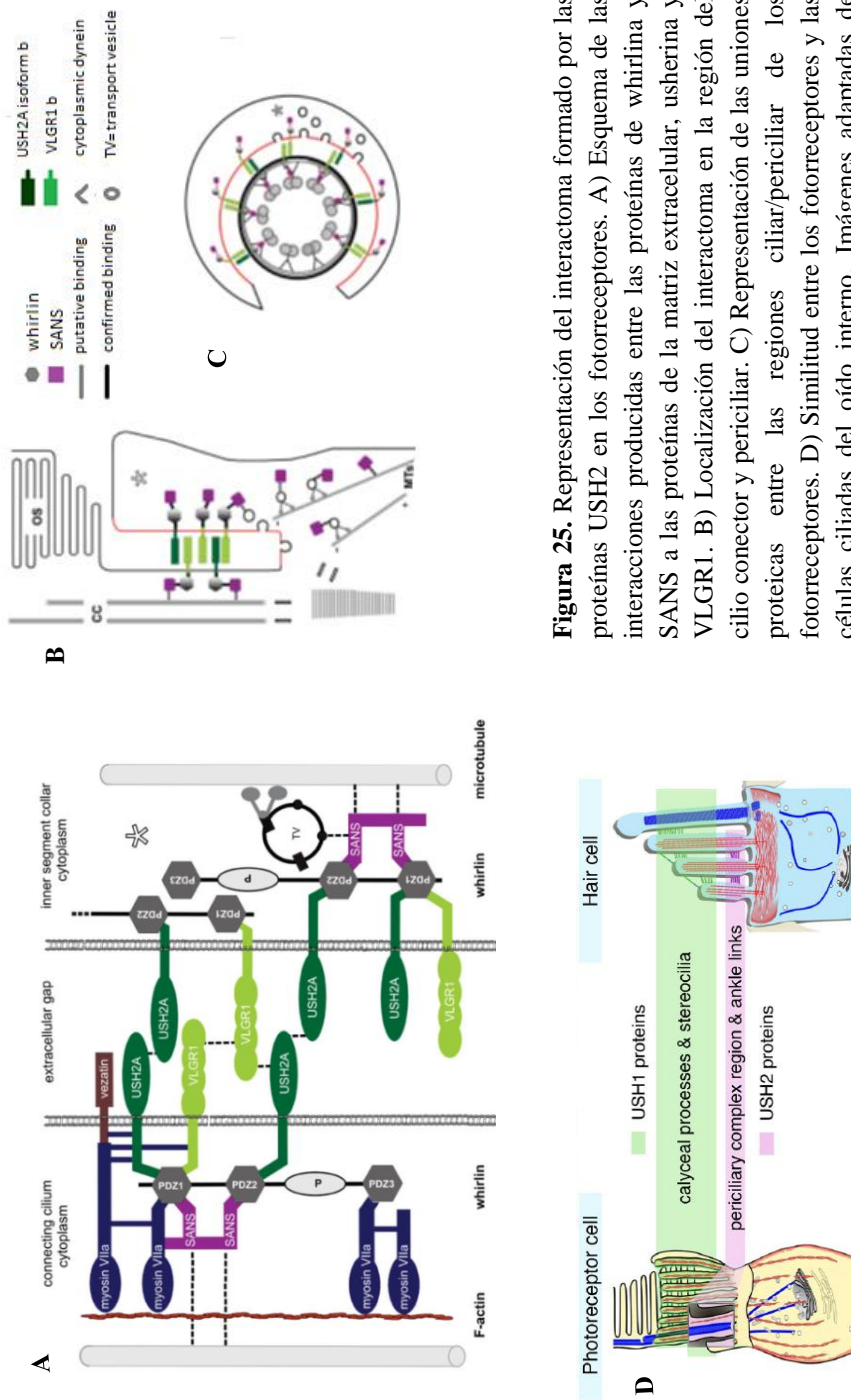
Numerosos estudios han propuesto la existencia de una red proteica formada por proteínas USH1 y USH2 en la retina, concretamente en los fotorreceptores. Este interactoma se ha localizado, principalmente, en la región periciliar de la zona apical del segmento interno y la adyacente al cilio conector, en la región sináptica y en los procesos *calyceal* de estas células sensoriales (Maerker *et al.*, 2008; Sahly *et al.*, 2012).

En esta red, las proteínas whirlina y SANS participarían como proteínas de andamiaje, tanto en el citoplasma del cilio conector como en el del segmento interno, asociándose a otras proteínas extracelulares USH como VLGR1 y usherina. Además, la proteína SANS está presente en los microtúbulos, sugiriéndose un posible papel en el transporte intracelular y en la unión del interactoma al citoesqueleto de microtúbulos, y a los filamentos de actina, a través de sus uniones con la miosina VIIa (Figura 25A). Todas estas interacciones proteicas hacen que exista una unión entre el cilio conector y la región periciliar, siendo esencial para el mantenimiento de la estructura de soporte y el transporte de vesículas (Figura 25B y 24C) (Maerker *et al.*, 2008; El-Amraoui *et al.*, 2014).

La proteína PDZD7 se ha localizado en la base del cilio conector de los fotorreceptores, pudiendo contribuir a su morfogénesis (Ebermann *et al.*, 2010).

En estudios con macacos, se localizaron las proteínas USH1 (miosina VIIa, cadherina 23, protocadherina 15, harmonina y SANS) en la región del cilio conector, proponiéndose la participación de una red proteica de proteínas USH1 en el mantenimiento de los fotorreceptores. También se describió la presencia de estas proteínas USH1 en la región de conexión membrana-membrana entre el segmento externo y los compartimentos subcelulares adyacentes (procesos *calyceal*) de los fotorreceptores (Sahly *et al.*, 2012). Sin embargo, en modelos animales murinos los procesos *calyceal* no se encuentran conservados, esto podría explicar la ausencia de degeneración retiniana en los modelos animales murinos para el USH1, a excepción del *knock-in* Ush1c/ c.216G>A (El-Amraoui *et al.*, 2014).

Tanto los fotorreceptores como los estereocilios presentan estructuras comunes, observándose una distribución de las proteínas USH1 en las regiones ricas en filamentos de actina, principalmente, en los procesos *calyceal* de los fotorreceptores y en los estereocilios de las células ciliadas del oído interno. Del mismo modo, se observa una similitud entre los interactomas de proteínas USH2 formados en las *ankle links* de los estereocilios y en la región periciliar del fotorreceptor (Figura 25D) (El-Amraoui *et al.*, 2014).



**Figura 25.** Representación del interactoma formado por las proteínas USH2 en los fotorreceptores. A) Esquema de las interacciones producidas entre las proteínas de whirlina y SANS a las proteínas de la matriz extracelular, usherina y VLGR1. B) Localización del interactoma en la región del cilio conector y periciliar. C) Representación de las uniones proteicas entre las regiones ciliar/periciliar de los fotorreceptores. D) Similitud entre los fotorreceptores y las células ciliadas del oído interno. Imágenes adaptadas de Maerker *et al.* (2008) y El-Amraoui *et al.* (2014).

## 7. Diagnóstico molecular del síndrome de Usher

El diagnóstico molecular del USH ha ido evolucionando a lo largo de los años, desarrollándose nuevas tecnologías que han permitido una identificación de la causa de la enfermedad en un menor tiempo y coste.

Las distintas técnicas aplicadas al USH han sido las siguientes:

### - Secuenciación Sanger

La secuenciación Sanger ha sido, tradicionalmente, la técnica utilizada para llevar a cabo el estudio de los genes USH, aplicándose a cada uno de los exones y regiones intrónicas adyacentes de cada gen.

La manera clásica de enfocar los estudios mutacionales se ha realizado en base a la clínica del paciente y los análisis de ligamiento, dirigiendo la búsqueda de mutaciones a uno o varios genes a secuenciar. Sin embargo, en aquellos casos donde únicamente se poseía ADN del paciente y se conocía el tipo clínico, la secuenciación comenzaba por el gen que presenta mayor prevalencia en ese tipo clínico.

El principal problema al que se ha enfrentado el diagnóstico para el USH ha sido su gran heterogeneidad genética y el gran tamaño de alguno de sus genes implicados, como es el caso de *CDH23*, *USH2A* y *GPR98*. Además, a lo largo de los años, se han publicado casos atípicos, identificándose mutaciones en genes típicamente responsables de otro tipo clínico, así como casos de herencia digénica, o casos donde no había suficiente clínica como para poder establecer el tipo clínico al que pertenecía el paciente. Todo esto ha supuesto que el diagnóstico de la enfermedad mediante secuenciación Sanger tenga un elevado coste de tiempo y dinero.

### - Microarray de genotipado

El *microarray* para el estudio del USH, comercializado por la empresa Asper Biotech (Tartu, Estonia), se desarrolló en el 2007, por Cremers *et al.* Este *microarray* era capaz de detectar 298 mutaciones, previamente identificadas en 8 de los genes USH. Más tarde, Jaijo *et al.* (2010) utilizaron una versión mejorada capaz de detectar 429 mutaciones, con el objetivo de estimar la eficacia de dicho *microarray* en población española. Sin embargo, el porcentaje de cambios detectados no era muy elevado, permitiéndoles detectar únicamente 33,9% de mutaciones en una cohorte de 183 familias USH.

La principal finalidad que tienen los *microarrays* es detectar mutaciones puntuales previamente descritas, por lo que necesita actualizaciones constantes. Sin embargo, esto supone un problema para el estudio del USH, ya que la mayoría de mutaciones para esta enfermedad son específicas de cada familia y no han sido descritas con anterioridad.



- **MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)**

La técnica del MLPA es un método de PCR multiplex, sensible, específico y complementario a otras técnicas de diagnóstico, que permite detectar grandes reordenamientos, tanto deleciones como duplicaciones, de una manera rápida y a bajo coste.

Existen numerosos genes y campos donde la técnica del MLPA es aplicable, sin embargo, no existen kits para todas las enfermedades ni genes responsables. Para el USH, la empresa MRC-Holland MLPA® ha creado dos kits específicos de MLPA: uno para el gen *PCDH15*, en el que se han visto grandes reordenamientos genómicos (Le Guédard *et al.*, 2007; Aller *et al.*, 2010) y otro para el gen *USH2A*, en el que también se ha observado grandes deleciones o duplicaciones (Steele-Stallard *et al.*, 2013; García-García *et al.*, 2014).

- **Array-CGH (*Comparative Genomic Hybridization*)**

El *array*-CGH es una técnica que permite la identificación de deleciones o duplicaciones de regiones cromosómicas que un cariotipo no alcanza a detectar. Existen diferentes tipos de *arrays* (de BACs, oligos, etc.) todos ellos se basan en la comparación cuantitativa de un ADN control frente al ADN de un paciente. Además, esta técnica permite acotar las regiones alteradas, facilitando la identificación de los puntos de rotura, gracias a su elevada resolución.

En el estudio del USH se ha aplicado en la búsqueda de grandes reordenamientos, identificando grandes duplicaciones o deleciones en los genes responsables de la enfermedad (Aller *et al.*, 2010; Roux *et al.*, 2011; Besnard *et al.*, 2012; García-García *et al.*, 2014).

- **NGS (*Next Generation Sequencing*)**

Recientemente, la secuenciación ha sufrido un gran avance, pasando del estudio de los genes individualmente, a la secuenciación completa del genoma, reduciéndose los estudios tanto en tiempo como en coste, al poder analizar de manera simultánea todos los genes de interés.

Aunque la NGS o secuenciación masiva presenta un mayor rendimiento diagnóstico, la secuenciación Sanger presenta una mayor sensibilidad.

Existen diferentes tipos de plataformas de secuenciación masiva que difieren en sus configuraciones internas y en el tipo de reacciones químicas. Sin embargo, todas ellas se basan en la secuenciación masiva de moléculas de ADN amplificadas de forma paralela,

obteniéndose cientos de millones de bases, a un reducido coste por nucleótido y por tiempo. Son los denominados secuenciadores de segunda generación.

Las aplicaciones que está teniendo la secuenciación masiva son la secuenciación completa de genomas (WGS: *Whole Genome Sequencing*), la secuenciación de exomas (WES: *Whole Exome Sequencing*), la secuenciación de determinadas regiones (*targeted resequencing*), la identificación de marcas epigenéticas y los estudios de transcriptomas de tipos celulares, tejidos u órganos.

Tras estos secuenciadores de segunda generación, se desarrollaron los secuenciadores de bancada o *benchtop*. Éstos se caracterizan por ser más pequeños, de menor coste y con protocolos de utilización y análisis de datos más sencillos. Este tipo de secuenciadores se está utilizando, principalmente, en el estudio de enfermedades genéticamente muy heterogéneas. La secuenciación de regiones concretas del ADN, se lleva a cabo mediante el enriquecimiento de esa parte del genoma, bien mediante amplicones o mediante captura y marcaje con sondas.

Existen, principalmente, tres tipos de plataformas *benchtop* (Ion Torrent PGM, 454 GS Junior y MiSeq) que se diferencian en base a su mecanismo de secuenciación, capacidad, tamaño lecturas, tiempo y precio. Si comparamos estos tipos de secuenciadores con el método tradicional, observamos el gran avance que se ha producido (Tabla 3).

Uno de los principales problemas que presenta la NGS es el complejo procesamiento que requiere (alineamiento, ensamblaje, anotación e interpretación) para poder transferir los datos obtenidos al diagnóstico del paciente. Además, las muestras de ADN deben de estar en muy buen estado para llevar a cabo el análisis. Otro de los inconvenientes que presenta son los errores de lectura por un mal alineamiento de las secuencias y errores en las regiones con homopolímeros, dando origen a los falsos positivos y falsos negativos. Esto hace que sea, hoy en día, imprescindible la comprobación de las variantes identificadas mediante otras técnicas como son: secuenciación Sanger, MLPA o *array-CGH*.

**Tabla 3.** Comparación de las plataformas de secuenciación de nueva generación de bancada: Ion Torrent, 454 GS Junior y MiSeq con la secuenciación tradicional Sanger.

<b>Plataforma <i>benchtop</i></b>	<b>Ion Torrent PGM-318 chip</b>	<b>454 GS Junior</b>	<b>MiSeq</b>	<b>Sanger 3730xl</b>
<b>Compañía</b>	Life Technology	Roche	Illumina	Applied Biosystems
<b>Mecanismo secuenciación</b>	PCR emulsión. Semiconducción de iones	PCR emulsión Pirosecuenciación	Amplificación por puentes. Terminadores marcados	Cadenas dideoxi
<b>Longitud lecturas (pb)</b>	35-400	400	2x150	400-900
<b>Capacidad /run</b>	10Mb-1Gb	40Mb	4.5Gb	1.9-84Kb
<b>Tiempo</b>	3h	8h	27h	20'-3h
<b>Ventaja</b>	Rápido	Rápido. Lecturas largas	Lecturas largas. Gran capacidad	Lecturas largas. Alta calidad
<b>Desventaja</b>	Homopolímeros Lecturas cortas	Homopolímeros Alto coste	Homopolímeros	Alto coste. Muy poca capacidad
<b>Precio\$ /run</b>	625	1100	750	4\$ 800pb

Tabla adaptada de Liu *et al.* (2012); Loman *et al.* (2012); Quail *et al.* (2012).

Estas nuevas estrategias de secuenciación masiva están siendo aplicadas tanto al estudio de distrofias de retina como a los genes responsables de hipoacusias sindrómicas y no sindrómicas, así como al diagnóstico molecular del USH. Permitiendo detectar la mayoría de las mutaciones causantes de la enfermedad en los pacientes analizados, tanto mutaciones puntuales como grandes reordenamientos, y permitiendo identificar mutaciones en genes responsables de otro tipo clínico, la presencia de mutaciones adicionales que pudieran actuar como modificadores del fenotipo o posibles casos de herencia digénica (Licastro *et al.*, 2012; Corton *et al.*, 2013; Glöckle *et al.*, 2014; Besnard *et al.*, 2014; Yoshimura *et al.*, 2014; Qu *et al.*, 2014; Krawitz *et al.*, 2014).

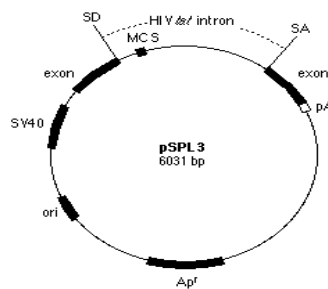
Actualmente, se están desarrollando los secuenciadores de tercera generación, basados en la secuenciación de una única molécula de ADN, en los que la primera etapa de amplificación ya no se llevaría a cabo. Principalmente, pueden ser divididas en tres categorías (Schadt *et al.*, 2010): secuenciación a tiempo real, como la plataforma SMRT (*Single Molecule Real Time Sequencing*) de Pacific Bioscience o la plataforma FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) de Life Technologies, secuenciación mediante microscopía, como la plataforma *ZS Genetics*, y secuenciación basada en el uso de nanoporos, como la plataforma *Grid ION* de Oxford Nanopore Technology.

## 8. Estudios de expresión de variantes identificadas en los genes responsables del síndrome de Usher

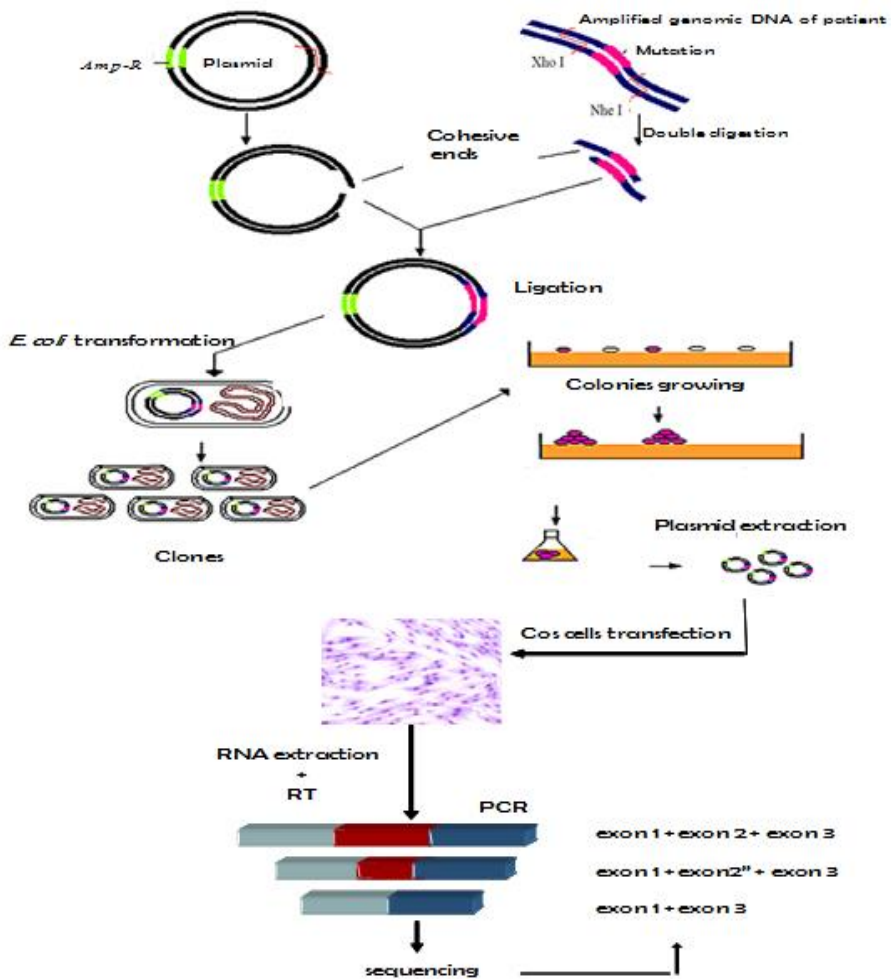
La búsqueda de mutaciones en pacientes diagnosticados de USH nos ha permitido identificar un gran número y tipo de mutaciones, algunas claramente patológicas y otras de incierta patogenicidad. Cuando el cambio conduce a un codón de parada, caben pocas dudas sobre su naturaleza patológica. Lo mismo ocurre con mutaciones localizadas en regiones del gen con un papel relevante en la función de la proteína. Sin embargo, algunas mutaciones tipo *missense*, silenciosas o intrónicas, no permiten determinar con claridad si son patológicas o no. Esto hace necesario los estudios de expresión de algunas de las mutaciones identificadas en los pacientes.

Los genes causantes del USH presentan un perfil de expresión principalmente restringido a células ciliadas del oído interno y a los fotorreceptores en la retina, resultando prácticamente imposible los estudios *in vivo*. Tradicionalmente, los estudios de expresión de variantes se han realizado mediante minigenes, determinando su naturaleza patológica tras confirmar el anómalo procesamiento del ARN mensajero (ARNm) (Bottillo *et al.*, 2007; Le Guédard-Méreuze *et al.*, 2010; Jaijo *et al.*, 2011).

La técnica de los minigenes está basada en la clonación del fragmento de interés en el interior de un vector, el cual debe poseer la capacidad de expresarse en células de mamífero. Uno de los vectores utilizados en esta estrategia es el vector *pSPL3* “*exon trapping*” (Figura 26). El fragmento de interés silvestre o mutante, formado por el exón e intrones adyacentes, es clonado entre los dos exones SA y SD del vector de expresión. Posteriormente, se transfecta en células de mamífero y se comprueba el procesamiento del ARNm generado, determinando si la variante estudiada afecta al *splicing* (Figura 27).



**Figura 26.** Representación del vector *pSPL3*. Con capacidad de replicarse en *E. coli* y expresarse en células de mamífero. Posee un promotor SV40, 2 exones (SD y SA) en medio de los cuales encontramos un sitio de clonación múltiple (MCS), el gen de resistencia a ampicilina ( $Amp^r$ ) y un ori. El *HIV intron* posee sitios de corte de enzimas de restricción. Imagen adaptada de <http://geguchadze.com/PDF/protocols/CPonline/Doc/8735-8735.html>.



**Figura 27.** Representación del protocolo de minigenes. El fragmento de interés es amplificado mediante *primers* específicos que contienen sitios de corte para determinadas enzimas de restricción, las cuales son utilizadas para la digestión del vector. Posteriormente, se lleva a cabo la ligación y transformación en *E. coli*, y su transfección en células COS-7 de mamífero, obteniendo el ARNm de interés, el cual se retrotranscribe (RT) a ADN complementario (ADNc). Imagen adaptada de [www.bio.davidson.edu](http://www.bio.davidson.edu).

Cohn *et al.* (2006) demostraron la presencia de proteínas USH en células epiteliales nasales mediante inmunohistoquímica con anticuerpos fluorescentes. Esto permitió al grupo de Vaché *et al.* (2010) detectar la presencia de transcritos USH, a partir

de ARNm de células epiteliales nasales de pacientes y controles. Consiguieron amplificar todos los transcritos de los genes USH, de manera poco invasiva, a excepción de la isoforma *b* del gen *USH1C* y el transcrito correspondiente al gen *CLRN1*. Asimismo, comprobaron el efecto estudiado mediante minigenes y el obtenido con el ARN del paciente, observando, en algunas variantes analizadas, pequeñas proporciones de transcritos mutante/normal. Estas proporciones variables entre los dos tipos de transcritos se han visto relacionadas y dependientes de la expresión histológica de cada tejido. Por lo que, el *splicing* de los genes USH se encontraría bajo la regulación de los tejidos donde se expresa, dando lugar a ratios variables de transcritos mutante/normal (Le Guédard-Méruze *et al.*, 2010; Vaché *et al.*, 2010).

Este hallazgo sobre nuevos tejidos de expresión, abrió las puertas a nuevos estudios, tanto para el USH como para otras ciliopatías, realizándolos a partir de muestras de tejido procedentes del propio paciente. Nakanishi *et al.* (2010) demostraron la presencia de 7 de los transcritos USH, a excepción de *USH1C* y *CLRN1*, en la raíz del pelo, comprobando el efecto de mutaciones en el *splicing*.

### 8.1 Estudios de función y estructura ciliar

Como ya se ha visto, las mutaciones causantes del USH afectan al correcto funcionamiento, estructura y cohesión de los estereocilios de las células ciliadas del oído interno y a los fotorreceptores de la retina, considerándose esta enfermedad como una ciliopatía retiniana. A lo largo de los años, numerosos estudios se habían cuestionado si la RP o síndromes ligados a RP afectaban al funcionamiento o la estructura de diferentes tejidos ciliares, basados en las similitudes estructurales observadas entre el cilio conector de los fotorreceptores y los axonemas de los espermatozoides, y los cilios de las células epiteliales nasales (Arden *et al.*, 1979; Hunter *et al.*, 1988; Roth *et al.*, 1992).

Estudios previos en el USH constataron una disminución de la movilidad espermática en pacientes USH, así como una disminución del batido ciliar en células epiteliales nasales en dos hermanos afectados de USH1 (Hunter *et al.*, 1986; Bonneau *et al.*, 1993). Recientemente, Armengot *et al.* (2012a) observaron una disminución de la frecuencia del batido ciliar en pacientes diagnosticados de USH2, sin embargo, en pacientes afectados de RP aislada no se apreciaba ninguna disminución significativa de la frecuencia del batido ciliar.

## 9. Modelos animales para el síndrome de Usher

El uso de animales modelos es necesario para investigar y comprender las causas, el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades. Éstos deben ser de fácil manejo y mostrar características fenotípicas similares a las observadas en humanos. Para el USH los animales modelo más utilizados son el ratón y el pez zebra (*Danio rerio*). La tabla 4 resume los modelos de ratón desarrollados para cada uno de los genes del USH.

**Tabla 4.** Modelos animales de ratón desarrollados para el USH.

Fenotipo ratones USH			
Gen/Modelo	Pérdida de auditiva	Defecto visual	Referencias
Myo7a 4626SB/4626SB	Congénita profunda y disfunción vestibular	No degeneración retiniana	Gibson <i>et al.</i> (1995)
Ush1c <sup>-/-</sup>	Congénita profunda y disfunción vestibular	No degeneración retiniana	Johnson <i>et al.</i> (2003)
Ush1c 216AA/216AA	Congénita profunda y disfunción vestibular	Degeneración retiniana variable	Lentz <i>et al.</i> (2010)
Cdh23 <sup>v-2J/v-2J</sup>	Congénita profunda y disfunción vestibular	No degeneración retiniana. Rápida respuesta ERG	Di Palma <i>et al.</i> (2001)
Pcdh15 <sup>av-3J/av-3J</sup>	Congénita profunda y disfunción vestibular	No degeneración retiniana	Alagramam <i>et al.</i> (2001b)
Ush1g <sup>js/js</sup>	Congénita profunda y disfunción vestibular	No degeneración retiniana	Kikkawa <i>et al.</i> (2003)
Ush2a <sup>-/-</sup>	Congénita moderada a severa	Degeneración retiniana	Liu <i>et al.</i> (2007)
Gpr98 <sup>-/-</sup>	Congénita moderada a severa	No degeneración retiniana	Yagi <i>et al.</i> (2007)
Gpr98 del7TM/del7TM	Congénita moderada a severa	No degeneración retiniana. Respuesta media anómala ERG	McGee <i>et al.</i> (2006)
Whrn <sup>L-/L-</sup> (isoforma larga)	Congénita moderada a severa	Degeneración retiniana	Yang <i>et al.</i> (2010)
Whrn <sup>-/-</sup>	Congénita moderada a severa	No degeneración retiniana	Mburu <i>et al.</i> (2003)
Ush3a <sup>-/-</sup>	Progresiva y moderada, función vestibular variable	No degeneración retiniana	Geller <i>et al.</i> (2009)

Tabla adaptada de El-Amraoui *et al.* (2014).

Se han descrito modelos de ratón para todos los genes USH, excepto para *CIB2*. Todos ellos se caracterizan por manifestar hipoacusia, y los utilizados para mimetizar el fenotipo clínico del USH1 presentan, además, disfunción vestibular. Los ratones utilizados

para mimetizar el USH3 presentan una pérdida auditiva progresiva y la función vestibular puede estar afectada o no. Sin embargo, en la mayoría de modelos de ratón, a excepción de *Ush1c*<sup>216AA/216AA</sup>, *Ush2a*<sup>-/-</sup> y *Whrn*<sup>L-/L-</sup>, no presentan una degeneración retiniana clara. Sahly *et al.* (2012) sugirieron, tras observar en macacos la presencia de proteínas USH1 en los procesos *calyceal* de los fotorreceptores, que esta ausencia de degeneración retiniana en modelos murinos podría ser debida a que en roedores los procesos *calyceal* no se encuentran conservados.

En *zebrafish* también se han desarrollado modelos mutante/*knockdown* para los genes USH1 (*MYO7A*, *USH1C*, *CDH23* y *PCDH15*) y para *CLRN1* (Ernest *et al.*, 2000; Söllner *et al.*, 2004; Seiler *et al.*, 2005; Philips *et al.*, 2011; Phillips *et al.*, 2013). Estos peces exhiben un comportamiento en círculos, característico de alteración vestibular, y presentan defectos funcionales y morfológicos en las células ciliadas del oído interno. Asimismo, mediante el uso de morfolinós se han creado modelos para *USH2A*, *GPR98*, *PDZD7* y *CIB2*, los cuales presentan anomalías en la organización de los estereocilios y apoptosis en retina (Ebermann *et al.*, 2010). Además, utilizando *Drosophila* como modelo, se generó un *knockdown* para el gen *CIB2* observándose una mayor degeneración de los fotorreceptores (Riazuddin *et al.*, 2012).



## 10. Terapias y tratamientos para el síndrome de Usher

El USH afecta, principalmente, a los órganos de la visión y la audición. Actualmente, no existe ninguna cura para esta enfermedad. Sin embargo, se están desarrollando distintos tipos de estrategias para mejorar la calidad de vida de los pacientes que la padecen.

### 10.1 Perspectivas de terapia para la retinosis pigmentaria

La RP es una degeneración progresiva de la retina, para la que todavía no existe tratamiento. Sin embargo, las características anatómicas de la retina como son su accesibilidad quirúrgica, su barrera interna, que limitan la difusión de sustancias o vectores al resto del organismo, y su monitorización no invasiva, hacen que los avances en la terapia contra esta enfermedad sean muy prometedores. En cualquier caso, el desarrollo de estas terapias es todavía incipiente y los ensayos se encuentran en fase preclínica, fase I (seguridad) o fase II (farmacocinética y farmacodinámica), y la elección de cada una de estas terapias dependerá del grado de progreso de la enfermedad y del estado de la retina en cada paciente.

Podemos dividir las terapias existentes en diferentes tipos:

**-Nutracéuticos:** el objetivo de estas sustancias es reducir el estrés oxidativo y los procesos inflamatorios que provoca la apoptosis de los fotorreceptores. Se han llevado a cabo ensayos con vitamina A en pacientes con RP, así como el uso de ácidos tipo omega-3 (ácido docosahexaenoico, DHA), pareciendo reducir la progresión de la enfermedad. Sin embargo, en algunos casos de RP o enfermedad de Stargardt, el uso de vitamina A está contraindicado al producirse acúmulos de esta sustancia en la retina, al poseer el gen de transporte de esta vitamina mutado. Otros ensayos están utilizando la sustancia safranina (derivado del azafrán) y la TUDCA (obtenido de la bilis de oso).

**-Terapias farmacológicas:** o factores neurotróficos. Son moléculas que protegen a los fotorreceptores de los procesos apoptóticos que desencadena la RP. Actualmente, se están valorando varios fármacos en ensayos clínicos con humanos en los que se encuentra el ácido valproico, derivados de las prostaglandinas o análogos de los retinoides. También se está valorando el efecto de los factores neurotróficos. Concretamente, en un ensayo clínico el CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*) se libera al interior del globo ocular a través de unas cápsulas formadas a partir de células derivadas del RPE. Esto se conoce como la tecnología de células encapsuladas (Tao *et al.*, 2006).

**-Terapia génica:** se basan en la sustitución, reparación o silenciamiento del gen alterado por un gen que realice la función correcta. Existen muchos métodos para llevar a cabo la terapia génica (liposomas, ADN desnudo, etc.). Sin embargo, los más utilizados son los vectores víricos. La utilización de vectores presenta algunos inconvenientes, como que el gen a sustituir no exceda la capacidad del vector.

Mediante el uso de vectores AAV (*Adeno-Associated Virus*) en ratones deficientes de la proteína whirlina, se consiguió restaurar el interactoma USH2 en la región periciliar de los fotorreceptores (Zou *et al.*, 2011). Otros estudios con lentivirus, consiguieron reemplazar el gen *MYO7A* en ratones deficientes de dicho gen (Hashimoto *et al.*, 2007).

Recientemente, se han iniciado los ensayos clínicos en fase I/II en pacientes diagnosticados de USH1B. Este tratamiento, conocido como *UshStat*, se basa en el transporte de copias correctas del gen *MYO7A* a células afectadas de la retina mediante el uso de la tecnología *Oxford's LentiVector*, que permite el transporte de genes de gran tamaño (Zalocchi *et al.*, 2013).

**-TRIDs (*Translational Read-through-Inducing Drugs*):** este tipo de terapia se basa en la utilización de moléculas que eviten el reconocimiento de los codones de parada prematuros generados por mutaciones, durante la traducción a proteína, codificando el mensajero para dar origen a una proteína funcional. Goldmann *et al.* (2012) utilizaron esta estrategia para el gen *USH1C* y la mutación p.R31X, mediante dos tipos de moléculas: aminoglucósidos (NB54) o aminoglucósidos sintéticos (PTC124).

**-Terapia celular:** o terapia con células madre. Existen diferentes ensayos clínicos con células mesenquimales de médula ósea y células troncales de cordón umbilical para la RP o células embrionarias humanas derivadas del RPE para la enfermedad de Stargardt. Sin embargo, los principales problemas son hallar un linaje celular del que se puedan derivar las células a reponer, la desprogramación y su posterior, reprogramación. Recientemente, Tucker *et al.* (2013) consiguieron a partir de queratinocitos de pacientes con mutaciones en *USH2A*, reprogramarlas a iPSCs (*Induced Pluripotent Stem Cells*) y diferenciarlas como células precursoras de retina, integrándolas en retinas de ratón donde se desarrollaron como células fotorreceptoras.

**-Prótesis:** en aquellas fases finales de degeneración retiniana, se está experimentando con el uso de microchips electrónicos implantados en la retina que permitan, al menos, la percepción de la luz y la distinción de formas.

**-Optogenética:** se basan en la inyección de moléculas mediante AAV, que permitan cambiar el potencial de membrana de las células, restaurando la fotosensibilidad en la retina. Por el momento, solo se trata de ensayos preclínicos.

## 10.2 Tratamiento y perspectivas de terapia contra la hipoacusia

En la hipoacusia neurosensorial el órgano afectado es el de Corti, situado en el oído interno. Dependiendo el grado de hipoacusia que presente el paciente, existen diferentes tipos de estrategias:

**-Audífonos:** son aparatos de tipo electrónico que permiten la amplificación de los sonidos de forma que sean audibles para el paciente, se suele usar en pacientes que padecen sorderas de leve a moderada, como son los USH2.

**-Implantes cocleares:** es un pequeño dispositivo electrónico que se implanta mediante cirugía y sustituye de manera artificial al órgano de Corti. Se suelen utilizar en pacientes que presentan una hipoacusia congénita profunda (USH1) o progresiva que deriva en profunda (USH3).

**-Terapia génica:** este tipo de estrategia no se ha desarrollado tanto como para la RP, debido a que con implantes cocleares o audífonos se ha podido mejorar la audición. No obstante, Martin *et al.* (2012) consiguieron recuperar la audición en ratones sordos deficientes para el gen *VGLUT3*, mediante la utilización de vectores AAV. Asimismo, Lentz *et al.* (2013) demostraron la eficacia del uso de oligonucleótidos antisentido (AON) contra mutaciones en regiones conocidas que producen la activación de pseudoexones, dando origen a transcritos defectuosos. Mediante esta estrategia consiguieron recuperar la hipoacusia y función vestibular de ratones portadores de la mutación c.216G>A en el gen *USH1C*, y obtener un mayor número de células ciliadas en la cóclea.



## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



### 1. Hipótesis

- 1) El gen *USH1C* es responsable de un determinado número de pacientes diagnosticados de USH1. El estudio molecular de este gen nos permitirá la identificación de mutaciones responsables de la enfermedad en nuestra cohorte y determinar la prevalencia de dicho gen en población española.
  
- 2) El rastreo mutacional de los genes responsables del USH1 (*MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15* y *USH1G*) en nuestra cohorte, ha permitido la identificación de un gran número de variantes cuya patogenicidad es incierta. Algunas de estas variantes afectan al procesamiento del ARNm.
  
- 3) Las nuevas plataformas de secuenciación masiva están permitiendo grandes avances en el diagnóstico molecular de enfermedades altamente heterogéneas. El desarrollo de un panel de genes para el USH permitirá obtener un rápido y eficaz diagnóstico de la enfermedad.





## 2. Objetivos

- 1) Determinar la implicación del gen *USH1C* en nuestra cohorte de pacientes diagnosticados de USH1 y estimar su prevalencia en población española.
- 2) Determinar la naturaleza patológica de las variantes identificadas en los genes USH1 mediante análisis de expresión, basados en minigenes y ARNm obtenido de células epiteliales nasales de pacientes.
- 3) Desarrollar una plataforma de secuenciación masiva para los genes responsables del USH, genes asociados y candidatos.



**III. ESTUDIO MOLECULAR DEL  
GEN *USH1C***



## 1. Contexto

El gen *USH1C* es uno de los seis genes identificados como responsables del USH1. La prevalencia de este gen se ha estimado alrededor del 6-7% en poblaciones estadounidense-inglesa y francesa (Ouyang *et al.*, 2005; Roux *et al.*, 2006), lo que indica que es una forma poco frecuente del USH1.

Sin embargo, en determinadas poblaciones la prevalencia de *USH1C* es muy superior al resto de genes USH.

En población acadiana presenta una prevalencia del 60%, debido a un efecto fundador. Ouyang *et al.* (2003) identificaron la mutación c.216G>A en el exón 3, la cual altera el *splicing*, originando una delección de 35 pares de bases (Lentz *et al.*, 2005). Además, este cambio se encuentra en desequilibrio de ligamiento con una variante conocida como 9VNTR(t,t) (*Variable Number of Tandem Repeats*) localizada en el intrón 5 (Savas *et al.*, 2002; Ouyang *et al.*, 2003). Esta variante, que en población normal suele tener entre 2 y 3 repeticiones, presenta, además de las 9 repeticiones, un cambio de nucleótido G>T en la octava posición de la última copia. La conjugación de estas dos mutaciones se conoce como “alelo acadiano”.

En diferentes poblaciones europeas, asiáticas y norte-americana se ha identificado la mutación c.238dup con relativa frecuencia. En población alemana e inglesa se halla en un 12,5-14% de los pacientes USH1, respectivamente. Sin embargo, no presenta un haplotipo común, considerándose la primera mutación recurrente del gen *USH1C* (Ebermann *et al.*, 2007b).

Recientemente, en población judío Yemenita se identificó la mutación fundadora c.1220delG en el exón alternativo 15, dando origen a un fenotipo atípico de USH1, caracterizado por una RP de inicio temprano e hipoacusia severa-moderada de inicio tardío. Esta mutación en el gen *USH1C* junto con otro efecto fundador en el gen *CERKL*, son responsables del 50% de los casos de RP de este grupo étnico (Khateb *et al.*, 2012).

Hasta la fecha, no se había realizado ningún análisis molecular del gen *USH1C* en población española. Este estudio ha permitido determinar las bases genéticas de la enfermedad y estimar la prevalencia de dicho gen en pacientes diagnosticados de USH1 de población española.



## 2. Artículo

### Novel mutations in the *USH1C* gene in Usher syndrome patients

María José Aparisi<sup>1</sup>, Gema García-García<sup>1</sup>, Teresa Jaijo<sup>1,2</sup>, Regina Rodrigo<sup>3</sup>, Claudio Graziano<sup>4</sup>, Marco Seri<sup>4</sup>, Tulay Simsek<sup>5</sup>, Enver Simsek<sup>6</sup>, Sara Bernal<sup>7,2</sup>, Montserrat Baiget<sup>7,2</sup>, Herminio Pérez-Garrigues<sup>8,2</sup>, Elena Aller<sup>1,2</sup>, José María Millán<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Enfermedades Neurosensoriales, Instituto de Investigación Sanitaria IIS-La Fe, Valencia, Spain. <sup>2</sup>CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia, Spain. <sup>3</sup>U.O. Genética Médica, Policlinico S. Orsola-Malpighi, Università di Bologna, Italy. <sup>4</sup>Ulucanlar Training and Research Eye Hospital, Ankara, Turkey. <sup>5</sup>Department of Pediatric Endocrinology, Ankara Training and Research Hospital, Ankara, Turkey. <sup>6</sup>Servicio de Genética, Hospital de la Santa Creu y Sant Pau, Barcelona, Spain. <sup>7</sup>Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain. <sup>8</sup>Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain.

*Molecular Vision*. 2010; 16:2948-2954

#### ABSTRACT

**Purpose:** Usher syndrome type I (USH1) is an autosomal recessive disorder characterized by severe-profound sensorineural hearing loss, retinitis pigmentosa, and vestibular areflexia. To date, five USH1 genes have been identified. One of these genes is Usher syndrome 1C (*USH1C*), which encodes a protein, harmonin, containing PDZ domains. The aim of the present work was the mutation screening of the *USH1C* gene in a cohort of 33 Usher syndrome patients, to identify the genetic cause of the disease and to determine the relative involvement of this gene in USH1 pathogenesis in the Spanish population.

**Methods:** Thirty-three patients were screened for mutations in the *USH1C* gene by direct sequencing. Some had already been screened for mutations in the other known USH1 genes (myosin VIIA [*MYO7A*], cadherin-related 23 [*CDH23*], protocadherin-related 15 [*PCDH15*], and Usher syndrome 1G [*USH1G*]), but no mutation was found.

**Results:** Two novel mutations were found in the *USH1C* gene: a non-sense mutation (p.C224X) and a frame-shift mutation (p.D124TfsX7). These mutations were found in a homozygous state in two unrelated USH1 patients.

**Conclusions:** In the present study, we detected two novel pathogenic mutations in the *USH1C* gene. Our results suggest that mutations in *USH1C* are responsible for 1.5% of USH1 disease in patients of Spanish origin (considering the total cohort of 65 Spanish USH1 patients since 2005), indicating that *USH1C* is a rare form of USH in this population.

## INTRODUCTION

Usher syndrome (USH; OMIM 276900-2; OMIM 276905; OMIM 605472) is an autosomal recessive disorder characterized by sensorineural hearing loss, variable vestibular dysfunction, and visual impairment due to retinitis pigmentosa (RP).

Usher syndrome is the most common form of deaf-blindness of genetic origin, representing 50% of cases [1]. This disease shows a prevalence of 3.2–6.2/100,000 people [2-4].

Three clinical types of USH (types I, II, and III; USH1, USH2, and USH3) are recognized mainly on the basis of the severity and progression of hearing loss and the age of onset of RP [5]. Usher syndrome type I (USH1) is the most severe form, and it is characterized by congenital profound deafness, vestibular areflexia, and prepubertal onset of RP. To date, seven loci (USH1B-USH1H) have been mapped and five genes have been identified: myosin VIIA (*MYO7A*; USH1B), Usher syndrome 1C (*USH1C*; USH1C), cadherin-related 23 (*CDH23*; USH1D), protocadherin-related 15 (*PCDH15*; USH1F), and Usher syndrome 1G (*USH1G*; USH1G; reviewed in Saihan et al. [6]).

The causative gene, *USH1C*, was identified by positional cloning [7,8] and encodes a protein, harmonin, containing post synaptic density protein (Psd-95), *Drosophila* disc large tumor suppressor (DigA) and zonula occludens-1 protein (ZO1) (PDZ) domains. This gene comprises 28 exons spanning approximately 51 kb of genomic DNA. It consists of 20 constitutive exons (exons 1 to 14, 22 to 26, and 28) and eight alternatively spliced exons (15 to 21 and 27) [9].

*USH1C* mutations are the main cause of USH1 in Acadian and Quebecois patients, due to a mutation founder effect [10,11]. However, the *USH1C* gene is only involved in 7% of USH1 cases in the USA and UK populations [12] and in 6% of the French population [13].

The aim of the present work was mutation screening of the *USH1C* gene in our cohort of USH patients, to identify the genetic cause of the disease and to determine the relative involvement of this gene in USH1 pathogenesis in the Spanish population.



## METHODS

### Subjects

Spanish subjects with Usher syndrome were mainly recruited from the Federación de Asociaciones de Afectados de Retinosis Pigmentaria del Estado Español (FAARPEE) and also from the ophthalmology and ear, nose, throat (ENT) services of several Spanish hospitals as part of a large study into the genetics of Usher syndrome in Spain.

This study involved 33 unrelated families that were clinically diagnosed with USH, 23 of which were diagnosed with USH1 (21 Spanish, one Italian, and one Turkish family) and ten of which were non-classified (nine Spanish and one Turkish family). Informed consent was obtained from all these patients, and this study followed the tenets of the Declaration of Helsinki.

Subjects were classified as USH1 on the basis of their clinical history and ophthalmologic, audiometric, and vestibular tests [2].

The *MYO7A*, *CDH23*, *PCDH15*, and *USH1G* genes were completely sequenced in 11 of these patients, and 19 were analyzed by microchip (Asper Biotech, Tartu, Estonia) for the molecular diagnosis of Usher syndrome. The genetic etiology of the disease in those individuals could not be determined from those previous investigations. The other three patients came to our laboratory at the time *USH1C* screening was implemented, and they had not undergone any previous screening or chip analysis.

### Mutation screening

Genomic DNA was extracted from leucocytes from peripheral blood samples. All 28 exons, including intron-exon boundaries of the *USH1C* gene, were amplified using primers previously described by Verpy et al. [8] with some modifications and standard PCR conditions (see Table 1). Amplification conditions were 95 °C 5 min followed by 35 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at an annealing temperature specific for each exon and 30 s at 72 °C.

**Table 1.** Primers for *USH1C* gene.

Exon	Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)
1	1D-N	CGACTCAGCACCTTCGACTC	271
	1R-N	TCCGGAGTCCCAGAAGCCTG	
2	2-D	GGTGGTCTGCATAGGTCTGA	375
	2-R	TCCAGGAGCCGTGAGCATC	

III. Estudio molecular del gen *USH1C*

3-4	3-4-D	AGTGGTCTACTCCATTCTCTAA	625
	3-4-R	CCGAAGGCTCAGAAAAGTGG	
5	5-D-N	TGCCACCTGAACCTGGGATC	276
	6-R	TAGAGCCTCCAGCCAGCCTCCAC	
5-8	5-8-D-N	GAGCATCGGTGGTGAGTCTG	1191-1461 (the length of the amplicon is variable for the presence of a VNTR)
	5-8-R-N	TGAGGAAGGGGAGGGCAATAG	
9	9D	GGCTGAAGAGGTAGGCAGTC	376
	9R	AGGGTCAAACATCCCCAGTC	
10-12	10-12-D	CCACCAGAGCTTTCCAACCTG	937
	10-12-R	ACAGCGGGCAGGAAGCAAG	
13-14	13-14-D	ATAACGTCCCCCAAACCAA	793
	13-14-R	CACCAAGGGCTATCCATCTA	
15	15-D-N	ACCTCACAGTCCCATGGAG	285
	15-R-N	CTGAAGCTGGGTGTCTGCAC	
16	16-D	TGTTCTGCAACCAAGGCAGG	350
	16-R	AACAGGCCAAGTCACACCATT	
17	17-D	GGCCTTCCTGTCCTAAACCTG	441
	17-R	GCTCACTCCACCCTTGATGC	
18-19	18-19-D	CCTTGAGGGCCAGTTGGAACA	1400
	18-19-R	GAGGACATGGGAAACAGCAGT	
20	20-D	GCCGCTCAGTAGTTTCTGTG	445
	20-R	CTGCATTTTTGTCCCACCTC	
21	21-D-N	AGGGACATTGGCACGGCAG	219
	21-R-N	GAAGTGGCACAGAGTGGGAG	
22-24	22-24-D	CCATTCATCCCCCTACTCC	1092
	22-24-R	GTGGTCACCTGTTTGCTTTC	
25	25-D	TTTCAGAACCCAGGCTCAG	316
	25-R	GGCATCCTATTGTGAGACC	
26	26-D	TAGAAACGTCCTCAGACCAT	339
	26-R	GCTTGGGCCATTCTTCAG	
27	27-D	GGAGCCCAGTGAAAGGAGAA	295
	27-R	GACGCCAGTCCAAAGAACCT	
28	28-D	TGCTCTGGCTGGGCTGAGT	628
	28-R	ATAGGGGCCACAAACCTTAT	

Exons 2, 3-4, 9, 10-12, 13-14, 16, 17, 18-19, 20, 22-24, 25, 26, 27, and 28 were amplified using primers previously described by Verpy et al. [8]. For exons 1, 5, 5-8, 15, and 21 new primers were designed.

PCR products were sequenced using manufacturer's recommendations (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). The sequences obtained were compared with the consensus sequence NM\_153676.2 for exons 1–14 and 16–28, and with the consensus sequence NM\_005709.2 for exon 15, using the BLAST program.

In those cases where mutations were detected, we performed segregation analysis. For the construction of family trees, we used Cyrillic version 2.02 software (Oxfordshire, UK).

### **Computational analysis of splicing variants**

To analyze the effect of variants in the splice prediction and the structure of donor and acceptor sites, in silico analyses were performed. Three programs were used: Spliceview (The National Research Council, Institute for Biomedical Technologies, Milan, Italy), NNSPLICE 0.9 from the Berkeley Drosophila Genome Project, and Human Splicing Finder, Version 2.4 (French Institute of Health and Medical Research, Inserm U827, Montpellier, France).

### **Computational analysis of missense variants**

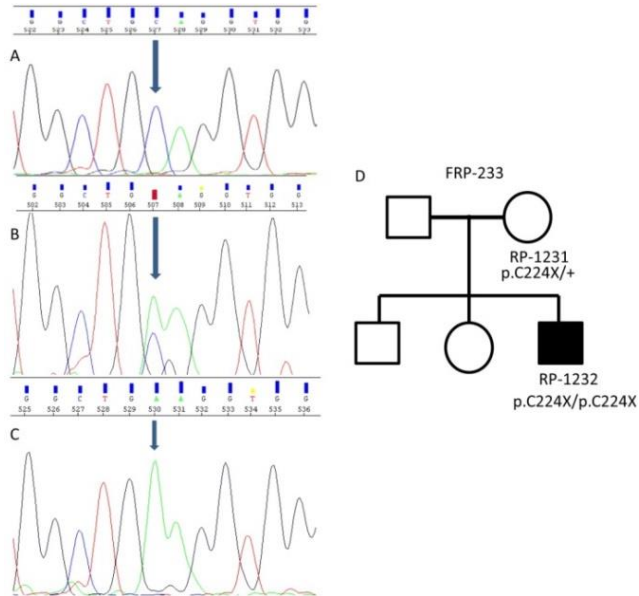
The predicted effect of each missense variant was studied using three different analysis programs: Sort Intolerant From Tolerant (SIFT; J. Craig Venter Institute, San Diego, CA), which predicts whether a change is innocuous or deleterious; Pmut (Institut de Recerca Biomedica, Barcelona, Spain), which predicts if an amino acid change is neutral or pathologic; and PolyPhen (the polymorphism phenotyping program; Bork Group, Heidelberg, Germany), which estimates the consequence of an amino acid substitution as being possibly deleterious or deleterious.

## **RESULTS**

### **Mutation analysis**

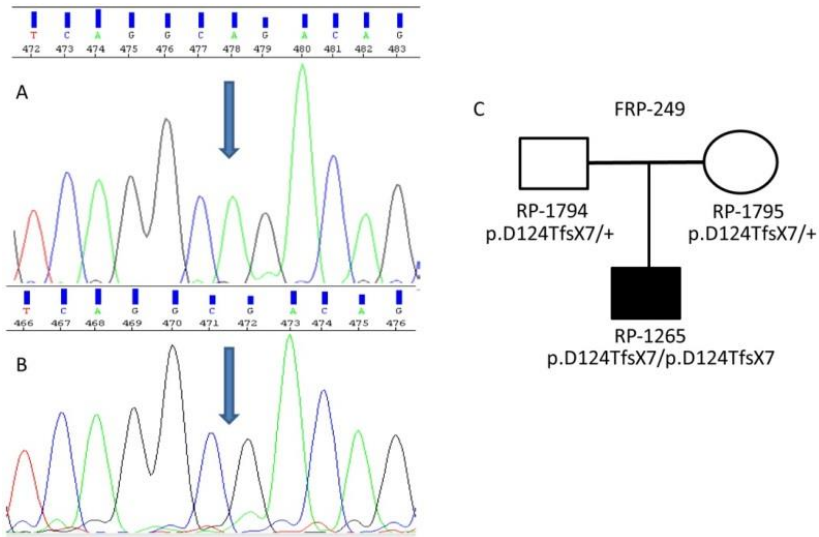
Mutation screening was performed on members of 33 USH families. As a result, two clearly pathogenic, novel mutations were identified in the *USH1C* gene.

The first novel mutation identified was a non-sense mutation in exon 8, p.C224X (c.672C>A). This mutation was found in a homozygous state in a Spanish USH1 patient (family FRP-233; patient RP-1232). Segregation analysis showed that the patient's healthy mother carried the mutation in a heterozygous state (Figure 1).



**Figure 1.** Segregation analysis of the mutation  $c.672C>A$  (p.C224X) identified in family FRP-233. **A:** Electropherogram corresponding to the wild type sequence ( $c.672C$ ). **B:** Electropherogram corresponding to the healthy mother, carrying the mutation in heterozygous state ( $c.672C>A$ ). **C:** Electropherogram corresponding to the patient, carrying the mutation in homozygous state ( $c.672A$ ). Blue arrow indicates position  $c.672$  is in **A**, **B** and **C**, **D:** Family tree showing the segregation of the p.C224X mutation.

The second novel mutation was a frame-shift mutation, p.D124TfsX7 ( $c.369delA$ ). This mutation was identified in an Italian *USH1* patient (family FRP-249; patient RP-1265) in exon 4 in a homozygous state. Segregation analysis confirmed that this mutation co-segregates with the disease, and this deletion was detected in the patient's healthy parents in a heterozygous state (Figure 2).



**Figure 2.** Segregation analysis of the mutation c.369delA (p.D124TfsX7) identified in family FRP-249. **A:** Electropherogram corresponding to the wild type sequence (blue arrow indicating c.369A nucleotide position). **B:** Electropherogram corresponding to the patient, carrying the mutation in homozygous state (c.369delA). **C:** Family tree showing the segregation of the p.D124TfsX7 mutation.

*USH1C* gene mutation screening allowed us to detect 47 additional sequence variants, 25 of which had previously been reported as presumably non-pathogenic (see Table 2).

**Table 2.** Novel DNA sequence variants in the *USH1C* gene identified from our cohort of 33USH patients.

Exonic variants				
Exon	Nucleotide change	Amino acid change	SNPs	Allele frequency
7	c.569C>T	p.S190L		1/66
14	c.1136G>A	p.G379D		1/66
Intronic variants				
Intron	Nucleotide change		SNPs	Allele frequency
2	c.104+23T>C			5/66
	c.105-54T>G			4/66
5	c.496+33A>G		rs12795083	8/66
	c.496+66G>T		rs45552041	5/66
	c.497-104A>G			6/66
	c.497-72G>T		rs28671305	4/66
7	c.580-51T>C		rs36001077	4/66

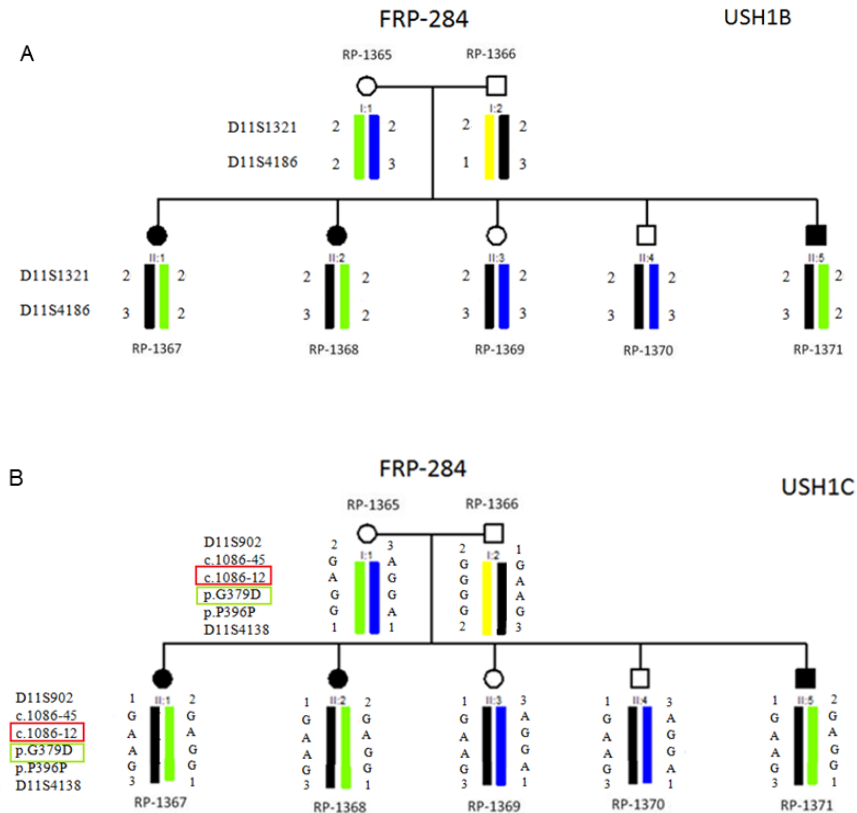
### III. Estudio molecular del gen *USH1C*

9	c.760-66T>C		rs4757539	19/66
10	c.819+10G>C		rs41282936	1/66
	c.819+66A>G			3/66
13	c.1086-12G>A		rs11024318	2/66
25	c.2490+56G>C			1/66
	c.2491-100C>G			1/66
26	c.2547-21T>C			1/66
	c.2547-11T>C		rs10832795	26/66
27	c.2656-47C>T		rs2072225	9/66
28	c.3141+215A>G			25/66
	c.3141+190C>T			25/66
	c.3141+49T>C			24/66
	c.*420_423delAACA 3'UTR			2/66

Two novel missense variants, p.S190L and p.G379D, were identified in our cohort with a low allele frequency. We performed computational analysis with the programs SIFT, PolyPhen, and Pmut to infer the pathologic effect of these variants. These programs generated contradictory results. The SIFT program predicted that the substitution of a serine for a lysine in codon 190 (p.S190L) of the protein would affect its function (score of 0.02; normalized probabilities less than 0.05 are predicted to be deleterious; those greater than or equal to 0.05 are predicted to be tolerated), but that the change from glycine to aspartic acid in codon 379 (p.G379D) would not alter protein function (score of 0.43). Conversely, the program Pmut predicted that change p.S190L would not alter protein function, but that change p.G379D was pathologic. Finally, the program PolyPhen predicted that both substitutions possibly affected protein function.

An intronic variant, c.1086-12G>A, was identified in a homozygous state in three affected patients of one Turkish family (FRP-284; patients RP-1367, RP-1368, and RP-1371). This family was described as clinically compatible with *USH2* by Simsek et al. [14]. However, we performed a linkage analysis for all known loci so far implicated in the Usher syndrome (data not shown), and we were able to discard linkage to all of them except for *USH1B* and *USH1C* (Figure 3). The haplotype analysis of the *USH1B* locus was limited because it was based only on one informative marker. However, the involvement of this locus was reduced by mutation screening of the *MYO7A* gene [15]. Thus, we included this family in the *USH1C* mutation screening. The analyses of predictions of the effects of the variant c.1086-12G>A indicated that the acceptor site would not be recognized (Spliceview) and that the score for acceptor site recognition would be reduced slightly from 48 to 45 and from 83.79 to 83.6 for NNSPLICE and Human Splicing Finder, respectively. In addition, we looked for this change at the NCBI dbSNP. This variant (rs11024318) has an allele frequency of G (98.3%) and A (1.7%) in the European population (HapMap-

Ceu/ss52068547), and it is present in a homozygous state in 8.7% of an African-American population (AFD\_EUR\_PANEL/ss23639768) and in 6.1% of a sub-Saharan African population (HapMap-YRI/ss52068547).



**Figure 3.** Linkage analysis for the *USH1B* and *USH1C* loci in the family FRP-284. **A:** Linkage analysis for the *USH1B* locus. The three affected patients of this family (RP-1367, RP-1368 and RP-1371) shares the same haplotype. For this locus, only one informative marker has been used (D11S4186). The distance of this marker to the *MYO7A* gene is 42,161 bp. **B:** Linkage analysis for the *USH1C* locus. The three affected patients of this family (RP-1367, RP-1368 and RP-1371) shares the same haplotype. For this locus we used two informative extragenic markers (D11S902 and D11S4138) and two intragenic markers (c.1086–45G>A and p.P396P). The distances from D11S902 and D11S4138 to the *USH1C* gene are 26,790 bp and 189,788 bp, respectively. The segregation analysis for the variants c.1086–12G>A (red) and p.G379D (green) is also shown.

In the present work, we performed a mutation screening of the *USH1C* gene by direct sequencing in 33 USH patients. Thirty of the individuals were of Spanish origin; 21 of them were clinically USH1, but we could not obtain sufficient clinical data to classify the remaining nine individuals. As a result, we only detected two clearly pathogenic mutations in two USH1 families of Italian and Spanish origins. These results indicate that mutations in *USH1C* are responsible for 1.5% of incidences of USH1 in patients of Spanish origin (considering the total cohort of 65 Spanish USH1 patients that have been studied since 2005 for the five USH1 genes [16-19]). This would suggest that *USH1C* is a rare form of USH in this population.

## DISCUSSION

To date, few mutation screenings for the *USH1C* gene have been performed. Among them, only the studies performed by Ouyang et al. [12] and Roux et al. [13] were formal molecular epidemiological studies. These authors reported the *USH1C* gene as responsible for the disease in 7% of cases in a cohort of UK and USA patients, and in 6% of the French USH1 population, respectively.

Eleven clearly pathogenic mutations have so far been described in the *USH1C* gene [20]. These mutations are distributed along the entire gene, without the existence of hot spots.

In the present work, the two novel mutations, p.C224X and p.D124TfsX7, were identified in a homozygous state—the former in a Spanish family and the latter in an Italian family. Both families were diagnosed as USH1, and both possessed a possible consanguineous background, since the parents of the patients came from small villages in Spain and Sardinia.

Two novel missense variants, p.S190L and p.G379D, were found in a heterozygous state. The p.S190L variant was found in the same patient (RP-1232) that possessed mutation p.C224X in a homozygous state, although in this patient, mutation p.C224X alone was sufficient to cause the disease. The p.G379D variant was identified in three affected members of the same Turkish family (RP-1367, RP-1368, and RP-1371), where we also found the nucleotide change c.1086-12G>A (Figure 3B). The nucleotide change c.1086-12G>A is predicted to abolish a splicing site, based on results from the in silico analysis program, Spliceview. However, we found this change as an SNP (rs11024318) in the NCBI SNP database. Thus, the predicted splicing effect is not evidence for a pathologic effect of this variant.



The results of this study show that the *USH1C* gene has a very low mutation prevalence compared with other USH1 genes. In the total cohort of 65 Spanish USH1 patients, the *MYO7A* gene is involved in 35.4% of cases, *CDH23* in 15.4%, *PCDH15* in 10.8%, and *USH3A* in 3%. No mutations have been described from *USH1G* ([15-19] and data not shown). The *USH1C* gene mutations represent 1.5% of cases.

Thus, 33.8% of our USH1 patients remain genetically uncharacterized. We cannot exclude (1) the possibility of the presence of large rearrangements undetectable by PCR, as has been reported for the *PCDH15* gene [21,22] (2) the presence of mutations responsible for clinical type I in USH2 genes (3) the presence of mutations located in promoter regions or introns far from the consensus sequences of splicing and (4) mutations associated with USH1 in still unknown genes in these unsolved cases. The genes coding for proteins involved in the “Usher protein network” and other genes with expression profiles in the retina and inner ear are excellent candidates. Consequently, mutation screening of these genes will facilitate determination as to whether some are implicated in the disease.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to the participating patients and their relatives, FAARPEE, ONCE and La Caixa-Camp de Morvedre. This work was supported by a grant from Conselleria de Sanitat de la Comunitat Valenciana GE039/09 and grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation PI08/90311 and PI07/0558 and by European Regional Development Fund. CIBERER is an initiative of the Institute of Health Carlos III from the Spanish Ministry of Science and Innovation. R. Rodrigo has a Contrato-Investigador SNS Miguel Servet (CP09/118) from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación. We acknowledge Prof. Dr. Hanno J. Bolz for providing *USH1C* sequence primers. This study was presented as a poster at the International Meeting of the European Science Foundation (Rare Diseases II: Hearing and sight loss, 22–27 November 2009 Sant Feliu de Guixols, Spain) and the International Meeting of the SIRCOVA (19 June 2010, Valencia, Spain).

## REFERENCES

1. Vernon M. Sociological and psychological factors associated with hearing loss. *J Speech Hear Res.* 1969; 12:541-63. [PMID: 4900022]
2. Hope CI, Bunday S, Proops D, Fielder AR. Usher syndrome in the city of Birmingham-prevalence and clinical classification. *Br J Ophthalmol.* 1997; 81:46-53. [PMID: 9135408]
3. Kimberling WJ, Weston MD, Möller C, van Aarem A, Cremers CW, Sumegi J, Ing PS, Connolly C, Martini A, Milani M, Tamayo ML, Bernal J, Greenberg J, Ayuso C. Gene mapping of Usher syndrome type IIa: localization of the gene to a 2.1 –cM segment on chromosome 1q41. *Am J Hum Genet.* 1995; 56:216-23. [PMID: 7825581]
4. Espinós C, Millan JM, Beneyto M, Najera C. Epidemiology of Usher syndrome in Valencia and Spain. *Community Genet.* 1998; 1:223-8. [PMID: 15178965]
5. Davenport SLH, Omenn GS. The heterogeneity of Usher Syndrome. Amsterdam Excerpta Media Foundation. International Congress ser abstr. 1977; 215:87–88.
6. Saihan Z, Webster AR, Luxon L, Bitner-Glindzicz M. Update on Usher syndrome. *Curr Opin Neurol.* 2009; 22:19-27. [PMID: 19165952]
7. Bitner-Glindzicz M, Lindley KJ, Rutland P, Blaydon D, Smith VV, Milla PJ, Hussain K, Furth-Lavi J, Cosgrove KE, Shepherd RM, Barnes PD, O'Brien RE, Farndon PA, Sowden J, Liu XZ, Scanlan MJ, Malcolm S, Dunne MJ, Aynsley-Green A, Glaser B. A recessive contiguous gene deletion causing infantile hyperinsulinism, enteropathy and deafness identifies the Usher type 1C gene. *Nat Genet.* 2000; 26:56-60. [PMID: 10973248]
8. Verpy E, Leibovici M, Zwaenepoel I, Liu XZ, Gal A, Salem N, Mansour A, Blanchard S, Kobayashi I, Keats BJ, Slim R, Petit C. A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C. *Nat Genet.* 2000; 26:51-5. [PMID: 10973247]
9. Zwaenepoel I, Verpy E, Blanchard S, Meins M, Apfelstedt-Sylla E, Gal A, Petit C. Identification of three novel mutations in the *USH1C* gene and detection of thirty-one polymorphisms used for haplotype analysis. *Hum Mutat.* 2001; 17:34-41. [PMID: 11139240]
10. Savas S, Frischhertz B, Pelias MZ, Batzer MA, Deininger PL, Keats BB. The *USH1C* 216G→A mutation and the 9-repeat VNTR(t,t) allele are in complete linkage disequilibrium in the Acadian population. *Hum Genet.* 2002; 110:95-7. [PMID: 11810303]
11. Ebermann I, Lopez I, Bitner-Glindzicz M, Brown C, Koenekoop RK, Bolz HJ. Deafblindness in French Canadians from Quebec: a predominant founder mutation in the *USH1C* gene provides the first genetic link with the Acadian population. *Genome Biol.* 2007; 8:R47 [PMID: 17407589]

12. Ouyang XM, Yan D, Du LL, Hejtmancik JF, Jacobson SG, Nance WE, Li AR, Angeli S, Kaiser M, Newton V, Brown SD, Balkany T, Liu XZ. Characterization of Usher syndrome type I gene mutations in an Usher syndrome patient population. *Hum Genet.* 2005; 116:292-9. [PMID: 15660226]
13. Roux AF, Faugère V, Le Guédard S, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Chambert S, Marlin S, Hamel C, Gilbert B, Malcolm S, Claustres M, French Usher Syndrome Collaboration.. Survey of the frequency of *USH1* gene mutations in a cohort of Usher patients shows the importance of cadherin 23 and protocadherin 15 genes and establishes a detection rate of above 90%. *J Med Genet.* 2006; 43:763-8. [PMID: 16679490]
14. Simsek T, Ozdamar Y, Simsek E, Men G. Usher Syndrome Associated With a Variant of Dandy-Walker Malformation. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 2009; 10:1-4. [PMID: 19681502]
15. Jaijo T, Aller E, Beneyto M, Najera C, Graziano C, Turchetti D, Seri M, Ayuso C, Baiget M, Moreno F, Morera C, Perez-Garrigues H, Millan JM. *MYO7A* mutation screening in Usher syndrome type I patients from diverse origins. *J Med Genet.* 2007; 44:e71 [PMID: 17361009]
16. Jaijo T, Aller E, Oltra S, Beneyto M, Nájera C, Ayuso C, Baiget M, Carballo M, Antiñolo G, Valverde D, Moreno F, Vilela C, Perez-Garrigues H, Navea A, Millán JM. Mutation profile of the *MYO7A* gene in Spanish patients with Usher syndrome type I. *Hum Mutat.* 2006; 27:290-1. [PMID: 16470552]
17. Jaijo T, Aller E, García-García G, Aparisi MJ, Bernal S, Avila-Fernández A, Barragán I, Baiget M, Ayuso C, Antiñolo G, Díaz-Llopis M, Külm M, Beneyto M, Nájera C, Millán JM. Microarray-based mutation analysis of 183 Spanish families with Usher syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51:1311-7. [PMID: 19683999]
18. Oshima A, Jaijo T, Aller E, Millan JM, Carney C, Usami S, Moller C, Kimberling WJ. Mutation profile of the *CDH23* gene in 56 probands with Usher syndrome type I. *Hum Mutat.* 2008; 29:E37-46. [PMID: 18429043]
19. Aller E, Jaijo T, Beneyto M, Nájera C, Morera C, Pérez-Garrigues H, Ayuso C, Millán J. Screening of the *USH1G* gene among Spanish patients with Usher syndrome. Lack of mutations and evidence of a minor role in the pathogenesis of the syndrome. *Ophthalmic Genet.* 2007; 28:151-5. [PMID: 17896313]
20. Baux D, Faugère V, Larrieu L, Le Guédard-Méreuze S, Hamroun D, Bérout C, Malcolm S, Claustres M, Roux AF. UMD-USHbases: a comprehensive set of databases to record and analyse pathogenic mutations and unclassified variants in seven Usher syndrome causing genes. *Hum Mutat.* 2008; 29:E76-87. [PMID: 18484607]
21. Le Guédard S, Faugère V, Malcolm S, Claustres M, Roux AF. Large genomic rearrangements within the *PCDH15* gene are a significant cause of *USH1F* syndrome. *Mol Vis.* 2007; 13:102-7. [PMID: 1727737]

III. Estudio molecular del gen *USH1C* \_\_\_\_\_

22. Aller E, Jaijo T, García-García G, Aparisi MJ, Blesa D, Díaz-Llopis M, Ayuso C, Millán JM. Identification of large rearrangements of the PCDH15 gene by combined MLPA and a CGH: large duplications are responsible for Usher syndrome. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010; 51:5480-5. [PMID: 20538994]

## **IV. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE VARIANTES USH1**



## 1. Contexto

Los análisis de expresión han permitido determinar la implicación patológica de aquellas variantes identificadas en los rastreos mutacionales cuya naturaleza es incierta (mutaciones *missense*, silenciosas o intrónicas), observando si afectan o no al procesamiento del ARNm o *splicing*.

Son muchos los estudios de expresión que se han realizado en diferentes enfermedades a lo largo del tiempo, siendo los minigenes una de las técnicas más utilizadas (Tran *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2007; Bottillo *et al.*, 2007; Rebeh *et al.*, 2010; Jaijo *et al.*, 2011). Esta metodología se ha empleado, sobre todo, en aquellos casos donde la obtención de tejido del paciente era muy complicada por los perfiles de expresión de los genes causantes de la enfermedad.

Los genes responsables del USH se expresan, principalmente, en las células ciliadas del oído interno y en los fotorreceptores de la retina u otros tejidos de difícil acceso. Sin embargo, el equipo de Vaché *et al.* (2010) pudo comprobar la presencia de transcritos USH en muestras de ARN obtenidas de células epiteliales nasales.

En el presente estudio, hemos determinado la naturaleza de 18 variantes USH1 presuntamente implicadas en un procesamiento anómalo del ARNm, tras un previo análisis bioinformático, mediante la utilización de minigenes. Además, se ha realizado un análisis de ARN de 8 transcritos USH1, a partir de muestras de células epiteliales nasales de pacientes, con el objetivo de corroborar el efecto observado en minigenes. Hemos confirmado la necesidad e importancia de los ensayos de expresión y de los análisis de ARN para determinar el efecto patológico de las diferentes variantes identificadas sobre el mecanismo de *splicing*. Asimismo, se ha determinado el patrón y la frecuencia del batido ciliar de estas células epiteliales nasales de pacientes diagnosticados de USH1.





## 2. Artículo

### Study of USH1 Splicing Variants through Minigenes and Transcript Analysis from Nasal Epithelial Cells

María José Aparisi<sup>1</sup>, Gema García-García<sup>1</sup>, Elena Aller<sup>1,2</sup>, María Dolores Sequedo<sup>1</sup>, Cristina Martínez-Fernández de la Cámara<sup>1</sup>, Regina Rodrigo<sup>1</sup>, Miguel Armengot<sup>3</sup>, Julio Cortijo<sup>4,5,6</sup>, Javier Milara<sup>5,7,8</sup>, Manuel Díaz-LLopis<sup>9</sup>, Teresa Jaijo<sup>1,2</sup>, José María Millán<sup>1,2,10</sup>.

<sup>1</sup>Research Group on Sensorineural Diseases, Instituto de Investigación Sanitaria IIS - La Fe, Valencia, Spain. <sup>2</sup>Biomedical Network Research Center for Rare Diseases (CIBERER), Valencia, Spain. <sup>3</sup>Rhinology Unit, General and University Hospital, Medical School, Valencia University, Valencia, Spain. <sup>4</sup>Research Foundation of the University General Hospital of Valencia, Valencia, Spain. <sup>5</sup>Biomedical Network Research Center for Respiratory Diseases (CIBERES), Valencia, Spain. <sup>6</sup>University of Valencia, Valencia, Spain, <sup>7</sup>Clinical Pharmacology Unit, University Clinic Hospital, Valencia, Spain. <sup>8</sup>Research Unit, University General Hospital Consortium, Valencia, Spain. <sup>9</sup>Department of Ophthalmology, La Fe University Hospital, Medical School, Valencia University, Valencia, Spain. <sup>10</sup>Genetics Unit, La Fe University Hospital, Valencia, Spain.

*PLoS One.* 2013; 8(2): e57506.

#### ABSTRACT

Usher syndrome type I (USH1) is an autosomal recessive disorder characterized by congenital profound deafness, vestibular areflexia and prepubertal retinitis pigmentosa. The first purpose of this study was to determine the pathologic nature of eighteen USH1 putative splicing variants found in our series and their effect in the splicing process by minigene assays. These variants were selected according to bioinformatic analysis. The second aim was to analyze the USH1 transcripts, obtained from nasal epithelial cells samples of our patients, in order to corroborate the observed effect of mutations by minigenes in patient's tissues. The last objective was to evaluate the nasal ciliary beat frequency in patients with USH1 and compare it with control subjects. *In silico* analysis were performed using four bioinformatic programs: *NNSplice*, *Human Splicing Finder*, *NetGene2* and *Spliceview*. Afterward, minigenes based on the pSPL3 vector were used to investigate the implication of selected changes in the mRNA processing. To observe the effect of mutations in the patient's tissues, RNA was extracted from nasal epithelial cells and RT-PCR analyses were performed. Four *MYO7A* (c.470G>A, c.1342\_1343delAG, c.5856G>A and c.3652G>A), three *CDH23* (c.2289+1G>A, c.6049G>A and c.8722+1delG) and one *PCDH15* (c.3717+2dupT) variants were observed to affect the splicing process by minigene assays and/or transcripts analysis obtained from nasal cells. Based on our results, minigenes are a good approach to determine the implication of

identified variants in the mRNA processing, and the analysis of RNA obtained from nasal epithelial cells is an alternative method to discriminate neutral Usher variants from those with a pathogenic effect on the splicing process. In addition, we could observe that the nasal ciliated epithelium of USH1 patients shows a lower ciliary beat frequency than control subjects.

## INTRODUCTION

Usher syndrome (USH) is an autosomal recessive disorder characterized by sensorineural hearing loss, retinitis pigmentosa (RP) and variable vestibular dysfunction. USH is clinically and genetically heterogeneous and is the most common form of deaf-blindness of genetic origin, representing 50% of cases [1]. This disease shows a prevalence of 3.2–6.2/100000 [2], [3], [4].

Three clinical types of USH (types I, II and III; USH1, USH2 and USH3) are recognized, mainly on the basis of the severity and progression of hearing loss, the age of onset of RP and the presence of vestibular dysfunction [5].

Usher syndrome type I (USH1) is the most severe form of the disease and it is characterized by congenital profound deafness, vestibular areflexia and prepubertal onset of retinitis pigmentosa. To date, nine loci (USH1B-USH1K) have been mapped and six genes have been identified: *MYO7A* (USH1B): MIM#276903; *USH1C* (USH1C): MIM# 605242; *CDH23* (USH1D): MIM# 605516; *PCDH15* (USH1F): MIM# 605514; *USH1G* (USH1G): MIM# 607696; and *CIB2* (USH1J): MIM# 605564 [reviewed in 6], [7], [8].

Many mutations in *MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15* and *USH1G* have been identified by several screenings performed in USH1 patients ([http://grenada.lumc.nl/LOVD2/Usher\\_montpellier/](http://grenada.lumc.nl/LOVD2/Usher_montpellier/)). The consequences of missense, silent and intronic changes many times are unknown and additional studies are needed to know the pathogenicity of these variants.

The use of minigene assays has been shown to be a useful approach to determine the effect of these variants on the splicing process, when genes present a restricted expression profile (photoreceptors and inner hair cells, in the case of USH) and human specific tissue samples are difficult to obtain [9].

Cohn et al. [10] demonstrated the presence of eight Usher proteins in nasal ciliated epithelium using immunochimistry with fluorescent antibodies. Subsequently, Vaché et al. [11] provided evidence that splicing mutations occurring in most USH genes can be identified through *ex vivo* analysis of mRNA from nasal epithelial cells.

On the other hand, the cilium in photoreceptors appears ultrastructurally and molecularly very similar to the nasal ciliated epithelium. The cilia are distributed around the human body and it has been reported that an abnormality in ciliary function may be linked to the nasal cilia abnormalities, as well as to the retinal degeneration [12]. There is evidence that immotile nasal cilia can be associated with USH1 [13].

In our cohort of patients, we identified different pathogenic variants and some putative splicing mutations in USH1 genes [14], [15], [16], [17], [18].

The first purpose of the present work was to determine the pathogenic nature of selected variants and their effect in the splicing process by minigene assays. The second aim was to analyze the USH1 transcripts, obtained from the nasal epithelium cells of our patients, in order to corroborate the observed effect of mutations by minigenes in patient's tissues. The third goal of this study was to evaluate the nasal ciliary beat frequency in eight USH1 patients and compare it with thirty control subjects.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Ethics Statement**

This study was approved by the ethic committees of the Instituto de Investigación Sanitaria IIS-La Fe (Valencia, Spain) and the General and University Hospital (Valencia, Spain). Written consent was obtained from all subjects. Clinical investigation was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

### **Selection of Variants**

The first selection of sequence variations for functional studies was carried out on the following criteria: variants found in a homozygous state or in trans with a disease-causing mutation, cosegregation with the disease, not found in 200 control chromosomes or sequence variation located in exon or introns that may affect the mRNA processing. All changes have been characterized in our cohort of patients.

### **Computational Analysis of Splicing Variants**

To analyze the effect of variants in the splice prediction and the recognition of donor and acceptor sites, *in silico* analyses were performed. Four programs were used: Neural Network SPLICE (*NNSplice*) 0.9 from the Berkeley Drosophila Genome Project (available at [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)), *Human Splicing Finder (HSF)*-Version 2.4 (available at <http://www.umd.be/HSF/>), *NetGene2* (available at

<http://www.cbs.dtu.dk/service/NetGene2/>) and *Spliceview* (available at [http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview\\_ex.html](http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview_ex.html)). Score-values were calculated taking into account the bioinformatic predictions, from 1 to 4, depending on how many of the four programs have predicted changes on the splice sites.

### **Minigene Constructions and Expression**

Minigene constructions based on the pSPL3 exon trapping vector (kindly provided by Dr. I Botillo and Dr. S. Tuffery-Giraud) were used to investigate the implication of selected variants on the mRNA processing. These variants were selected based on the bioinformatic predictions.

For these putative splicing variants, the exon and intronic flanking sequences were amplified from the patient's DNA, using the High Fidelity Phusion polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland) with primers detailed in Table 1. Amplicons were inserted between the XhoI/NheI restriction sites, using T4 DNA ligase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). We only could obtain the wild type (WT) insert for the variant c.3717+2dupT (*PCDH15*) and the mutant insert for changes c.3652G>A and c.5581C>T (*MYO7A*), c.1086-12G>A (*USH1C*), c.8722+1delG (*CDH23*) and c.1304\_1305insC, c.2868+5G>A and c.1737C>G (*PCDH15*). The corresponding WT or mutant insert was obtained by site-directed mutagenesis using primers detailed in Table 2. Minigene constructions were confirmed by direct sequencing in both directions with BigDye Terminator 3.1 cycle sequencing kit from Applied Biosystems (Carlsbad, USA). Sequence reactions were analyzed on a capillary ABI 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Afterwards, minigenes were transfected into COS-7 cells as described before by Jaijo et al. [19]. RNA extraction and RT-PCR analysis was performed as previously described [20], [21]. All experiments were performed in duplicate.

**Table 1.** Primers used to amplify the specific insert.

Sequence variant	Primer	Sequence 5'->3'	Size (bp)
c.6_9dup (p.L4DfsX39) <i>MYO7A</i>	L4DfsX39_D_XhoI	<i>AAGAAT CTCGAG</i> AGTGGCTGAGAGAAGAATTC	563
	L4DfsX39_R_NheI	<i>AAGAAT GCTAGC</i> GGATCCAGAGATGTGTGTAA	
c.470G>A (p.S157N) <i>MYO7A</i>	S157N_D_XhoI	<i>AAGAAT CTCGAG</i> AGACTCCACCTCCCTCTCA	668
	S157N_R_NheI	<i>AAGAAT GCTAGC</i> GCTAATGTGAGCTTTGGTAGC	
c.640G>A (p.G214R) <i>MYO7Ac.721C&gt;G</i> (p.R241G) <i>MYO7A</i>	G214R & R241G_D_XhoI	<i>AAGAAT CTCGAG</i> GAAGGTGAAGGAGAGTGCG	703
	G214R & R241G_R_NheI	<i>AAGAAT GCTAGC</i> TTCATGGTGGGATTCCAGC	
c.1097T>C (p.L366P) <i>MYO7A</i>	L366P_D_XhoI	<i>AAGAAT CTCGAG</i> TGACATGCTGGAGGGAGTTA	608
	L366P_R_NheI	<i>AAGAAT GCTAGC</i> CTGACCAAAGCAGGCCAAAA	
c.1342_1343delAG (p.S448LfsX2) <i>MYO7A</i>	S448LfsX2_D_XhoI	<i>AAGAAT CTCGAG</i> TCTCCAGGCAGAGGGAACAG	524
	S448LfsX2_R_NheI	<i>AAGAAT GCTAGC</i> AGCCAGGCTCAGCTGACCTT	
c.3508G>A (p.E1170K) <i>MYO7A</i>	E1170K_D_XhoI	<i>AAGAAT CTCGAG</i> GAGGTGCTTTATGCCCGATG	545
	E1170K_R_NheI	<i>AAGAAT GCTAGC</i> GAGTGTGGGGAAAAGAGGTG	
c.3652G>A (p.G1218R) <i>MYO7A</i>	G1218R_D_XhoI	<i>AAGAAT CTCGAG</i> ATAGATGGTGGAGCTGAGAG	370
	G1218R_R_NheI	<i>AAGAAT GCTAGC</i> GCACTGGACACACACACACA	
c.5581C>T (p.R1861X) <i>MYO7A</i>	R1861X_D_XhoI	<i>AAGAAT CTCGAG</i> ACTAGTGCATCTGGCTGTC	543
	R1861X_R_NheI	<i>AAGAAT GCTAGC</i> ATCCTGAGCAGCTGCAGGAT	
c.1086-12G>A <i>USH1C</i>	USH1C_D_XhoI	<i>AAGAAT CTCGAG</i> ACAAGCTCGGGGACTTTGCT	438
	USH1C_R_NheI	<i>AAGAAT GCTAGC</i> ATGGTCTCTGACCCACAGCT	
c.2289+1G>A <i>CDH23</i>	c.2289_D_XhoI	<i>AAGAAT CTCGAG</i> CAAATATTTCTCTCATGG	636
	c.2289_R_NheI	<i>AAGAAT GCTAGC</i> GCAGGAGAGAAAGTATTTCA	
c.6049G>A (p.G2017S) <i>CDH23</i>	G2017_D_XhoI	<i>AAGAAT CTCGAG</i> CTTGCTCACCCTCTCATGT	594
	G2017_R_NheI	<i>AAGAAT GCTAGC</i> GTATCGTCTCCAAGCCTCTT	

IV. Análisis de expresión de variantes USH1

Sequence variant	Primer	Sequence 5'->3'	Size (bp)
c.8722+1delG <i>CDH23</i>	c.8722_D_XhoI	<b>AAGAAT</b> <i>CTCGAG</i> TTCTGGGCAACACTCCGTGA	1226
	c.8722_R_NheI	<b>AAGAAT</b> <i>GCTAGC</i> GGATGGACGGATAACTAATGG	
c.1304_1305insC <i>PCDH15</i>	c.1304_D_XhoI	<b>AAGAAT</b> <i>CTCGAG</i> CAGAAGACTGAAGCAATTAAGCC	647
	c.1304_R_NheI	<b>AAGAAT</b> <i>GCTAGC</i> ATATACTGAATATCTGCAAGCTG	
c.2868+5G>A <i>PCDH15</i>	c.2868_D_XhoI	<b>AAGAAT</b> <i>CTCGAG</i> ATTCCAGTGG AACGGCCTTC	533
	c.2868_R_NheI	<b>AAGAAT</b> <i>GCTAGC</i> TATGCTCTGTACCTGTGGATG	
c.3717+2dupT <i>PCDH15</i>	c.3717_D_XhoI	<b>AAGAAT</b> <i>CTCGAG</i> CAGAATTATACCTATGTCCC	635
	c.3717_R_NheI	<b>AAGAAT</b> <i>GCTAGC</i> AGTGACTAACAACTCTGAGTG	
c.521A>G (p.N174S) <i>PCDH15</i>	N174S_D_XhoI	<b>AAGAAT</b> <i>CTCGAG</i> TTCTTCGCCCATAGCAAGA	605
	N174S_R_NheI	<b>AAGAAT</b> <i>GCTAGC</i> TGAGGCATATTATACCTATG	
c.1737C>G (p.Y579X) <i>PCDH15</i>	Y579X_D_XhoI	<b>AAGAAT</b> <i>CTCGAG</i> AGTATTGTAACAGGACACAG	596
	Y579X_R_NheI	<b>AAGAAT</b> <i>GCTAGC</i> CCTCTGATATTGTCTCTTC	

Tails added at the beginning of the primer are indicated in bold.

Enzyme restriction sites used in this study are indicated in italics.

**Table 2.** Primers used for the site-directed mutagenesis.

Sequence variants	Primer	Sequence 5'->3'
c.3717+2dupT <i>PCDH15</i> WT	c.3717-D-WT	GCAAAGCCGATGTACTCGT- AAGTAGATAAAACTTCAGG
	c.3717-R-WT	CCTGAAGTTTTATCTACTT- ACGAGTACATCGGCTTTGC
c.5581C>T (p.R1861X) <i>MYO7A</i> MUT	R1861X-D-MUT	GCTTCCTGCAGTCCC GAAAGCACTGCCCA
	R1861X-R-MUT	TGGGCAGTGCTTTCGGGACTGCAGGAAGC
c.3652G>A (p.G1218R) <i>MYO7A</i> MUT	G1218R-D-MUT	AACTTCATCCACAGGGGCCCGCCCG
	G1218R-R-MUT	CGGGCGGGCCCCCTGTGGATGAAGTT
c.1086-12G>A <i>USH1C</i> MUT	c.1086-D-MUT	CCAGTAACAGGCATGGGGATCTCATTTTAG GATTGTAG
	c.1086-R-MUT	CTACAATCCTAAAATGAGATCCCCATGCCT GTTACTGG
c.8722+1delG <i>CDH23</i> MUT	c.8722-D-MUT	GGTCTTCACCATGG-TAGGGCCTGGCAGC
	c.8722-R-MUT	GCTGCCAGGCCCTA-CCATGGTGAAGACC
c.1304_1305insC <i>PCDH15</i> MUT	c.1304-D-MUT	GTAGCTCTGGACAAGGACATAGAAGACTGT AAGTTAAATACATATTTTGC

Sequence variants	Primer	Sequence 5'→3'
	c.1304-R-MUT	GCAAAATATGTATTTAACTTACAGTCTTCTA TGTCCCTGTCCAGAGCTAC
c.2868+5G>A <i>PCDH15</i> MUT	c.2868-D-MUT	GAAGATGCAGACCCTCCTGTAAATAGAAGG CATGATTAATATT
	c.2868-R-MUT	AATATTAATCAATGCCTTCTATTTACAGGAG GGTCTGCATCTC
c.1737C>G (p.Y579X) <i>PCDH15</i> MUT	Y579X-D-MUT	TGATAGTCGGGCGGACTTAGGCACTCACGG
	Y579X-R-MUT	CCGTGAGTGCCTAAGTCCGCCCGACTATCA

The nucleotides that have been modified are indicated in bold.

The positions of deleted nucleotides are represented with (-).

### Nasal Epithelial Cells Samples from Controls and Patients

A total of thirty-eight fresh nasal samples were obtained from eight USH1 patients, five patients with mutations in *MYO7A* gene and three patients with mutations in the *CDH23* gene, and thirty control subjects. The nasal samples were obtained from the middle nasal concha using curettage without local anesthesia, in a period during which acute infection was absent [12], in the ENT service of the Hospital General de Valencia, Spain.

### RNA and Sequence Analysis

RNA extraction from nasal epithelial cells and RT-PCR analysis was performed as previously described [11]. cDNA was used as template in nested PCR reactions with specific primers in order to amplify the regions containing the mutation (Table 3). PCR products were tested on 1.5% agarose gel and purified by ExoSAP. PCR products were sequenced and analyzed. All experiments were performed in duplicate.

**Table 3.** Primers used to amplify fragments of *MYO7A* and *CDH23* cDNAs from nasal cells.

Gene	Exons	Primers	Sequence 5'→3'	Size (bp)
<i>MYO7A</i>	1-5	MYO_EXP_1-5-EXT-D	AGAGACAAGAGACACACACA	628
		MYO_EXP_1-5-EXT-R	CTTCTTGTTGGTATACTGGC	
		MYO_EXP_1-5-INT-D	TAGAACGAGACTTGGAGCCA	490
		MYO_EXP_1-5-INT-R	TTCACAGCCACCAGGATGGA	
	3-9	MYO_EXP_3-9-EXT-D	ACCATGTGTGGATGGACCTG	937
		MYO_EXP_3-9-EXT-R	CTTCGAGATCTCCAGTTCT	
		MYO_EXP_3-9-INT-D	ACTCTGGGCAGGTCCAGGT	806
		MYO_EXP_3-9-INT-R	TGTTGGCGTACTCCTGGCT	

IV. Análisis de expresión de variantes USH1

Gene	Exons	Primers	Sequence 5'→3'	Size (bp)
	8–14	MYO_EXP_8-14-EXT-D	TGTTCTACTGCATGCTGGAG	906
		MYO_EXP_8-14-EXT-R	CCTGCAAAATGGTTGATGCC	
		MYO_EXP_8-14-INT-D	AAGAAGAAGCTGGGTGGG	811
		MYO_EXP_8-14-INT-R	ITGGCGTTGAGCTTGTGCT	
	25–33	MYO_EXP_25-33-EXT-D	ATGAGACCCTGGGCAAGAAG	1136
		*MYO_EXP_25-33-EXT-R	CTTCTGGGCATCAGTTCTCC	
		MYO_EXP_25-33-INT-D	AGGGCCAGAAGAAGAGCAGT	924
		MYO_EXP_25-33-INT-R	CGCTCCAGGATCATCTCAGA	
	38–45	MYO_EXP_38-45-EXT-D	TCCTATGACTACTTCAGGCC	1010
		MYO_EXP_38-45-EXT-R	GGGGAAGTAGGACTTGTCTT	
		MYO_EXP_38-45-INT-D	TCAAGCAGGCGCTGCTCAAGA	835
		MYO_EXP_38-45-INT-R	CGTGCACTTGTGGTAGCCTC	
<i>CDH23</i>	18–24	CDH_EXP_18-24-EXT-D	ATGAACAGATATCCAATGGGC	790
		CDH_EXP_18-24-EXT-R	GGTTCTGAAAGGTGGGGTCA	
		CDH_EXP_18-24-INT-D	AATGACAACCCTCCCACCTT	627
		CDH_EXP_18-24-INT-R	CACTGCTGGTGGCTTTCAGA	
	43–49	CDH_EXP_43-49-EXT-D	CATCAACGACAACGACCCTGT	1084
		CDH_EXP_43-49-EXT-R	GGTTGAGGTCGTGGTCAATG	
		CDH_EXP_43-49-INT-D	TCTGTGAAGGACAACCCGGA	708
		CDH_EXP_43-49-INT-R	GAATGGTGACAATGGCTGTG	
	57–63	CDH_EXP_57-63-EXT-D	CTCATCTTGGTGGCCAGCGAC	1015
		CDH_EXP_57-63-EXT-R	CCGGCAGCCGGACAGAGAT	
		CDH_EXP_57-63-INT-D	ITCATCGTCAAGGCCTCCAG	713
		CDH_EXP_57-63-INT-R	TAGCTGCTCCTTGTCTCA	

\*The primer MYO\_EXP\_25-33-EXT-R was designed by Vaché et al. [11].

### Nomenclature of Variants

The sequences obtained were compared with the consensus sequence NM 000260.3 for *MYO7A*, NM 153676.2 for *USH1C*, NM 022124.3 for *CDH23* and NM 033056.3 for *PCDH15*.

For the protein nomenclature, we used the Mutalyzer 2.0 beta-21 program (available at <https://mutalyzer.nl/>).



### **Nasal Ciliary Beat Frequency**

Ciliary beat frequency was measured as described by Armengot et al. [12] in eight USH1 patients and thirty healthy subjects. The beat pattern was observed using high-resolution digital high-speed video imaging. Values were expressed in *Hertz* (Hz) as the mean  $\pm$  standard error of mean.

### **Statistical Analysis**

Ciliary beat frequencies were analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Dunns post-hoc test. When only two groups were compared, *Mann-Whitney* U test was used. Significance levels were set at  $p < 0.05$ . Data were analyzed with statistical analysis software GraphPad Prism (Version 5.01, San Diego, USA).

**Table 4.** Results from four different bioinformatic programs used to predict the effect on the splicing process.

Sequence variants	Type of splice site	<i>NetGene2</i>	<i>HSP</i>	<i>NNSplice</i>	<i>Splice View</i>	Score
c.6_9dup (p.L4DfsX39) <i>MYO7A</i> [114]	Acceptor	Score for acceptor site increases from 77 to 82	The WT consensus sequence is not recognized	One donor site is not recognized	New acceptor sites are created and other acceptor sites are not recognized	3
c.470G>A (p.S157N) <i>MYO7A</i> [114]	Donor	Score for the main donor site decreases from 93 to 60	Score for donor site decreases and a new acceptor site is created	The main donor site is not recognized	The main donor site is not recognized	4
c.640G>A (p.G214R) <i>MYO7A</i> [122]	Acceptor	Neutral	The WT consensus sequence is not recognized	A new acceptor site is created	Neutral	1
c.721C>G (p.R241G) <i>MYO7A</i> [151]	Donor	Three new donor site are created	A new acceptor site is created	Score for the main acceptor site decreases from 81 to 59	A new donor site is created	4
c.1097T>C (p.L366P) <i>MYO7A</i> [151]	Acceptor	Score for the main acceptor site decreases from 83 to 77	Score for the acceptor site decreases	A new acceptor site is created	Neutral	3
c.1342_1343delAG (p.S448LfsX2) <i>MYO7A</i> [14]	Donor	The main donor site is not recognized	The main donor site and the acceptor site are not recognized	The main donor site is not recognized	The main donor site is not recognized	4
c.3508G>A (p.E1170K) <i>MYO7A</i> [23]	Acceptor	Score for the main acceptor site decreases from 85 to 77	Neutral	Neutral	Neutral	1
c.3652G>A (p.G1218R) <i>MYO7A</i> [15]	Acceptor	A new acceptor site is created	A new acceptor site is created	A new acceptor site is created	A new acceptor site is created	4
c.5581C>T (p.R1861X) <i>MYO7A</i> [22]	Acceptor	Score for the main acceptor site decreases from 77 to 72	Neutral	Neutral	Neutral	1

Sequence variants	Type of splice site	NetGene2	HSF	NNSplice	Splice View	Score
c.1086-12G>A <i>USH1C</i> [17]	Acceptor	A new acceptor site is created	Score for acceptor site decreases	Score for the main acceptor site decreases from 48 to 45	The main acceptor site is not recognized	4
c.2289+1G>A <i>CDH23</i> [24]	Donor	The main donor site is not recognized	The main donor site is not recognized	The main donor site is not recognized	The main donor site is not recognized	4
c.6049G>A (p.G2017S) <i>CDH23</i> [25]	Donor	Neutral	The main donor site is not recognized	The main donor site is not recognized	Score for the main donor site decreases from 89 to 84	3
c.8722+1delG <i>CDH23</i> [16]	Donor	Neutral	The main donor site is not recognized	The main donor site is not recognized	The main donor site is not recognized	3
c.521A>G (p.N174S) <i>PCDH15</i> [18]	Acceptor	Score for the main acceptor site decreases from 92 to 87	The main acceptor site is not recognized	Neutral	Neutral	2
c.1304_1305insC (p.T436YfsX12) <i>PCDH15</i> [18]	Donor	Score for the main donor site decreases from 63 to 51	The WT consensus sequence is not recognized	Score for the main donor site decreases from 99 to 94	Score for the main donor site decreases from 81 to 79	3
c.1737C>G (p.Y579X) <i>PCDH15</i> [18]	Donor	Score for the main donor site decreases from 52 to 37	The main donor site is not recognized	Neutral	Neutral	2
c.2868+5G>A <i>PCDH15</i> [18]	Donor	The main donor site is not recognized and a new donor site is created	The main donor site is not recognized.	The main donor site is not recognized.	The main donor site is not recognized.	4
c.3717+2dupT <i>PCDH15</i> Present study	Donor	The main donor site is not recognized	The main donor site is not recognized	The main donor site is not recognized	The main donor site is not recognized	4

## RESULTS

### Computational Analysis

One hundred and eight variants identified in the USH1 genes were studied with bioinformatic tools (*SpliceView*, *NNSplice*, *NetGene2* and *HSF*) in order to analyze the effect of these variants in the splice prediction and the recognition of donor and acceptor sites. Nine *MYO7A*, three *CDH23*, five *PCDH15* and one *USH1C* variants were predicted to alter the splicing mechanism creating or eliminating donor/acceptor splice sites, see table 4. Considering the four programs (*Splice View*, *NNSplice*, *NetGene2* and *HSF*) the score-values were calculated. Eight out of the eighteen variants showed the highest score (4), five of them showed a score of 3, two of the variants were observed to show a score of 2 and the three remaining changes showed a score of 1.

### Minigene Constructions

In order to confirm the bioinformatic predictions, minigenes were constructed and the different splicing products were analyzed. The minigene assays showed that only seven of them were affecting the mRNA processing: three *MYO7A* variants, c.470G>A, c.1342\_1343delAG and c.3652G>A, three *CDH23* changes, c.2289+1G>A, c.6049G>A and c.8722+1delG, and one *PCDH15* variant, c.3717+2dupT, see Table 5.

#### **c.470G>A (p.S157N, *MYO7A*)**

The minigene assay showed that the processing of the WT minigene generated two main fragments: the correct processing (band A) and the exon skipping (band B). The mutant minigenes only showed one fragment corresponding to the skipping of exon 5 (band B) (Fig. 1A). If this mutant transcript was translated, it would produce a truncated protein of only 123 amino acids in length, p.T96WfsX29.

#### **c.1342\_1343delAG (p.S448LfsX2, *MYO7A*)**

*In vitro* analyses confirmed that the WT transcript contained the correct exon (band A) but the c.1342\_1343delAG construction generated several bands. We were only able to sequence band B that corresponded to the exon 12 with a partial deletion. The mutation removed the main donor site and created a new donor splice-site leading to a deletion of 24-bp (Fig. 1B). Thus, the new myosin VIIA protein generated, if this aberrant transcript was translated, it would be of 2207 amino acids in length, p.N443\_E450del.

**c.3652G>A (p.G1218R, MYO7A)**

*In vitro* experiments showed that WT minigene generated two different transcripts: one of them corresponded to the correct transcript (band A) and the smallest and strongest transcript was the skipping of exon 29 (band B). A third band (band C) was also observed corresponding to the heteroduplex formation from the two obtained transcripts. Mutant minigene only showed one transcript corresponding to the aberrant splicing process (band D). This mutation avoided the recognition of the main acceptor site and created a new acceptor splice-site leading to a deletion of 103-bp in the 5' end of exon 29 (Fig. 1C). If the c.3652G>A transcript was translated, it would generate a new truncated protein of 1227 amino acids in length, p.Y1211AfsX18.

**c.2289+1G>A (CDH23)**

The WT minigene generated a strong band corresponding to the correct transcript (band A) and a thin band corresponding to the exon skipping (band B). The mutant minigene showed two strong bands; one of them was the transcript with the exon 21 plus part of the intron 21 (band C) and the other band was the exon skipping (band B). This variant generated two different transcripts: one of them did not recognize the main donor site and created a new donor site including the first 149 nucleotides of intron 21 and the other transcript produced the skipping of exon 21. Thus, c.2289+1G>A would create two different proteins; p.N765SfsX35, of 798 amino acids in length, would correspond to the exon 21 plus 149 nucleotides of intron 21, and the other new truncated protein would be p.E727KfsX9, of 734 amino acids in length (Fig. 1D).

**c.6049G>A (p.G2017S, CDH23)**

Minigene assays revealed that the WT construction created two different transcripts: one of them corresponded to the correct transcript (band A) and the smallest transcript was the skipping of exon 46 (band B). A third band was also observed corresponding to the heteroduplex formation from the two smaller transcripts (band C). However, the c.6049G>A construction only showed one band corresponding to the skipping of exon 46 (band B) (Fig. 1E). If the transcript containing the c.6049G>A variant was translated, it would generate a protein of 3312 amino acids in length, p.T1976\_G2017del.

**c.8722+1delG (CDH23)**

*In vitro* experiments showed that the WT construction generated one band (band A) corresponding to the correct transcript and the mutant construction showed a band with

apparently the same size of the correct transcript (band B). However, when these fragments were sequenced, we could observe that the two fragments were different. The mutation produced the displacement of the donor splice site one nucleotide upstream, being the last nucleotide of the exon 60 processed as intron (Fig. 1F). If this mutant transcript was translated, it would be generating a new truncated protein of 2950 amino acids in length, p.S2909AfsX43.

### **c.3717+2dupT (*PCDH15*)**

In our series of patients, we identified a novel variant in intron 27 of the *PCDH15* gene in one Spanish USH1 family in homozygous state. We confirmed by minigene assays that the WT construction generated one correct fragment (band A). However, the c.3717+2dupT minigene showed two different transcripts: the smallest and strongest transcript corresponded to the skipping of exon 27 (band B) and transcript containing exon 27 plus part of intron 27 (band C). A bigger band was observed corresponding to the heteroduplex from the two transcripts (band D). This novel mutation generated two different transcripts: the smallest and strongest transcript that corresponded to the skipping of involved exon 27 and a second transcript corresponding to the no recognition of the main donor splice site and the creation of a new donor site that includes the first 52 nucleotides of intron 27 (Fig. 1G). Therefore, the mutation would be creating two different proteins; one of them, corresponding to the skipping of exon 27, would create an in-frame deletion of 72 amino acids in length, p.A1168\_L1239del, and a new truncated protein, corresponding to the exon 27 plus the first 52 nucleotides of intron 27, of 1241 amino acids in length, p.V1242RfsX2.

Table 5. Effects of USH1 variants on splicing.

Putative splicing variants	Score according to bioinformatic tools	Effect on RNA level according to minigene results	Effect on protein level according to minigene results	Effect on RNA level according to nasal cells results	Effect on protein level according to nasal cells results
c.6_9dup (p.L4DfsX39) <i>MYO7A</i>	3	No effect on splicing	p.L4DfsX39	No effect on splicing	p.L4DfsX39
c.470G>A (p.S157N) <i>MYO7A</i>	4	Exon skipping	p.T96WfsX29	–	–
c.640G>A (p.G214R) <i>MYO7A</i>	1	No effect on splicing	p.G214R	No effect on splicing	p.G214R
c.721C>G (p.R241G) <i>MYO7A</i>	4	No effect on splicing	p.R241G	–	–
c.1097T>C (p.L366P) <i>MYO7A</i>	3	No effect on splicing	p.L366P	–	–
c.1342_1343delAG (p.S448LfsX2) <i>MYO7A</i>	4	The mutation removes the main donor site and creates a new donor splice-site leading to a deletion of 24bp	p.N443_E450del	–	–
c.3508G>A (p.E1170K) <i>MYO7A</i>	1	No effect on splicing	p.E1170K	No effect on splicing	p.E1170K
c.3652G>A (p.G1218R) <i>MYO7A</i>	4	The mutation does not recognize the acceptor site and a new acceptor splice-site is created leading to a deletion of 103-bp in the 5'end of exon 29	p.Y1211AfsX18	–	–

IV. Análisis de expresión de variantes USH1

Putative splicing variants	Score according to bioinformatic tools	Effect on RNA level according to minigene results	Effect on protein level according to minigene results	Effect on RNA level according to nasal cells results	Effect on protein level according to nasal cells results
c.5581C>T (p.R1861X) <i>MYO7A</i>	1	No effect on splicing	p.R1861X	No effect on splicing	p.R1861X
*c.5856G>A (p.K1952K) <i>MYO7A</i>	4	Exon skipping	p.A1915_K1952del	Exon skipping	p.A1915_K1952del
c.1086-12G>A <i>USH1C</i>	4	No effect on splicing	Neutral	-	-
c.2289+1G>A <i>CDH23</i>	4	This variant does not recognize the main donor site and a new donor splice-site is created inserting the first 149 nucleotides of intron21+ Exon skipping	p.N765SfsX35+ p.E727KfsX9	Transcript with an insertion of the first 149 nucleotides of intron 21 plus the last 54 nucleotides of the same intron	p.N765SfsX35
c.6049G>A (p.G2017S) <i>CDH23</i>	3	Exon skipping	p.T1976_G2017del	Probable NMD	-
c.8722+1delG <i>CDH23</i>	3	Deletion of the last nucleotide of exon 60	p.S2909AfsX43	Deletion of the last nucleotide of exon 60	p.S2909AfsX43
c.521A>G (p.N174S) <i>PCDH15</i>	2	No effect on splicing	p.N174S	-	-
c.1304_1305insC (p.T436YfsX12) <i>PCDH15</i>	3	No effect on splicing	p.T436YfsX12	-	-



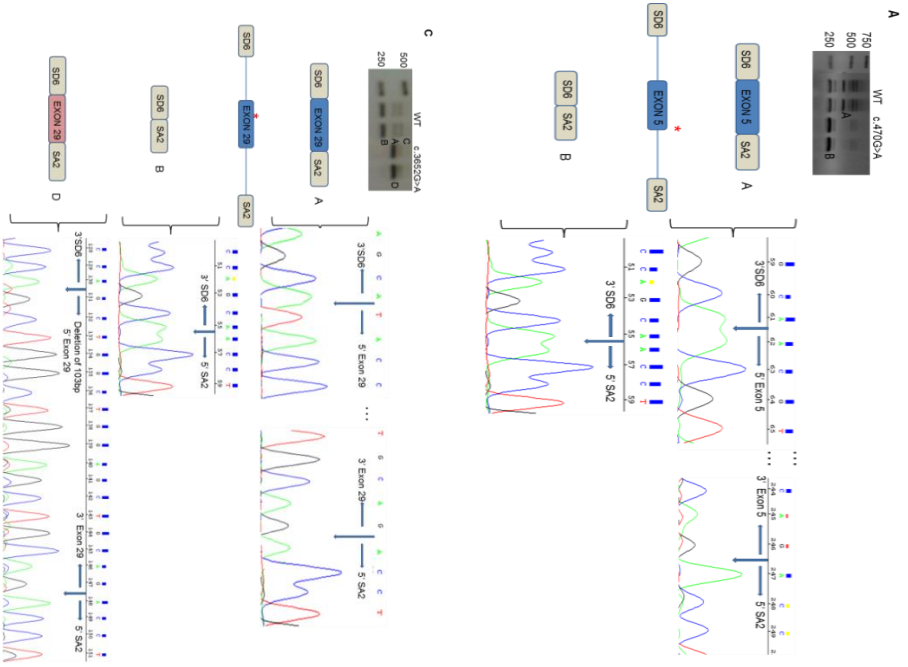
Putative splicing variants	Score according to bioinformatic tools	Effect on RNA level according to minigene results	Effect on protein level according to minigene results	Effect on RNA level according to nasal cells results	Effect on protein level according to nasal cells results
<b>c.1737C&gt;G</b> ( <b>p.Y579X</b> ) <i>PCDH15</i>	2	No effect on splicing	p.Y579X	-	-
<b>c.2868+5G&gt;A</b> <i>PCDH15</i>	4	No effect on splicing	Neutral	-	-
<b>c.3717+2dupT</b> <i>PCDH15</i>	4	c.3717+2dupT does not recognize the main donor site and creates a new donor splice-site that includes the first 52 nucleotides of intron 27+ Exon skipping	p.V1242RfsX2+ p.A1168_L1239del	-	-

Not performed in this study are indicated with (-).

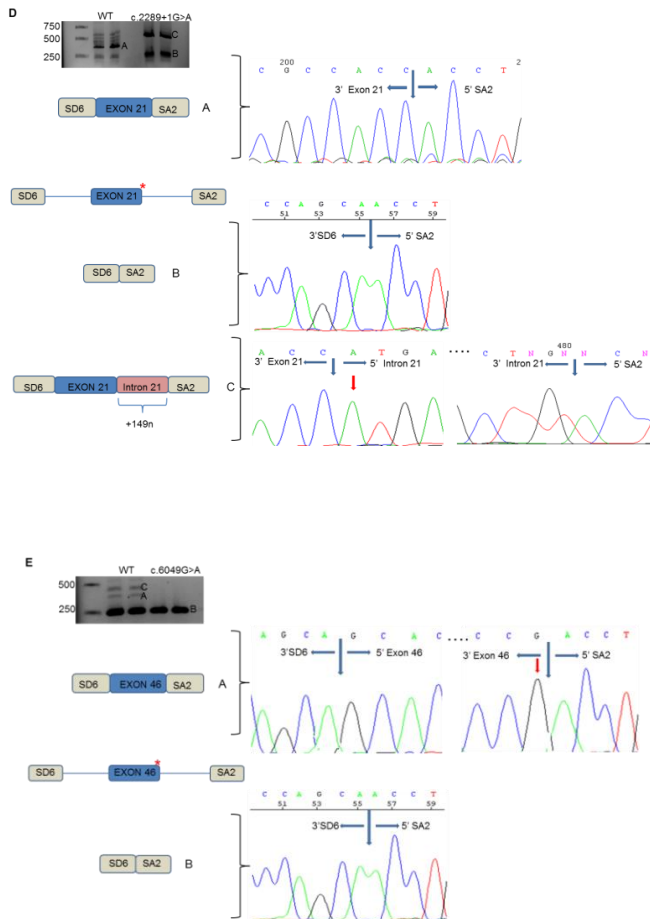
NMD: Nonsense mediated decay.

\* c.5856G>A (p.K1952K, *MYO7A*) was previously analyzed by Jaijo et al. [26].

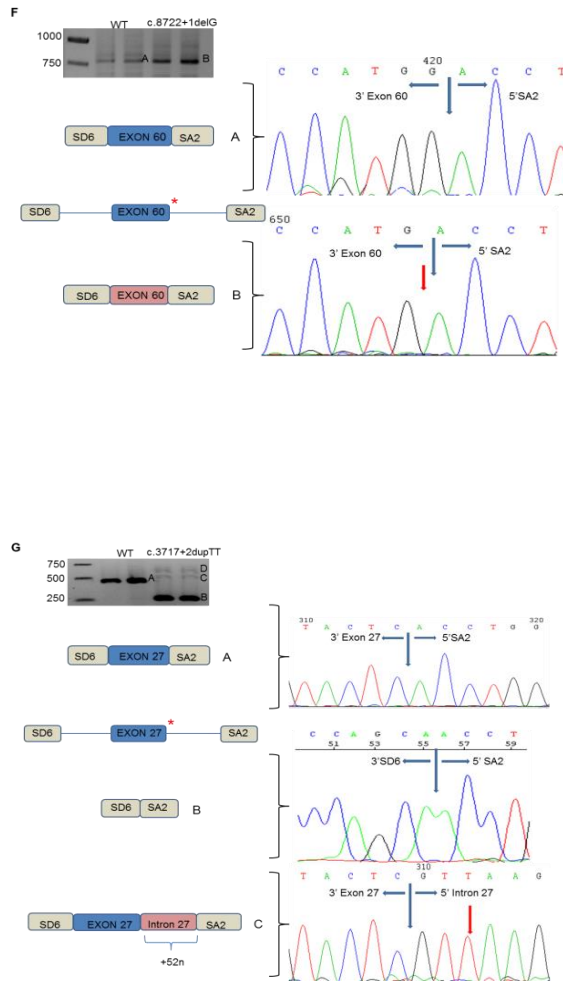
#### IV. Análisis de expresión de variantes USH1



**Figure 1. In vitro splicing assays for the seven splicing mutations identified in the USH1 genes.** Gel electrophoresis shows the different splicing processes for WT minigene and mutants constructions. COS-7 cell transfection experiments were performed in duplicate. **A. c.470G>A (p.S157N, MYO7A).** Band A is the correct transcript of exon 5 (MYO7A). Band B is the skipping of involved exon. **B. c.1342\_1343delAAG (p.S448LfsX2, MYO7A).** Band A is the correct transcript corresponding to the exon 12 (MYO7A). Band B is the skipping of exon 12. **C. c.3652G>A (p.G1218R MYO7A).** Band A is the correct transcript of exon 29 (MYO7A). The band B is the exon skipping. Band C is the heteroduplex formation from band A and band B. Band D is the aberrant splicing process that include the deletion of 103-bp of 5'end of exon 29.



**Figure 1. In vitro splicing assays for the seven splicing mutations identified in the USH1 genes.** Gel electrophoresis shows the different splicing processes for WT minigene and mutants constructions. COS-7 cell transfection experiments were performed in duplicate. **D. c.2289+1G>A (CDH23).** Band A is the normal transcript of exon 21 (CDH23). Band B is the skipping of exon 21. Band C is the aberrant splicing process that includes the first 149 nucleotides of intron 21. **E. c.6049G>A (p.G2017S, CDH23).** Band A is the correct transcript of exon 46 (CDH23). Band B is the skipping of exon 46. Band C is the heteroduplex formation from the band A and B.



**Figure 1. In vitro splicing assays for the seven splicing mutations identified in the USH1 genes.** Gel electrophoresis shows the different splicing processes for WT minigene and mutants constructions. COS-7 cell transfection experiments were performed in duplicate. **F. c.8722+1delG (CDH23).** Band A is the correct splicing process of exon 60 (*CDH23*). Band B is the abnormal splicing process of exon 60 that shows a deletion of the last nucleotide (G) of the involved exon. **G. c.3717+2dupT (PCDH15).** Band A is the correct transcript of exon 27 (*PCDH15*). Band B is the skipping of the involved exon. Band C is the transcript corresponding to the new donor splice site from exon 27 plus the first 52 nucleotides of the intron 27. Band D is the heteroduplex formation from the band B and the band D.

## Nasal Epithelial Cells

To carry out the second goal of the present study, we designed different primers to amplify particular fragments of the *MYO7A* and *CDH23* cDNAs from the nasal epithelium cells of patients and controls, in order to corroborate the observed effect of mutations by minigenes in the patient's tissues. We only could obtain samples from subjects carriers of eight of the nineteen variants analyzed *in vitro* by minigenes. These samples were obtained from five USH1 patients and two family healthy carriers of the mutations c.6\_9dup (RP-1481) and c.640G>A (RP-1546) in the *MYO7A* gene (Table 6).

**Table 6.** Genotypes of the five USH1 patients and the two family healthy carriers of USH1 mutations presented in this study.

Patient	Gene	Allele 1/Allele 2
RP-1481*	<i>MYO7A</i>	c.6_9dup (p.L4DfsX39) (exon2)/+
RP-1546*	<i>MYO7A</i>	c.640G>A (p.G214R) (exon7)/+
RP-115	<i>MYO7A</i>	c.3508G>A (p.E1170K) (exon 28)/ c.3238A>T (p.K1080X) (exon 25)
RP-1479	<i>MYO7A</i>	c.5581C>T (p.R1861X) (exon 40)/ c.5581C>T (p.R1861X) (exon 40)
RP-280	<i>MYO7A</i>	c.5856G>A (p.K1952K) (exon 42)/ c.1190C>A (p.A397D) (exon 11)
RP-1534	<i>CDH23</i>	c.2289+1G>A (intron 21)/c.6049G>A (p.G2017S) (exon46)
RP-928	<i>CDH23</i>	c.8722+1delG (intron 60)/c.6511delC (exon48)

Family healthy carriers are indicated with an asterisk (\*).

Only in four of the eight studied variants (c.5856G>A in the *MYO7A* gene, c.2289+1G>A, c.6049G>A and c.8722+1delG in the *CDH23* gene), we could observe an abnormal splicing process *ex vivo* (Table 5). In the remaining four samples both WT and mutant alleles were amplified showing that the presence of the mutations did not affect the splicing process.

### c.5856G>A (p.K1952K, *MYO7A*)

Jaijo et al. [26] analyzed the c.5856G>A variant by minigene constructions. It showed the skipping of exon 42. The analysis of this change in the patient RP-280 replicate 1 revealed the presence of two transcripts: a fragment corresponding to the expected size, 835-bp also in the control sample (band A), and a fragment of 721-bp (band B). However, in the patient's replicate 2, we only could amplify the smallest fragment. Sequencing of the products showed that the fragment of 835-bp corresponded to the normal allele. However, the product of 721-bp was the transcript without exon 42; if the transcript containing the p.K1952K variant was translated, it would create a new protein of 2177 amino acids in length, p.A1915\_K1952del (Fig. 2A).

**c.2289+1G>A *CDH23***

Examination of the RT-PCR product of the patient RP-1534 showed the presence of two transcripts, band A (observed in the replicate 2) and band B (observed in the replicate 1). However, in the control sample only one transcript was observed (band A). Sequencing of the band A showed the correct transcript of 627-bp. The patient’s replicate 1 amplified an abnormal transcript that included the first 149 nucleotides of intron 21 and the last 54 nucleotides of the same intron (band B) (Fig. 2B). Therefore, the mutation would be creating a new truncated protein of 798 amino acids in length, p.N765SfsX35.

**c.6049G>A (p.G2017S, *CDH23*)**

The patient RP-1534 also carried the p.G2017S. In this case, we only could amplify and sequence the normal allele (Fig. 2C).

**c.8722+1delG (*CDH23*)**

Analysis of the RT-PCR product of patient RP-928 showed only one band. However, sequencing clearly revealed the presence of two distinct transcripts: a normal spliced transcript and an abnormal transcript in which the splice site is modified causing the removal of one nucleotide (G) in the exons 60 and 61 boundary (Fig. 2D). Thus, if this mutant transcript was translated, the new protein would be of 2950 amino acids in length, p.S2909AfsX43.

**Ciliary Beat Frequency**

The ciliary beat frequencies obtained from each patient and control were summarized in Table 7. Ciliary beat pattern was normal in all the patients. We analyzed whether USH1 patients showed differences in ciliary beat frequency compared to controls. As shown in Fig. 3A, the ciliary beat frequency was significantly reduced in these patients (9.68±0.49 Hz, Mann Whitney U test, p = 0.031) compared to controls (10.88±0.25 Hz).

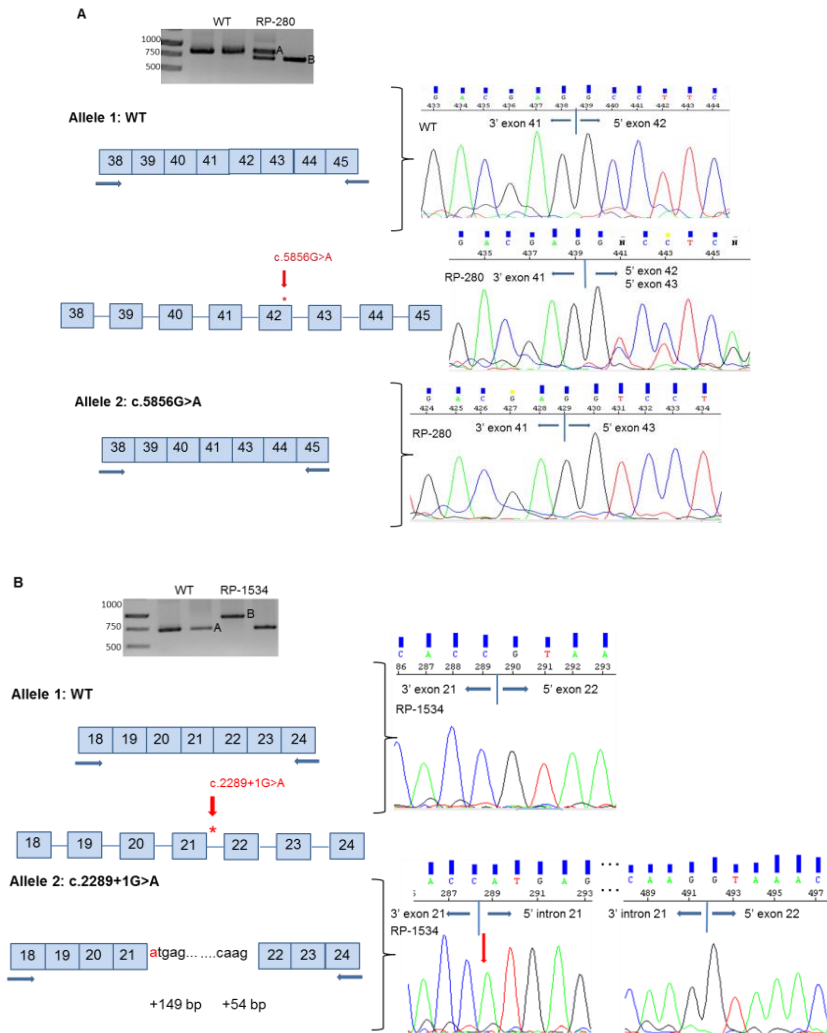
**Table 7.** Nasal ciliary beat frequency of USH1 patients and controls.

<b><i>MYO7A</i> patients</b>	<b>Nasal Ciliary Beat Frequency (Hz)</b>
1	8.5
2	12
3	11.5
4	9.5
5	9.5
<b><i>CDH23</i> patients</b>	<b>Nasal Ciliary Beat Frequency (Hz)</b>
1	8

2	9
3	9.5
<b>Control subjects</b>	<b>Nasal Ciliary Beat Frequency (Hz)</b>
1	11.58
2	10
3	10
4	12
5	11.35
6	10.2
7	13
8	9
9	10.6
10	12.3
11	11
12	12
13	12.5
14	10.8
15	9.1
16	14
17	10.7
18	9.5
19	9.5
20	11.8
21	11
22	9.5
23	9
24	10.8
25	14
26	9.75
27	9.75
28	11.75
29	10.5
30	10.5
<b>Disease Group</b>	<b>Nasal ciliary beat frequency (Hz), mean ± SD</b>
<i>MYO7A</i> (n = 5)	10.20±1.44
<i>CDH23</i> (n = 3)	8.33±0.76
USH1 (n = 8)	9.68±1.38
Control (n = 30)	10.88±1.36

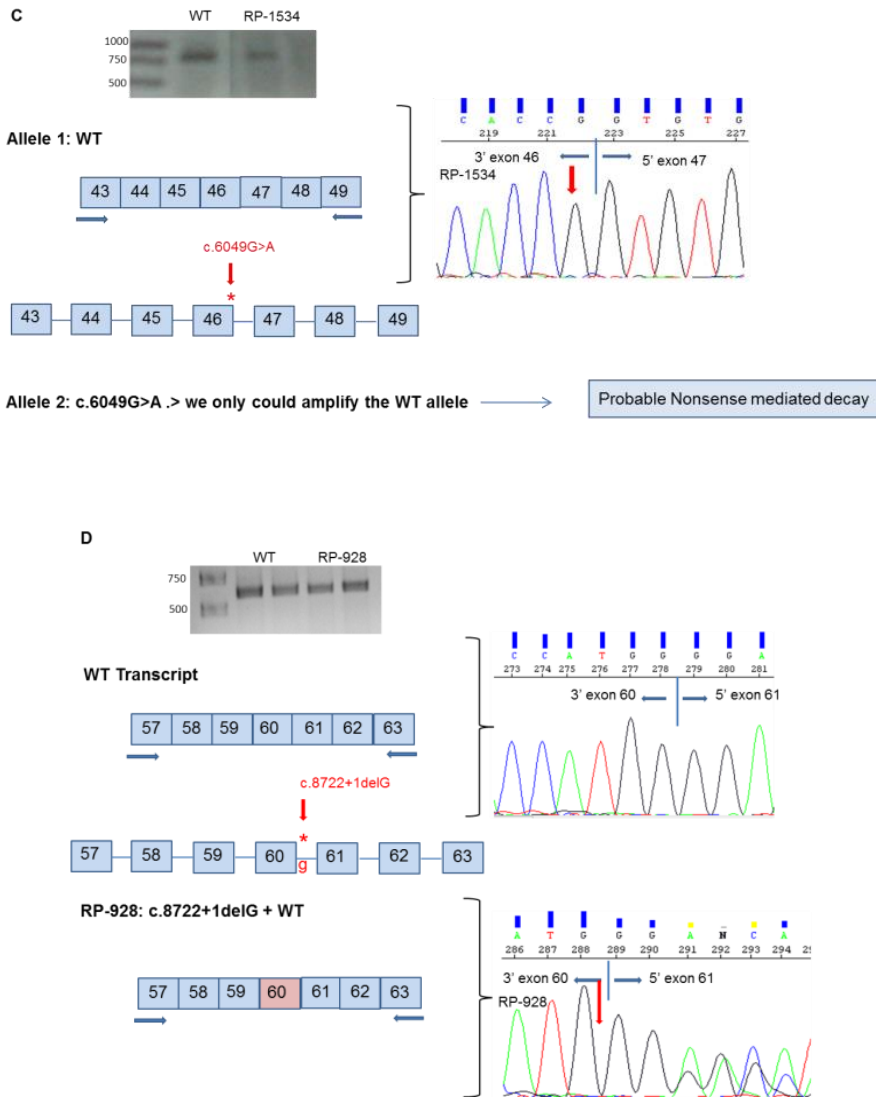
We also evaluated whether ciliary beat frequency were different between *MYO7A* and *CDH23* patients. No statistical differences were found between *MYO7A* patients (10.20±0.66 Hz) and *CDH23* patients (8.83±0.44 Hz, Kruskal-Wallis test followed by Dunns test). However, nasal ciliary beat frequency was significantly lower in *CDH23* patients than in controls ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis Test followed by Dunns test) (Fig. 3B).

#### IV. Análisis de expresión de variantes USH1

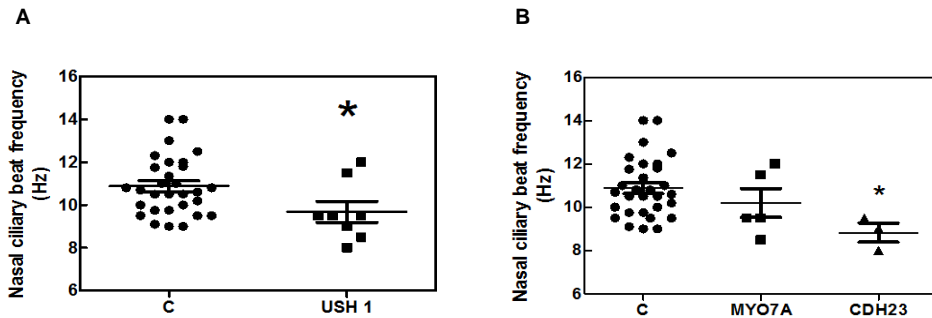


**Figure 2. Transcript analysis of USH1 variants in nasal epithelial cells.** Gel electrophoresis shows the RT-PCR products obtained for USH1 patients and control samples. Electropherograms of the transcripts obtained show the molecular characterization of the effect of the studied variants. All experiments were performed in duplicate. **A.** **c.5856G>A (p.K1952K, MYO7A).** Band A is the correct splicing process of the exons 38–45 of the *MYO7A* gene. Band B is the skipping of exon 42. RP-280 replicate 1 shows two transcripts corresponding to the WT allele (band A) and mutant allele (band B). RP-280 replicate 2 shows only the band B corresponding to the aberrant transcript. **B.** **c.2289+1G>A (CDH23).** Band A is the transcript corresponding to the normal RNA processing of the exons 18–24 of the *CDH23* gene. Band B is the aberrant transcript that includes the first 149 nucleotides and the last 54 nucleotides of intron 21.





**Figure 2. Transcript analysis of USH1 variants in nasal epithelial cells.** Gel electrophoresis shows the RT-PCR products obtained for USH1 patients and control samples. Electropherograms of the transcripts obtained show the molecular characterization of the effect of the studied variants. All experiments were performed in duplicate. **C.** c.6049G>A (p.G2017S, *CDH23*). RP-1534 shows only the WT allele. **D.** c.8722+1delG (*CDH23*). RP-928 shows the heterozygous transcript from WT allele and the mutant allele. It presents a deletion of the last nucleotide (G) of exon 60 of *CDH23* gene.



**Figure 3. Nasal ciliary beat frequency in five *MYO7A* and three *CDH23* patients, and thirty controls.** **A.** Comparison between USH1 group and Control group. The nasal ciliary beat frequency was significantly different between these groups (Mann Whitney Test,  $p = 0.031$ ). **B.** Comparison between the *MYO7A* group and *CDH23* group, *MYO7A* and Control group and *CDH23* group and Control group. The nasal ciliary beat frequency was significantly different between *CDH23* group and Control group ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSSION

A high number of mutations responsible for USH have been identified by screenings performed in USH patients. The effect of variants that lead to premature stop codons is not questioned; however, it is complicated to predict the consequences of missense, silent and intronic changes, in order to discriminate neutral variants from those with pathogenic effect. Variants putative to affect the splicing process are usually considered pathogenic on the basis of their conservation in the canonical splice site, their absence in control samples, cosegregation with the disease in families and results from bioinformatic predictions [26].

Four bioinformatic programs (*NNSplice*, *SpliceView*, *HSF* and *NetGene2*) were used to predict the damaging effect of the variants identified in the USH1 genes of our cohort and eighteen changes were selected as putative to affect the splicing process (Table 4). These results are only computational predictions so, additional studies are necessary to confirm the effect on the mRNA processing. Minigenes and RNA assays were performed to achieve this goal.

Minigene assays revealed that only seven of the eighteen studied variants were affecting the splicing process (Table 5). The bioinformatic analysis of these seven variants had shown high scores. A maximum score of 4, for five of them: c.470G>A, c.1342\_1343delAG and c.3652G>A in the *MYO7A* gene, c.2289+1G>A in *CDH23* gene

and c.3717+2dupT in *PCDH15* gene. The other two variants (c.6049G>A and c.8722+1delG in the *CDH23* gene) showed a score of 3. However, other studied variants that also reached a high score ( $\geq 3$ ) did not show any effect in the splicing process when they were analyzed by minigenes. According to these results, all types of putative pathogenic variants should be analyzed by bioinformatic tools, and, when high scores are observed, minigene analysis should be performed to avoid false positive. See Table 5.

However, the splicing processes observed by minigenes would not necessarily reflect the real processing in affected tissues. In our study, we could analyze RNA from nasal epithelial cells from patients or carriers of eight variants previously analyzed by minigene constructions, to determine their effect on splicing process in patient's tissues. Analysis of the RT-PCR amplification of nasal cells allowed us to confirm that four of the eight studied variants, one *MYO7A* (c.5856G>A) and three *CDH23* (c.2289+1G>A, c.6049G>A and c.8722+1delG), were affecting the splicing process. The same results were obtained by minigene constructions for the eight studied variants, except for two *CDH23* changes, c.2289+1G>A and c.6049G>A.

For the c.2289+1G>A variant the different results obtained by both methods are due to the minigene construction did not contain the entire intron 21 of the *CDH23* gene.

In the study of the c.6049G>A variant by analysis of RT-PCR amplification from nasal cells we were not able to amplify the mutant transcript. This fragment could be degraded by nonsense mediated decay mechanism (NMD), decreasing the mRNAs levels and therefore, the protein levels. However, by minigene construction we had observed in this case the skipping of exon 46.

In three cases (c.5856G>A (*MYO7A*), c.2289+1G>A (*CDH23*) and c.6049G>A (*CDH23*)), we could only amplify one of the two alleles due to the low USH1 genes expression level in this tissue. In fact, these USH transcripts are only detectable by nested PCR. Accordingly, it is advisable to detect the presence of heterozygous changes by sequencing, the studied mutation or other SNPs, to confirm the amplification of the two alleles and avoid incorrect conclusions when apparently only one fragment is obtained after PCR.

Therefore, minigenes are a good approach to ascertain the pathogenic nature of splice variants when is difficult to obtain RNA from patients' tissues, as in the case of USH genes, that present a restricted expression profile associated with photoreceptors and inner hair cells. These constructions are expressed in living cells where the splicing machinery remains intact.

In addition, we can confirm that the analysis of nasal epithelial cells is an alternative method to discriminate neutral Usher variants from those with a pathogenic effect on the splicing process.

Finally, we have also demonstrated that the nasal ciliated epithelium of USH1 patients has a lower ciliary beat frequency than control subjects. Armengot et al. [12] suggested that mutations in the USH1 and USH2 genes could be responsible for the lower ciliary beat frequency. They observed a low beat frequency in USH2 patients. However, the ciliary activity was sufficient to operate normally and no clinical consequences were observed in these patients.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

Authors are grateful to the patients participating in the study and to their family members, and also to the FARPE, FIAPAS, ONCE (Valencia) and La Caixa-Camp de Morvedre for their help and co-operation. The exon trapping expression vector pSPL3 was kindly provided by S. Tuffery-Giraud and I. Bottillo. We are very grateful to Pilar Bañuls for her generous collaboration in the present study.

#### **FUNDING STATEMENT**

This work was supported by grants SAF2011-26443, FIS CP11/00293, PI11/02618, ADE10/00020 and PI10/01825 from Spanish Ministry of Science and Innovation and grants Prometeo/2008/045 and GV/2012/028 from Regional Government (Generalitat Valenciana). CIBERER (CB/06/07/1030) and CIBERES (CB06/06/0027) are an initiative of the Institute of Health Carlos III from the Spanish Ministry of Science and Innovation. The bioanalyzer ABI3500xl was purchased with the grant PROMIS (II12/00023) from the Instituto de Salud Carlos III. MJA and GGG are recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación (REF: AP2099-3344 and AP2008-02760, respectively). RR has a Contrato-Investigador SNS Miguel Servet (CP09/118) from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio Ciencia e Innovación. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**REFERENCES**

1. Vernon M (1969) Sociological and psychological factors associated with hearing loss. *J. Speech Hear Res.* 12: 541–563 [PubMed]
2. Hope CI, Bunday S, Proops D, Fielder AR (1997) Usher syndrome in the city of Birmingham-prevalence and clinical classification. *Br. J. Ophthalmol* 81: 46–53 [PMC free article] [PubMed]
3. Kimberling WJ, Weston MD, Möller C, van Aarem A, Cremers CW, et al. (1995) Gene mapping of Usher syndrome type IIa: localization of the gene to a 2.1-cM segment on chromosome 1q41. *Am J Human Genet.* 56: 216–223 [PMC free article] [PubMed]
4. Espinos C, Millan JM, Beneyto M, Najera C (1998) Epidemiology of Usher syndrome in Valencia and Spain. *Community Genet.* 1: 223–8 [PubMed]
5. Davenport SLH, Omenn GS (1977) The heterogeneity of Usher Syndrome. Amsterdam Excerpta Media Foundation. *International Congress ser abstr.* 215: 87–88
6. Millán JM, Aller E, Jaijo T, Blanco-Kelly F, Gimenez-Pardo A, et al. (2011) An update on the genetics of usher syndrome. *J Ophthalmol.* 2011: 417217 [PMC free article] [PubMed]
7. Jaworek TJ, Bhatti R, Latief N, Khan SN, Riazuddin S, et al. (2012) USH1K, a novel locus for type I Usher syndrome, maps to chromosome 10p11.21-q21.1. *J Hum Genet.* 10.1038/jhg.2012.79. [Epub ahead of print]. [PMC free article] [PubMed]
8. Riazuddin S, Belyantseva IA, Giese AP, Lee K, Indzhykulian AA, et al. (2012) Alterations of the CIB2 calcium- and integrin-binding protein cause Usher syndrome type 1J and nonsyndromic deafness DFNB48. *Nat Genet.* doi:10.1038/ng.2426 [Epub ahead of print]. [PMC free article] [PubMed]
9. Roepman R, Wolfrum U (2007) Protein networks and complexes in photoreceptor cilia. *Subcell Biochem.* 43: 209–35 [PubMed]
10. Cohn E, Orten DJ, Weston M, Kimberling W, Cosgrove D (2006) Nasal cytology will assist the diagnosis of specific Usher syndromes. *First International Symposium on Usher syndrome and related disorders, Omaha, October 3 to 6, 2006.* p. 22.
11. Vaché C, Besnard T, Blanchet C, Baux D, Larrieu L, et al. (2010) Nasal epithelial cells are a reliable source to study splicing variants in Usher syndrome. *Hum Mutat.* 31(6): 734–41 [PubMed]
12. Armengot M, Salom D, Diaz-Llopis M, Millan JM, Milara J, et al. (2012) Nasal ciliary beat frequency and beat pattern in retinal ciliopathies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 53(4): 2076–9 [PubMed]
13. Bonneau D, Raymond F, Kremer C, Klossek JM, Kaplan J, et al. (1993) Usher syndrome type I associated with bronchiectasis and immotile nasal cilia in two brothers. *J Med Genet.* 30(3): 253–254 [PMC free article] [PubMed]

14. Jaijo T, Aller E, Oltra S, Beneyto M, Nájera C, et al. (2006) Mutation profile of the MYO7A gene in Spanish patients with Usher syndrome type I. *Hum Mutat.* 27(3): 290–1 [PubMed]
15. Jaijo T, Aller E, Beneyto M, Najera C, Graziano C, et al. (2007) MYO7A mutation screening in Usher syndrome type I patients from diverse origins. *J Med Genet.* 44(3): e71 [PMC free article] [PubMed]
16. Oshima A, Jaijo T, Aller E, Millan JM, Carney C, et al. (2008) Mutation profile of the CDH23 gene in 56 probands with Usher syndrome type I. *Hum Mutat.* 29(6): E37–46 [PMC free article] [PubMed]
17. Aparisi MJ, García-García G, Jaijo T, Rodrigo R, Graziano C, et al. (2010) Novel mutations in the USH1C gene in Usher syndrome patients. *Mol Vis.* 16: 2948–54 [PMC free article] [PubMed]
18. Jaijo T, Oshima A, Aller E, Carney C, Usami S, et al. (2012) Mutation screening of the PCDH15 gene in Spanish patients with Usher syndrome type I. *Mol Vis.* 18: 1719–26 [PMC free article] [PubMed]
19. Jaijo T, Aller E, García-García G, Aparisi MJ, Bernal S, et al. (2010) Microarray-based mutation analysis of 183 Spanish families with Usher syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51: 1311–7 [PubMed]
20. Bottillo I, De Luca A, Schirinzi A, Guida V, Torrente I, et al. (2007) Functional analysis of splicing mutations in exon 7 of NF1 gene. *BMC Med Genet.* 12 8: 4 [PMC free article] [PubMed]
21. Le Guédard-Méreuze S, Vaché C, Baux D, Faugère V, Larrieu L, et al. (2010) *Ex vivo* splicing assays of mutations at noncanonical positions of splice sites in USHER genes. *Hum Mutat.* 31(3): 347–55 [PubMed]
22. Adato A, Weil D, Kalinski H, Pel-Or Y, Ayadi H, et al. (1997) Mutation profile of all 49 exons of the human myosin VIIA gene, and haplotype analysis, in Usher 1B families from diverse origins. *Am J Hum Genet.* 61(4): 813–21 [PMC free article] [PubMed]
23. Cuevas JM, Espin s C, Millan JM, Sanchez F, Trujillo MJ, et al. (1999) Identification of three novel mutations in the MYO7A gene. *Hum Mutat.* 14(2): 181 [PubMed].
24. Astuto LM, Bork JM, Weston MD, Askew JW, Fields RR, et al. (2002) CDH23 mutation and phenotype heterogeneity: a profile of 107 diverse families with Usher syndrome and nonsyndromic deafness. *Am J Hum Genet.* 71(2): 262–75 [PMC free article] [PubMed]
25. Roux AF, Faugère V, Le Guédard S, Pallares-Ruiz N, Vielle A, et al. (2006) Survey of the frequency of USH1 gene mutations in a cohort of Usher patients shows the importance of cadherin 23 and protocadherin 15 genes and establishes a detection rate of above 90%. *J Med Genet.* 43(9): 763–8 [PMC free article] [PubMed]

26. Jaijo T, Aller E, Aparisi MJ, García-García G, Hernan I, et al. (2011) Functional analysis of splicing mutations in MYO7A and USH2A genes. Clin Genet. 79(3): 282–8 [PubMed]

### 3. Fe de errata:

Al realizar el análisis de ARN del cambio c.6049G>A a partir de células epiteliales nasales del paciente RP-1534 (portador en heterocigosis de la mutación c.2289+1G>A y c.6049G>A en el gen *CDH23*), se amplificó únicamente el alelo *wild type* (WT) para ese cambio, y pensamos erróneamente, que se estaba produciendo la degradación del alelo mutado por el mecanismo de *Nonsense Mediated Decay* (NMD). Sin embargo, lo que se produjo fue la no amplificación del alelo portador de la mutación c.6049G>A, pues en el análisis de ARN de la variante c.2289+1G>A ambos alelos, WT y mutante, fueron amplificados. Por tanto, la mutación c.6049G>A no produce NMD.





**V. SECUENCIACIÓN DE NUEVA  
GENERACIÓN: DIAGNÓSTICO  
MOLECULAR DEL USH**



## 1. Contexto

Actualmente, se están desarrollando nuevas plataformas de secuenciación masiva como una nueva estrategia para abordar la búsqueda de mutaciones causantes de la enfermedad de una forma rápida y de bajo coste. Existen diversas plataformas (Roche, Life technologies, Illumina, etc.) que se diferencian según el método de amplificación y/o secuenciación.

Tradicionalmente, el diagnóstico molecular del USH se realizaba mediante la secuenciación por Sanger, junto con la aplicación de otras técnicas como el MLPA y el *array*-CGH, con el objetivo de identificar las mutaciones responsables de la enfermedad.

Debido a la alta heterogeneidad genética de la enfermedad y al gran tamaño de alguno de los genes implicados, 10 genes responsables con un tamaño exómico total superior a las 100Kb, era necesario el desarrollo de una plataforma de secuenciación masiva para los genes USH, que permitiera un rápido y efectivo diagnóstico de la enfermedad.

Los genes responsables del USH han sido analizados en diversos estudios mediante diferentes plataformas de secuenciación masiva. Licastro *et al.* (2012) llevaron a cabo dos tipos de estrategias independientes para analizar los genes USH en 12 pacientes: WES y *Long-PCR*. Para la secuenciación del exoma completo usaron la plataforma SOLiD y para secuenciar la *Long-PCR* emplearon las tecnologías de Illumina y Roche. Besnard *et al.* (2014) publicaron un trabajo donde se llevó a cabo la secuenciación masiva de 19 genes, entre ellos los responsables del USH. Para ello, utilizaron la plataforma *454 GS Junior* de Roche. Analizaron un total de 71 pacientes, 21 de los cuales eran de origen español. Asimismo, Yoshimura *et al.* (2014) analizaron mediante la plataforma *Ion Torrent* de Life Technologies los genes responsables del USH en 17 pacientes USH1. Recientemente, Krawitz *et al.* (2014) emplearon la estrategia de la WES, mediante la plataforma HiSeq de Illumina, para el análisis de 9 de los genes USH en una cohorte de 44 pacientes diagnosticados de USH.

En este estudio, hemos diseñado un panel que incluye los 10 genes responsables del USH, dos genes asociados (*PDZD7* y *HARS*) y dos candidatos (*MYO15A* y *VEZT*), con el objetivo de realizar la secuenciación masiva de todos ellos, en un total de 40 pacientes de origen español. Para ello, se ha utilizado la herramienta HaloPlex (Agilent) para la plataforma de secuenciación masiva MiSeq (Illumina). Esto ha permitido identificar no sólo mutaciones puntuales si no también, variaciones en el número de copias (CNVs).



## 2. Artículo

### Targeted next generation sequencing for molecular diagnosis of Usher syndrome

María José Aparisi<sup>1,2</sup>, Elena Aller<sup>1,2</sup>, Carla Fuster-García<sup>1</sup>, Gema García-García<sup>1,4</sup>, Regina Rodrigo<sup>1,2</sup>, Rafael P. Vázquez-Manrique<sup>1,2</sup>, Fiona Blanco-Kelly<sup>2,3</sup>, Carmen Ayuso<sup>2,3</sup>, Anne-Françoise Roux<sup>4</sup>, Teresa Jaijo<sup>1,2\*</sup>, José María Millán<sup>1,2,5\*</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Enfermedades Neurosensoriales. Instituto de Investigación Sanitaria IIS-La Fe, Valencia, Spain. <sup>2</sup>CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia, Spain. <sup>3</sup>Servicio de Genética, IIS - Fundación Jiménez Díaz, University Hospital, UAM, Madrid, Spain. <sup>4</sup>CHU Montpellier, Laboratoire de Génétique Moléculaire and Inserm, U827, Montpellier, F-34000, France. <sup>5</sup>Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain.

\*Both authors contributed equally to this work

*Orphanet Journal of Rare Diseases. 2014; 9:168*

#### ABSTRACT:

**Background:** Usher syndrome is an autosomal recessive disease that associates sensorineural hearing loss, retinitis pigmentosa and, in some cases, vestibular dysfunction. It is clinically and genetically heterogeneous. To date, 10 genes have been associated with the disease, making its molecular diagnosis based on Sanger sequencing, expensive and time-consuming. Consequently, the aim of the present study was to develop a molecular diagnostics method for Usher syndrome, based on targeted next generation sequencing.

**Methods:** A custom HaloPlex panel for Illumina platforms was designed to capture all exons of the 10 known causative Usher syndrome genes (*MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH1G*, *CIB2*, *USH2A*, *GPR98*, *DFNB31* and *CLRN1*), the two Usher syndrome-related genes (*HARS* and *PDZD7*) and the two candidate genes *VEZT* and *MYO15A*. A cohort of 44 patients suffering from Usher syndrome was selected for this study. This cohort was divided into two groups: a test group of 11 patients with known mutations and another group of 33 patients with unknown mutations.

**Results:** Forty USH patients were successfully sequenced, 8 USH patients from the test group and 32 patients from the group composed of USH patients without genetic diagnosis. We were able to detect biallelic mutations in one USH gene in 22 out of 32 USH patients (68.75%) and to identify 79.7% of the expected mutated alleles. Fifty-three different mutations were detected. These mutations included 21 missense, 8 nonsense, 9 frameshifts, 9 intronic mutations and 6 large rearrangements.

**Conclusions:** Targeted next generation sequencing allowed us to detect both point mutations and large rearrangements in a single experiment, minimizing the economic cost

of the study, increasing the detection ratio of the genetic cause of the disease and improving the genetic diagnosis of Usher syndrome patients.

**KEYWORDS:** Usher syndrome, molecular diagnosis, Next Generation Sequencing, point mutations, large rearrangements.

## **BACKGROUND**

Usher syndrome (USH) is an autosomal recessive disease characterized by the association of sensorineural hearing loss, retinitis pigmentosa (RP) and, in some cases, vestibular dysfunction. Its prevalence ranges from 3 to 6.2 per 100,000 [1-3] and it is the most common form of hereditary syndromes combining hearing loss and retinitis pigmentosa.

USH has a remarkable clinical and genetic heterogeneity. According to the severity and progression of the disease, three clinical types are distinguished. Type I (USH1) is defined by profound congenital hearing loss, onset of RP usually within the first decade of life and an absence of vestibular function. Usher syndrome type II (USH2) patients display congenital moderate-severe hearing loss, onset of RP around or after puberty and normal vestibular function. Usher syndrome type III (USH3) is characterized by postlingual progressive hearing loss, RP with a variable age of onset and variable vestibular response [4]). However, in some patients the disease does not fit into any of these three subtypes, and they are classified as ‘atypical Usher syndrome’.

To date, 10 genes and three additional loci have been associated with the disease. For USH1 six genes have been identified: *MYO7A* (USH1B), *USH1C* (USH1C), *CDH23* (USH1D), *PCDH15* (USH1F), *USH1G* (USH1G) and *CIB2* (USH1J); and two additional loci have been described: USH1E [5] and USH1H [6]. Three genes have been found to cause USH2: *USH2A* (USH2A), *GPR98* (USH2C) and *DFNB31* (USH2D). For USH3 only mutations in *CLRN1* have been described, and a second locus was proposed, USH3B. Furthermore, most of these genes are also responsible for non-syndromic hearing loss or isolated RP [4,7].

In addition to these 10 genes, three other genes have been associated with USH. *PDZD7* was proposed as a contributor of digenic inheritance with *GPR98*, and as a retinal disease modifier in *USH2A* patients [8]. Recently, a novel biallelic missense variant in *HARS* was identified in two patients with a phenotype compatible with USH3. This gene encoding an aminoacyl tRNA synthetase was proposed as a novel gene causative of USH3 [9]. More recently, *CEP250* has been associated with atypical Usher syndrome [10].

Proteins encoded by Usher genes belong to different classes: actin-based motor protein, scaffolding proteins, cell-adhesion molecules or transmembrane proteins, some of them with very large extracellular domains. These proteins through their protein-protein interacting domains are integrated in a network known as “Usher-interactome”. The main sites of colocalization of Usher proteins are the stereocilia or hair bundle of the inner ear hair cells, and the synaptic and periciliary areas of the photoreceptors [4,11].

In the stereocilia, two different USH protein networks are known to be involved in the development and maintenance of the inner ear hair cells. One of them is composed of the USH2 proteins, myosin VIIA (encoded by *MYO7A*), Vezatin and PDZD7 [12,13]. Vezatin is encoded by *VEZT* and it is required for the sound resilience of cochlear hair cells. In addition, it has been proposed that it is involved in the maturation steps of these cells or in the maintenance of junction integrity between hair cells and supporting cells in the inner ear [14]. The second stereocilia interactome is composed of the USH1 proteins [15]. In this network, several unconventional myosins, as myosin XVa, have also been found [16-18]. Mutations in *MYO15A*, the gene encoding Myosin XVa, are responsible for non-syndromic autosomal recessive hearing loss DFNB3 [19]. In addition, Myosin XVa interacts with whirlin in stereocilia, considered a key event in hair-bundle morphogenesis [20], and this direct interaction at the stereocilia tip is likely to control the elongation of stereocilia [21].

In the retina, two similar molecular networks composed of USH2 and USH1 proteins have also been described. The USH2 protein network, localized at the periciliary ridge complex region, contributes to the trafficking of cargos moving from the inner segment to the outer segment of the photoreceptor cells through the connecting cilium. The USH1 interactome has been reported to localize at the membrane-membrane connection site between the outer segment of the photoreceptor cells and the calyceal processes in primates. This USH1 protein complex is thought to form an adhesion belt and would contribute to the daily renewal of photoreceptors outer segments [22-24].

Traditionally, the molecular diagnosis of Usher syndrome has been mainly based on Sanger sequencing [25,26]. However, the large size of most USH genes (above 350 exons in total) makes this technique expensive and time-consuming. Array-based mutation screenings (arrayed primer extension (APEX) technology) have become a rapid and efficient technique to detect previously described mutations, and a specific APEX-microarray for USH was developed [26]. However, most of USH mutations are private, so the low detection rate of the APEX-microarray for Usher syndrome hampers the use of this technology [27,28]. Furthermore, Copy Number Variants (CNVs) have been identified as an important cause of the disease in Usher syndrome. Deletions and duplications are screened by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), for which

commercial probemix is only available for *USH2A* and *PCDH15*, or by array-Comparative Genomic Hybridization (a-CGH) [29-31].

In recent years, next generation sequencing (NGS) techniques have been developed further, permitting the whole genome, whole exome and targeted gene sequencing to be more feasible, and hence making the identification of diseased genes and the underlying mutations easier, rapid and cost-effective. The improvement of NGS has been especially useful in the diagnosis of genetically heterogeneous diseases, such as hearing loss or retinal dystrophies [32-35].

For Usher syndrome, several NGS methods have been developed. Licastro et al. [36] used two different approaches: whole exome sequencing with the use of the SOLiD system and long-PCR sequencing on nine USH genes with two different platforms, Illumina (Genome Analyzer II) and the Roche 454 (GS FLX). Recently, Besnard et al. [37] developed a targeted NGS approach. They included 9 USH genes, 2 candidate USH genes (*VEZT* and *PDZD7*), seven hearing-loss genes and the choroideremia-causative gene *CHM* and the sequencing was carried out on Roche GS Junior sequencer. Yoshimura et al. [38] has also applied a massively parallel DNA sequencing methodology, but only for USH1 patients. Recently, Rong W et al. [39] used the NGS approach to identify three new alleles and one known mutation in *MYO7A* in three Chinese families.

We developed a molecular diagnosis of Usher syndrome based on a targeted NGS technique, HaloPlex (Agilent) gene target enrichment for Illumina platforms, including the ten USH known genes and four candidate genes that allowed us to identify not only point mutations but also CNVs, implementing a platform for the genetic diagnosis of this disease.

## **Methods**

### **Patients**

A cohort of 44 patients diagnosed with Usher syndrome was selected for this study. Their clinical classification into USH1, USH2, USH3 or atypical USH was performed on the basis of their clinical history and ophthalmologic, audiometric and vestibular tests. Patients included in this work were divided into two groups: a test group and a group composed by USH patients without genetic diagnosis.

Whenever possible, samples from additional family members were used to perform segregation analysis of the sequence variants identified in the index patient.



All patients and relatives included in the present study signed authorizing their written informed consent. The study was approved by the institutional board of the Ethics Committee of the University Hospital La Fe.

### Test group

The test group was composed of 11 patients: five USH1, four USH2, one USH3 and one atypical USH. These patients had been screened using a combination of techniques as Sanger sequencing, APEX microarray for Usher syndrome or MLPA. Variants of different nature in six USH genes had been previously detected and were used as positive controls in the present study. Table 1 shows the previously identified changes in the test group.

**Table 1.** Test group: patients carrying sequence variants in USH genes previously detected.

Patient	Clinical type	Gene	Type variant	Nucleotide	Protein	Classification
RP-808	USH1	<i>CDH23</i>	Intronic	c.6059-9G>A	-----	Pathogenic. UV4
		<i>USH1G</i>	Missense	c.387A>G	p.Lys130Glu	UV1
		<i>USH1G</i>	Missense	c.423G>A	p.Glu142Lys	UV2
RP-1145	USH2	<i>USH2A</i>	Frameshift duplication	c.10272-10274dup	p.Cys3425Phefs*4	Pathogenic. UV4
		<i>USH2A</i>	Nonsense	c.7854G>A	p.Trp2618*	Pathogenic. UV4
		<i>DFNB31</i>	Isocoding	c.117G>A	p.Val39Val	UV1
RP-1286 <sup>§</sup>	USH1	<i>PCDH15</i>	Frameshift insertion	c.1304_1305insC	p.Thr436Tyrfs*12	Pathogenic. UV4
RP-1374	USH1	<i>PCDH15</i>	Nonsense	c.7C>T	p.Arg3*	Pathogenic. UV4
RP-1426	USH1	<i>MYO7A</i>	Missense	c.6610G>C	p.Ala2204Pro	Pathogenic
RP-1522	USH2	<i>USH2A</i>	Frameshift deletion	c.2299delG	p.Glu767Serfs*21	Pathogenic. UV4
		<i>CDH23</i>	Missense	c.1096G>A	p.Ala366Thr	UV2
RP-1608 <sup>§</sup>	USH3	<i>USH2A</i>	Missense	c.9799T>C	p.Cys3267Arg	Pathogenic. UV4
RP-1614	USH1	<i>MYO7A</i>	Frameshift deletion	c.6025delG	p.Ala2009Profs*32	Pathogenic. UV4
RP-1637	USH2	<i>USH2A</i>	Frameshift duplication	c.5540dupA	p.Asn1848Glufs*20	Pathogenic. UV4
		<i>USH2A</i>	Large deletion	Del IVS4_IVS9	p.Gly262Valfs*2	Pathogenic. UV4
RP-1757 <sup>§</sup>	Atypical	<i>MYO7A</i>	In-frame deletion	c.655_660del	p.Ile219_His220del	Pathogenic. UV4
RP-1760	USH2	<i>USH2A</i>	Missense	c.2296T>C	p.Cys766Arg	UV3

Samples that failed in the amplification process are marked with §.

### **Cohort of USH patients previously unscreened**

A cohort of 33 USH patients without genetic diagnosis was enrolled in this study. It was composed of 13 USH1 patients, 17 USH2 and 3 USH3 cases.

### **DNA Samples**

Genomic DNA from patients and relatives was extracted from EDTA blood using an automated DNA extractor (Magna Pure, Roche). DNA samples were purified with the “*QIAquick PCR Purification Kit*” following the manufacturer’s instructions. The concentration of the genomic DNA was determined with the “*Qubit dsDNA BR Assay Kit*” in the Qubit 2.0 fluorometer.

### **Targeted next generation sequencing design**

A custom HaloPlex panel was designed using Agilent’s SureDesign tool ([www.agilent.com/genomics/suredesign](http://www.agilent.com/genomics/suredesign)) to capture all exons and 25 bp of intronic flanking regions of 14 genes. The target genes included in our work were the 10 causative Usher syndrome genes (*MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH1G*, *CIB2*, *USH2A*, *GPR98*, *DFNB31* and *CLRN1*), two related USH genes (*HARS* and *PDZD7*) and two candidate genes *VEZT* and *MYO15A*, due to their involvement in the Usher interactome [14,20,21]. The novel *CEP250* [10] had not been associated with USH at the beginning of this study, so it was not included in our work.

The entire custom design was 481 targets with a total size of 132.763 Kb. The exons from the different isoforms included in this study are summarized in Table 2. The intronic region where the *USH2A* mutation c.7595-2144A > G [37] is located, was included in the design. The final probe design size was 296.74 Kb with a theoretical coverage of 99.88% for our targeted regions. The difference in size between our entire custom design and the final probe design was due to an intrinsic process of the engineering of probes by Agilent’s Sure Design tool for the HaloPlex protocol.

### **Sequence capture and next generation sequencing**

Sequence capture was performed according to the “*HaloPlex Target Enrichment System*” (Protocol Version D.5, *Agilent Technologies Inc, CA, USA*) for Illumina Sequencing. Between 225 to 450 ng of gDNA were digested by 16 different restriction enzymes to create a library of gDNA restriction fragments. Four 12-reaction runs were performed including in each of them 11 gDNA samples and one Enrichment Control DNA sample. These enzymatic digestions were validated by electrophoretic analysis in a

polyacrylamide gel. The gDNA restriction fragments were hybridized to the HaloPlex probe capture library. In this step, the Illumina sequencing motifs including index sequences were incorporated into the targeted fragments and the target DNA-HaloPlex probe hybrids were circularized. These hybrid molecules were captured using streptavidin beads. The DNA ligase was then added to close nicks in the circularized HaloPlex probe-target DNA hybrids and the captured DNA libraries were eluted with NaOH.

A PCR amplification of the captured target libraries was performed following the manufacturer's instructions and, after its purification with the "AMPure XP beads" (BECKMAN CULTER Inc), the validation and quantification of the enriched target DNA in each library was performed using the 2100 Bioanalyzer system with the *High Sensitivity DNA Kit* and the 2100 Expert Software (Agilent Technologies Inc, CA, USA). The last step of the protocol was to pool samples for multiplexed sequencing in the Illumina sequencing platform MiSeq System (Illumina, Inc).

### **Variant analysis**

Data was analyzed using the platform provided by DNAnexus (www.dnanexus.com). Two different versions were used: DNAnexus Classic and the DNAnexus version recently implemented. Annotated variants were selected according to the following criteria: the quality value should be  $\geq 250$ , a percentage of heterozygosity  $\geq 30\%$  of the reads, their annotation in the dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) and their description in the Usher syndrome mutation database ([https://grenada.lumc.nl/LOVD2/Usher\\_montpellier](https://grenada.lumc.nl/LOVD2/Usher_montpellier)). Variants should be observed in both direct and reverse strands.

Variants selected and suspected to be pathogenic were confirmed by Sanger sequencing. The DNA fragments containing the variants were amplified by PCR with specific primers and were sequenced on both strands using the Big Dye 3.1 Terminator Sequencing Kit. The purified sequence products were analyzed on a 3500xl ABI instrument (Applied Biosystems by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Inc).

The pathogenicity of novel missense variants was analyzed with the SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) and PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) algorithms. Those putative variants that affect the splicing process were studied with the NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/service/NetGene2>), NNSPLICE v0.9 ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)), Human Splicing Finder (HSF; <http://www.umd.be/HSF>) and RESCUE-ESE (<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>) programs.

Novel variants were classified based on the classification system for Unknown Variants (UV) ([https://grenada.lumc.nl/LOVD2/Usher\\_montpellier](https://grenada.lumc.nl/LOVD2/Usher_montpellier)) as pathogenic (UV4), possibly pathogenic (UV3), possibly non-pathogenic (possibly neutral, UV2) and non-pathogenic (neutral, UV1) according to bioinformatics predictions and segregation analysis. This classification is in line with the guidelines published by the clinical and molecular genetics society ([http://www.cmgs.org/BPGs/Best\\_Practice\\_Guidelines.htm](http://www.cmgs.org/BPGs/Best_Practice_Guidelines.htm)).

Nomenclature of variants was performed according to the reference sequences: *MYO7A* (NM\_000260.3), *USH1C* (NM\_153676), *CDH23* (NM\_022124.5), *PCDH15* (NM\_033056.3), *USH1G* (NM\_173477), *CIB2* (NM\_006383.2), *USH2A* (NM\_206933), *GPR98* (NM\_032119.3), *DFNB31* (NM\_015404), *CLRN1* (NM\_174878), *HARS* (NM\_002109), *PDZD7* (NM\_001195263.1), *VEZT* (NM\_017599) and *MYO15A* (NM\_016239).

Segregation analysis was performed in cases where DNA samples of relatives were available.

### **Copy number variation analysis and validation**

The coverage of every target region of the sample of interest was normalized and compared with average normalized data of all other samples of the same run to obtain the ratio relative coverage. Deletions and duplications were suspected of being present if this ratio fell below 0.7 or rose above 1.3 respectively.

Validation of rearrangements of *USH2A* and *PCDH15* was performed by MLPA analysis. For *USH2A* the SALSA MLPA probemixes P361 and P362 were used. To confirm the *PCDH15* copy number variations the SALSA MLPA probemix P292 was employed. The MLPA reactions were performed according to the manufacturer's recommendations (<http://www.mlpa.com>).

In the cases of putative rearrangements identified in *CDH23* and *GPR98*, their validation was carried out by an oligonucleotide array-CGH. The array-CGH chip included 77,366 probes covering the genes *MYO7A*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH1C*, *USH1G*, *USH2A*, *GPR98*, *DFNB31*, *PDZD7* and *CLRN1* and 10,000 nucleotides of 5' and 3' untranslated regions [30].

**Table 2.** Details about the exons studied in this targeted NGS analysis for the 14 genes analyzed.

Chr	Gene	RefSeq	Coding exons	Size (bp)	Coding Size (bp)	Amino acids	Alternative Ref Sec	Additional exons and the intronic <i>USH2A</i> region included in the study	Size (bp)	Number of exons analyzed
11	<i>MYO7A</i>	NM_000260.3 variant 1	48	7465	6648	2215				48
10	<i>CDH23</i>	NM_022124.5 variant 1	69	11134	10065	3354	NM_052836.3 variant 2	1	150	70
10	<i>PCDH15</i>	NM_033056.3 variant C	32	7021	5868	1955	NM_001142773.1 variant H	1	6	38
							NM_001142769.1 variant I	2	871	
							NM_001142771.1 variant K	2	4469	
11	<i>USH1C</i>	NM_153676 variant 3	27	3246	2700	899	NM_005709.3 variant 1	1	75	28
17	<i>USH1G</i>	NM_173477.4 variant 1	3	3565	1386	461				3
15	<i>C1B2</i>	NM_006383.2 variant 1	6	1580	564	187				6
1	<i>USH2A</i>	NM_206933.2 variant 2	71	18883	15609	5202	NC_000001.11	c.7595-2144A>G	152	71+1 intronic sequence
5	<i>GPR98</i>	NM_032119.3 variant 1	90	19333	18921	6307				90
9	<i>DFNB31</i>	NM_015404.3 variant 1	12	4079	2724	907	NM_001083885.2 variant 2	1	110	13
3	<i>CLRN1</i>	NM_174878.2 variant 1	3	2359	699	232	NM_052995.2 variant 4	1	20	4
10	<i>PDZD7</i>	NM_001195263.1 variant 1	17	4164	3102	1033	NM_024895.4 variant 2	1	285	18

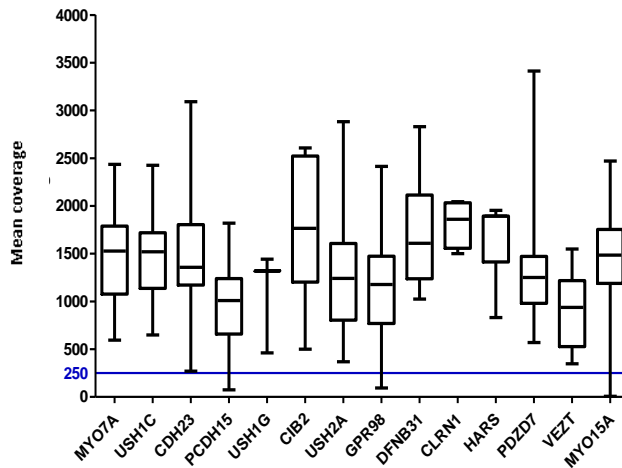
V. Secuenciación de Nueva Generación: Diagnóstico Molecular del USH \_\_\_\_\_

5	HARS	NM_002109.5 variant1	13	2322	1530	509				13
17	MYO154	NM_016239.3	65	11876	10593	3530				65
12	VEZT	NM_017599 variant 1	12	4580	2340	779			1	74
Total targets										481

## Results

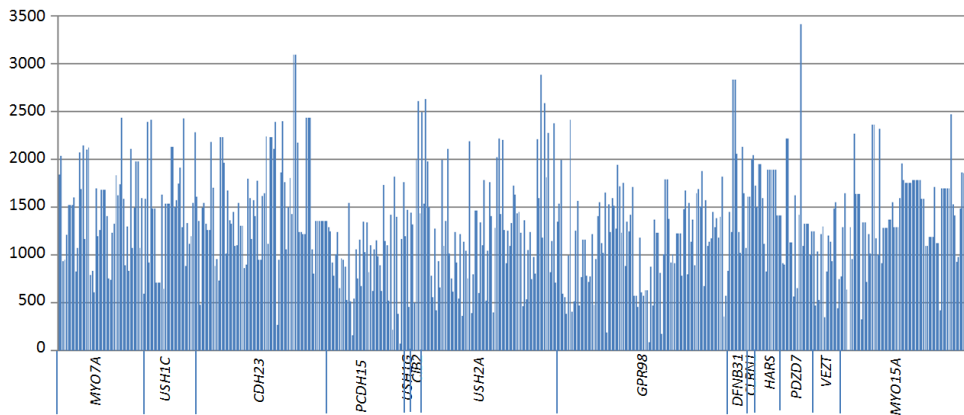
### Next generation sequencing results of the USH panel

Capture of NGS using our customized USH panel was performed in a cohort of USH patients. High quality results were obtained. On average, a mean coverage of 1334x was obtained per sample and target region. Different average coverages were obtained for the fourteen analyzed genes, ranging from 935x (*VEZT*) to 1817x (*CLRN1*) (Figure 1).



**Figure 1.** Mean coverage obtained for the different genes. The blue line shows the lower limit of coverage appropriate to perform CNV analyses (250x).

Only one of the selected targeted regions showed coverage lower than 40x, the defined limit for proper validation and diagnostic procedures. This target was a coding region of 43 bp in the large exon 2 of *MYO15A*. A schematic representation of the coverage of all target regions is showed in Figure 2.



**Figure 2.** Mean coverage of all targeted regions included in our custom design.

**Test group: validation of the diagnostic strategy**

Eleven USH patients were included in the test group to verify the reliability of our NGS custom panel. In these cases, 17 mutations and polymorphism had been previously detected in different USH genes by Sanger or by MLPA (Table 1).

During the experiment three control patients and one studied patient failed in the capture step of the target DNA of the HaloPlex protocol. Due to a manual/technical problem with the PCR strips and magnetic rack Dynabeads, the circularized target DNA-HaloPlex probe hybrids, containing biotin, were not captured on streptavidin beads and these samples were lost.

The remaining eight patients were carriers of 14 different variants including missense, nonsense, point deletions or insertions and large deletions (Table 1). Our NGS approach allowed us to detect all previously detected changes in the testing cohort, both point mutations and CNVs.

The sequencing of the USH genes allowed the detection of a second pathologic allele in five patients in whom only one mutation was previously detected. In addition, in patient RP-1426, previously a carrier of a pathogenic variant in *MYO7A*, we were able to identify a novel splice site mutation in *CDH23*. These results are summarized in Table 3.



### **Cohort of USH patients previously unscreened**

In our cohort of 33 USH patients studied, mutations could be identified in the majority of analyzed cases. One of the USH cases failed in the capture and amplification of the library due to the same manual/technical error explained above. If we take into account the remaining 32 USH cases analyzed, we identified in 22 patients the two expected mutated alleles, in 5 cases only one pathogenic variant and in one case, RP-1950, two pathogenic variants were detected in two different USH2 genes. In four patients no mutation was found. In addition two patients (RP-1847 and RP-1923) were carriers of three mutations in USH genes (Table 3).

In this study, we were able to identify 53 different mutations, of which 24 were novel. These variants included 21 missense, 8 nonsense, 9 frameshifts, 9 intronic mutations and 6 large rearrangements.

The DNA nexus program showed a high number of novel variants in each patient. These changes were selected according to their nature, or the presence of another pathogenic allele in the same gene in the same patient. The variants were confirmed by Sanger sequencing and missense, isocoding or intronic variants were analyzed by different *in silico* algorithms to predict their pathogenic effect. According to the bioinformatics predictions, 15 variants out of 25 studied variants were considered as pathogenic (UV4) or possibly pathogenic (UV3) (Table 4).

Segregation analysis of detected alleles with the respective family members was performed in 13 cases, and cosegregation of the mutations with the disease was verified in all these cases (Table 3).

### **CNVs Detection**

Next Generation Sequencing with the Illumina MiSeq system allowed us to perform qualitative and quantitative analysis. We could detect not only point mutations but also CNVs.

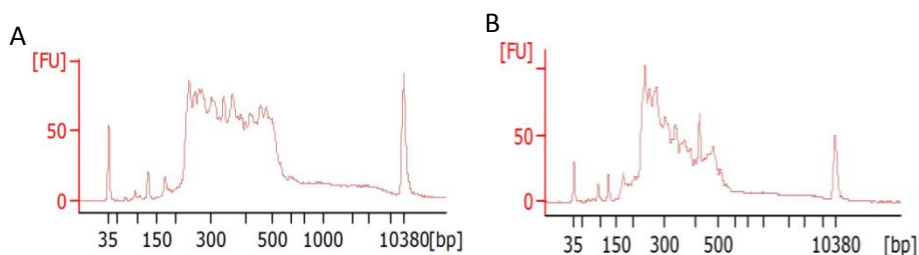
In our cohort of patients we performed CNV analysis in all patients where two point mutations had not been detected. This analysis allowed us to identify six large rearrangements: three deletions in *USH2A* comprising the exons 14, 20 and 44, and three duplications comprising the exon 29 in *CDH23*, exons 22\_23 in *PCDH15* and exons 79\_83 in *GPR98*. The *USH2A* and the *CDH23* rearrangements were detected in a heterozygous state, whereas the *PCDH15* and *GPR98* duplications were identified in a homozygous state.

Large rearrangements in *USH2A* and *PCDH15* were subsequently confirmed by MLPA, whereas patients that carried duplications affecting *CDH23* and *GPR98* were analyzed by a-CGH (data not shown). In 5 patients, the rearrangements detected by comparison of normalized coverage data were confirmed. The a-CGH technique to confirm the presence of the heterozygous duplication of *CDH23* (exon 29) in patient RP-1781 was not successful due to technical problems. Unfortunately, it was impossible to get a new DNA sample for this patient to repeat the experiment.

Three of the six rearrangements found in this study had been previously described. The *USH2A* deletions of exon 14 and exon 44 were described by Glockle et al. [35] and the *GPR98* duplication was previously described by Besnard et al. [52]. The deletion of exon 14 in *USH2A* has also been detected by our group, in one Spanish USH patient in a homozygous state (unpublished results).

In our cohort of patients previously unscreened we could detect 51 altered alleles, six of which corresponded to large rearrangements, i.e. 11.76% of the detected pathogenic alleles.

In one patient no point mutation was identified, and the quantitative analysis could not be performed (RP-531). The ratio between this sample and the normalized data was altered in a high number of target regions from most genes. In this case, the image obtained with the bioanalyzer in the validation and quantification of the enriched target DNA process was atypical (Figure 3).



**Figure 3:** Images obtained in the validation and quantification of the enriched target DNA with the 2100 Bioanalyzer system. A) Typical image obtained in most patients. B) Atypical image obtained in the patient RP-531, in whom CNV analysis could not be performed.

In some cases, we could observe that the CNV analysis displayed doubtful results in the targeted regions. The analysis of those target regions revealed coverages lower than 250x.

**Table 3:** Causative mutations and putative pathogenic variants identified in this study.

Patient	Clinical type	Gene	Exon	Nucleotide variant	Protein variant	Reference	Segregation analysis
<b>Patients with two pathogenic mutations in the same gene</b>							
RP-807	USH2	<i>MYO7A</i>	40	<b>c.5516T&gt;C</b>	<b>p.Leu1839Pro</b>	Novel. UV3	Yes
		<i>MYO7A</i>	27	<b>c.3503G&gt;A</b>	<b>p.Arg1168Gln</b>	Novel. UV3	
RP-808 <sup>†</sup>	USH1	<i>CDH23</i>	47	c.6059-9G>A	---	von Brederlow et al., (2002)[42]	No
		<i>CDH23</i>	10	<b>c.871G&gt;A</b>	<b>p.Gly291Arg</b>	Novel. UV3	
RP-890	USH3	<i>USH2A</i>	26	c.5278delG	p.Asp1760Metfs*10	Garcia-Garcia et al., (2011)[43]	No
		<i>USH2A</i>	26	c.5278delG	p.Asp1760Metfs*10	Garcia-Garcia et al., (2011)[43]	
RP-1182	USH1	<i>PCDH15</i>	22_23	<b>Duplication exons 22_23</b>	---	Novel. UV4	No
		<i>PCDH15</i>	22_23	<b>Duplication exons 22_23</b>	---	Novel. UV4	
RP-1183	USH1	<i>CDH23</i>	26	c.3016G>A	p.Glu1006Lys	Schultz et al., (2011)[44]	No
		<i>CDH23</i>	26	c.3016G>A	p.Glu1006Lys	Schultz et al., (2011)[44]	
RP-1234	USH1	<i>MYO7A</i>	43	<b>c.5884delTTCT</b>	<b>p.Phe1962Leufs*7</b>	Novel. UV4	Yes
		<i>MYO7A</i>	43	<b>c.5884delTTCT</b>	<b>p.Phe1962Leufs*7</b>	Novel. UV4	
RP-1237	USH1	<i>CDH23</i>	46	c.6049G>A	p.Gly2017Ser	Roux et al., (2006)[45]	No
		<i>CDH23</i>	46	c.6049G>A	p.Gly2017Ser	Roux et al., (2006)[45]	
RP-1374 <sup>†</sup>	USH1	<i>PCDH15</i>	2	c.7C>T	p.Arg3*	Ahmed et al., (2001)[46]	Yes
		<i>PCDH15</i>	27	c.3717+2dupT	---	Jajjo et al., (2012)[47]	

RP-1422	USH1	MYO7A	43	c.5944G>A	p.Gly1982Arg	Riazuddin et al., (2008)[48]	Yes
		MYO7A	43	c.5944G>A	p.Gly1982Arg	Riazuddin et al., (2008)[48]	
RP-1522 <sup>†</sup>	USH2	USH2A	13	c.2299delG	p.Glu767Serfs*21	Liu et al., (1999)[49]	No
		USH2A	20	Deletion exon 20	---	Novel, UV4	
RP-1551	USH1	PCDH15	27	c.3511delA	P.Asp1172Ilefs*13	Novel, UV4	Yes
		PCDH15	27	c.3511delA	P.Asp1172Ilefs*13	Novel, UV4	
		MYO7A	44	c.6025delG	p.Ala2009Profs*32	Bharadwaj et al., (2000)[50]	
RP-1614 <sup>†</sup>	USH1	MYO7A	40	c.5537C>A	p.Pro1846His	Novel, UV3	No
		USH2A	55	c.10888delA	p.Gly3631Valfs*43	Novel, UV4	
RP-1760 <sup>†</sup>	USH2	USH2A	13	c.2296T>C	p.Cys766Arg	Glöcke et al., (2013)[36]	No
		CDH23	29	Duplication exon 29	---	Novel, UV4	
RP-1781	USH2	CDH23	68	c.9569C>T	p.Ala3190Val	Novel, UV3	No
		MYO7A	20	c.2283-1G>T	---	Roux et al., (2006)[45]	
RP-1791	USH1	MYO7A	28	c.3594C>A	p.Cys1198*	Roux et al., (2011)[45]	Yes
		USH2A	63	c.13811+2T>G	---	Besnard et al., (2014)[38]	
RP-1802	USH2	USH2A	50	c.9799T>C	p.Cys3267Arg	Aller et al., (2006)[51]	No
		USH2A	57	c.11065C>T	p.Arg3689*	Le Quesne Stabel et al., 2012[26]	
RP-1835	USH2	USH2A	22	c.4758+3A>G	---	Novel, UV3	Yes
		MYO7A	6	c.494C>T	p.Thr165Met	Ouyang et al., (2005)[53]	
RP-1864	USH2	MYO7A	6	c.494C>T	p.Thr165Met	Ouyang et al., (2005)[53]	No
		GPR98	79_83	Duplication exons 79_83	---	Besnard et al., (2012)[54]	
RP-1895	USH2	GPR98	79_83	Duplication exons 79_83	---	Besnard et al., (2012)[54]	No
		GPR98	79_83	Duplication exons 79_83	---	Besnard et al., (2012)[54]	

RP-1904	USH2	<i>GPR98</i>	11	<b>c.2145_2149delGTTTT</b>	<b>p.Leu715Phefs*6</b>	Novel, UV4	Yes
		<i>GPR98</i>	14	<b>c.2612delG</b>	<b>p.Gly871Gluufs*8</b>	Novel, UV4	
RP-1910	USH1	<i>CDH23</i>	60	c.8722+1delG	---	Oshima et al., (2008)[55]	Yes
		<i>CDH23</i>	60	c.8722+1delG	---	Oshima et al., (2008)[55]	
RP-1924	USH1	<i>MYO7A</i>	39	c.5392C>T	p.Gln1798*	Janecke et al., (1999)[56]	Yes
		<i>MYO7A</i>	27	<b>c.3503G&gt;A</b>	<b>p.Arg1168Gln</b>	Novel, UV3	
RP-1927	USH2	<i>USH2A</i>	21	c.4474G>T	p.Glu1492*	Bernal et al., (2005)[57]	Yes
		<i>USH2A</i>	2	<b>c.269A&gt;G</b>	<b>p.Tyr90Cys</b>	Novel, UV3	
RP-1948	USH1	<i>MYO7A</i>	7	<b>C.707T&gt;A</b>	<b>p.Leu236Gln</b>	Novel, UV3	No
		<i>MYO7A</i>	42	c.5749G>T	p.Glu1917*	Jacobson et al., (2009)[58]	
RP-1960	USH2	<i>USH2A</i>	25	<b>c.5167G&gt;C</b>	<b>p.Gly1723Arg</b>	Novel, UV3	No
		<i>USH2A</i>	7	c.1214delA	p-Asn405Ilefs*3	Bernal et al., (2005)[57]	
<b>Patients with three pathogenic mutations in two different genes</b>							
RP-1847	USH2	<i>USH2A</i>	62	c.12067-2A>C	---	Kaiserman et al., (2007)[52]	Yes
		<i>USH2A</i>	14	Deletion exon 14	---	Glöckle et al., (2013)[36]	
		<i>USH1G</i>	2	<b>c.805C&gt;T</b>	<b>p.Arg269*</b>	Novel, UV4	
RP-1923	USH2	<i>USH2A</i>	62	c.12093delC	p.Tyr4031*	García-García et al., (2011)[43]	No
		<i>USH2A</i>	44	Deletion exon 44	---	Glöckle et al., (2013)[36]	
		<i>DFNB31</i>	9	<b>c.2234G&gt;A</b>	<b>p.Arg745His</b>	Novel, UV3	

Patients with only one pathogenic mutation							
RP-1455	USH1	<i>USH2A</i>	28	<b>c.5666A&gt;G</b>	<b>p.Asp1889Gly</b>	Novel. UV3	No
RP-1496	USH3	<i>GPR98</i>	19	<b>c.3443G&gt;A</b>	<b>p.Gly1148Asp</b>	Novel. UV3	No
RP-1741	USH2	<i>USH2A</i>	PE40	c.7592-2144A>G	---	Vaché et al., (2012)[41]	No
RP-1929	USH2	<i>GPR98</i>	58	<b>c.11974G&gt;A</b>	<b>p.Asp3992Asn</b>	Novel. UV3	No
RP-1953	USH2	<i>USH1C</i>	18	c.1859G>T	p.Arg620L.eu	Ouyang et al., (2002)[59]	No
Patients with pathologic mutations in different genes							
RP-1426 <sup>†</sup>	USH1	<i>MYO7A</i>	49	c.6610G>C	p.Ala2204Pro	Jaijo et al., (2007)[60]	Yes
		<i>CDH23</i>	39	<b>c.5068-2A&gt;T</b>	---	Novel. UV4	
RP-1950	USH2	<i>USH2A</i>	70	c.2299delG	p.Glu767Ser[S*21]	Lin et al., (1999)[49]	No
		<i>GPR98</i>	70	<b>c.14278C&gt;T</b>	<b>p.Pro4760Ser</b>	Novel. UV3	

Patients previously included in the test group are marked with †.

Novel variants are marked in bold

PE: pseudoxon 40

**Table 4:** Summary of putative pathogenic mutations and their bioinformatics predictions.

Patient	Gene	Exon	Nucleotide Change	Amino Acid Change	Classification	SIFT (score)	PolyPhen-2 (score)	NetGene2	Human Splicing Finder	NNSPLICE	RESCUE-ESE
RP-1948	<i>MYO7A</i>	7	c.707T>A	p.Leu236Gln	UV3	deleterious (0)	probably damaging (1)	Neutral	Neutral	Neutral	A new ESE site is created
RP-807 RP-1924	<i>MYO7A</i>	27	c.3503G>A	p.Arg1168Gln	UV3	deleterious (0)	probably damaging (1)	Score for the main donor site decreases from 95 to 75	Score for the main donor site decreases from 90 to 80	The main donor site is not recognized	Neutral
RP-807	<i>MYO7A</i>	40	c.5516T>C	p.Leu1839Pro	UV3	deleterious (0)	probably damaging (1)	Score for the main acceptor site decreases from 80 to 77	Neutral	Neutral	Neutral
RP-1614	<i>MYO7A</i>	40	c.5537C>A	p.Prp1846His	UV3	deleterious (0.01)	possibly damaging (0.85)	Score for the main acceptor site decreases from 80 to 77 and one acceptor site is not recognized	Neutral	Neutral	Neutral
RP-808	<i>CDH23</i>	10	c.871G>A	p.Gly291Arg	UV3	deleterious (0)	probably damaging (1)	Neutral	Neutral	Neutral	A new ESE site is created
RP-1426	<i>CDH23</i>	39	c.5068-2A>T	c.5068-2A>T	UV4	---	---	The main acceptor site is not recognized	Score for the main acceptor site decreases from 95 to 66	The main acceptor site is not recognized	---
RP-1781	<i>CDH23</i>	68	c.9569C>T	p.Ala3190Val	UV3	deleterious (0)	probably damaging (1)	Neutral	Neutral	Neutral	Neutral
RP-1927	<i>USH2A</i>	2	c.269A>G	p.Tyr90Cys	UV3	tolerated (0.17)	possibly damaging (0.796)	Score for acceptor site decreases from 82 to 80	Neutral	Score for acceptor site decreases from 75 to 69	A ESE site is not recognized

RP-1835	<i>USH2A</i>	22	c:4758+3A>G	c:4758+3A>G	p.Gly1723Arg	UV3	---	---	The main donor site is not recognized	Neutral	The main donor site decreases from 98 to 73	---
RP-1960	<i>USH2A</i>	25	c:5167G>C	p.Gly1723Arg	UV3	deleterious (0)	probably damaging (0.994)	The main donor site is not recognized	Score for the main donor site decreases from 86 to 75	The main donor site is not recognized	Neutral	
RP-1455	<i>USH2A</i>	28	c:5666A>G	p.Asp1889Gly	UV3	deleterious (0)	probably damaging (0.982)	The main donor and acceptor sites decrease from 82 to 80 and from 53 to 48 respectively and a new acceptor site is created	Neutral	Neutral	Two ESEs are not recognized	
RP-1496	<i>GPR98</i>	19	c:3443G>A	p.Gly1148Asp	UV3	deleterious (0)	probably damaging (0.999)	Neutral	Neutral	Neutral	Neutral	
RP-1929	<i>GPR98</i>	58	c:11974G>A	p.Asp3992Asn	UV3	deleterious (0.01)	probably damaging (0.999)	Neutral	Neutral	Neutral	A ESE is not recognized	
RP-1950	<i>GPR98</i>	70	c:14278C>T	p.Pro4760Ser	UV3	deleterious (0)	probably damaging (0.998)	Neutral	Neutral	Neutral	Neutral	
RP-1923	<i>DFNB31</i>	9	c:2234G>A	p.Avg745His	UV3	deleterious (0.01)	probably damaging (0.984)	Neutral	Neutral	The main donor site increases from 66 to 86	Neutral	

SIFT: SIFT Score ranges from 0 to 1. The amino acid substitution is predicted to be damaging if the score is < 0.05, and tolerated if the score is > 0.05.

PolyPhen stabilish three classifications: “Probably damaging” (it is believed most likely to affect protein function or structure), “Possibly damaging” (it is believed to affect protein function or structure), “Benign” (most likely lacking any phenotypic effect).

ESE: Exonic Splicing Enhancer



## Discussion

### Resolved cases

Usher syndrome displays both genetic and allelic heterogeneity. The number of genes related to the disease and the large size of most of them contribute to the genetic heterogeneity. Furthermore, mutations causing disease include point mutations and large rearrangements, most of them, being private. Recently, the high-throughput sequence analysis and next generation sequencing, has been proved to be very helpful to carry out genetic studies in heterogeneous diseases.

In this study we have developed a targeted method based on NGS for the molecular diagnosis of Usher syndrome. We evaluated our panel in a group of patients with known USH variants and applied it to a cohort of USH patients previously unscreened.

In our series of study, we were able to detect biallelic mutations in one USH gene in 22 out of 32 USH patients (68.75%) and to identify 51 out of the 64 expected mutated alleles (a detection ratio of 79.7%).

### Uncovered regions

We obtained a highly heterogeneous coverage using a custom *HaloPlex Target Enrichment System* (see Fig. 1). However, only one region included in the final design showed a mean coverage lower than 40x in our samples. It corresponded to a 43 bp sequence in the large exon 2 of *MYO15A*. That fragment shows a high percentage of CGs, 77%. It has been reported that most sequencing platforms, including Illumina sequencers, show a GC content-dependent bias coverage, and protocols should be modified to minimize these events [61].

### Unresolved cases

Mutations were not detected in four patients of our cohort. In one USH1 case detailed clinical data could not be obtained, whereas in the remaining cases clinical information was revised and the USH diagnosis was confirmed. Five additional patients were carriers of only one pathogenic variant (Table 3), the second mutation remaining unidentified.

In these cases, in which the second mutated allele escapes detection, the region that contains the mutation may have been excluded from our study. It is possible that the gene responsible for the disease had not yet been identified, and therefore it could not be

included in our panel. Furthermore, deep intronic regions, promoter regions or 5' and 3' untranslated regions were not systematically included in the panel design. The only intronic region targeted in our panel was designed to detect the *USH2A* c.7595-2144A > G mutation identified by Vaché et al. [58] in five French patients and four Spanish patients. Moreover, it was subsequently detected in five additional families [31]. Subsequently, Steele-Stallard et al. [31] detected this intronic change in three UK and European USH families.

In two patients, two mutated alleles, each one in a different gene, were detected (Table 3). Patient RP-1426 was carrier of a missense *MYO7A* variant (p.Ala2204Pro). Using the NGS panel we could not detect a second mutation in *MYO7A*, but a splice acceptor site mutation (c.5068-2A > T) was found in *CDH23*. In the USH2 patient RP-1950, the *USH2A* mutation c.2299delG and a novel missense variant (p.Pro4760Ser) in *GPR98* were detected. Bioinformatics algorithms predicted a pathogenic effect for these two novel variants (Table 4). In the former case, the two mutations were present in the same, clinically unaffected parent (data not shown), which does not support a digenic inheritance of USH. Unfortunately, segregation analysis could not be performed in the case of patient RP-1950. Perhaps a second mutation remains undetected in one of these genes in the patients RP-1426 and RP-1950. In two other patients (RP-1847 and RP-1923) with biallelic mutations in *USH2A*, we were able to detect additional mutations in *USH1G* and *DFNB31*, respectively. These cases show the high decisive power of massive parallel re-sequencing, detecting additional mutations in patients carrying the two mutations responsible for the disease in the same gene.

The programs used to analyze the data generated from NGS followed different algorithms. In fact, both the alignment and the base calling are two crucial steps in these analyses. It is possible that some mutations could escape detection due to the algorithms used. Their modification will improve the quality of generated data, avoiding false negatives and allowing detection of missed mutations in further analysis.

Four patients carried two mutations in genes typically responsible for another clinical subtype. Two USH2 patients carried missense mutations in *MYO7A* (RP-807 and RP-1864), one USH2 case in *CDH23* (RP-1781) and a USH3 patient carried a homozygous frameshift deletion in *USH2A* (RP-890) (Table 2). The situation of USH patients diagnosed with a given clinical subtype, who carry mutations in a gene involved in a different subtype, is not unprecedented, and was previously reported [25]. These findings further support the use of NGS techniques that allow for the study of all known causative genes for Usher syndrome in patients independent of their clinical subtype. It facilitates the detection of mutations in genes typically associated with other clinical types.

### Copy number variation analysis

Studies performed in different populations have demonstrated that large rearrangements are an important cause of the disease in Usher syndrome. Le Guedard et al. [62] and Aller et al. [29] demonstrated that *PCDH15* rearrangements are a significant cause of USH alterations. Large deletions involving *USH2A* have been reported [22,35], and large rearrangements in other USH genes as *MYO7A*, *CDH23* or *GPR98* have been detected [30,62]. These results indicate that the genetic analysis in USH patients should include the screening of rearrangements.

We have obtained with the MiSeq system a mean coverage in our USH panel of 1334x per sample and target region, allowing for CNV analysis of the selected genes. We could then detect in our series of patients six different rearrangements in *CDH23*, *PCDH15*, *USH2A* and *GPR98*, which represents 11.8% of the mutated detected alleles. We observed that when the coverage of regions fell below 250x, the results obtained in the CNV analysis were questionable and we did not take into account those regions. In order to perform quantitative analysis, we recommend, therefore, coverage of targeted regions above 250x.

In one patient (RP-531) the validation of the enrichment process gave an atypical image in the bioanalyzer (Figure 3). In this case the CNV analysis could not be performed. However, this does not affect the detection of point mutations. In fact, in another patient with a similar image in the validation (RP-808), two point mutations were detected.

### Comparison with other NGS studies of USH

Traditionally, Sanger sequencing was used to identify the mutations responsible of the disease [25,50]. Nowadays different methods based on NGS have been used for Usher syndrome. Licastro et al. [36] employed two different approaches: the whole exome sequencing and long-PCR sequencing on nine USH genes. Whole exome sequencing has several problems: a low coverage of the interesting regions and the need of a correct interpretation of the high number of sequence variations identified. Regarding the long-PCR method, it displayed a better mean coverage, higher than 25x in 94% of regions. Taking together both approaches, the detection of pathogenic alleles was 62.5%.

Recently, Besnard et al. [37] developed a targeted NGS panel where 9 USH genes, 2 candidate USH genes (*VEZT* and *PDZD7*), seven hearing-loss genes and *CHM* were included. The overall depth of coverage obtained was estimated as 77x across the whole design ranging from 55.8x to 106.9x, with a detection ratio of 84.6% in the studied USH cohort.

In our series, the detection rate of mutated alleles was 79.7%. Our results are close to the Besnard et al. [37] study and higher than to the Licastro et al. [36] approaches. However, it is difficult to obtain conclusions due to the low number of patients included in those studies (thirteen and twelve USH patients respectively), whereas in our series 32 USH patients previously unscreened were sequenced.

Furthermore, in both previous studies, only point mutations were detected. The mean coverage obtained did not allow for the analysis of CNVs, that has been observed as an important USH cause. As has been pointed by Eisenberger et al.[63], high and extensive coverage allows for systematic analysis for CNVs and reduces the risk of mutations escaping detection because of their localization in regions with low coverage.

## **Conclusions**

Our developed targeted NGS method based on HaloPlex gene target enrichment technology for the genetic diagnosis of Usher syndrome provides nearly complete coverage of all coding regions of the ten USH genes and four related and candidate USH genes. Furthermore, the high coverage obtained in our study allowed us to detect large rearrangements. It is important to detect both point mutations and large deletions or duplications with a single technique to minimize the economic cost of these studies, increasing the detection ratio of the genetic cause of the disease and improving the genetic diagnosis of Usher syndrome patients.

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

## **Authors' contributions**

MJA performed the sequence capture, variant analysis and confirmation of point mutations by Sanger sequencing; EA contributed to the sequence capture, copy number variant analysis, MLPA and manuscript preparation; CFG contributed to variant analysis and confirmation of point mutations by Sanger sequencing; GGG performed a-CGH analysis; AFR contributed to a-CGH analysis and manuscript preparation, RR performed the functional *in silico* analysis of mutations; RPVM contributed to targeted next generation sequencing panel design and validation; FBK contributed to patients recruitment and DNA samples validation; CA contributed to patients recruitment and manuscript preparation; TJ designed the targeted next generation sequencing panel, supervised the experiments and redacted the manuscript JMM supervised the design and experiments and redacted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

We are grateful to FARPE and all the patients involved in this study.

This work was supported by grant PI13/00638 and PI13/00226 from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) from the Spanish Government. We are grateful to ONCE, Retina CV and FUNDALUCE. CIBERER (CB/06/07/1030) is an initiative of the Institute of Health Carlos III from the Spanish Government. The bioanalyzer ABI3500xl was purchased with the grant PROMIS (II12/00023) from the Instituto de Salud Carlos III. MJA is recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación (REF: AP2009-3344). RR and RPVM are Miguel Servet fellows (CP09/0118 and CP11/00090, respectively) from the Institute of Health Carlos III, which is partially supported by the European Regional Development Fund.

## References

1. Espinos C, Millan JM, Beneyto M, Najera C: **Epidemiology of Usher syndrome in Valencia and Spain.** *Community Genet* 1998, **1**:223–8.
2. Keats BJ, Corey DP: **The Usher syndromes.** *Am J Med Genet* 1999, **89**:158–66. Review.
3. Cohen M, Bitner-Glindzicz M, Luxon L: **The changing face of Usher syndrome: clinical implications.** *Int J Audiol* 2007, **46**:82–93.
4. Millán JM, Aller E, Jaijo T, Blanco-Kelly F, Gimenez-Pardo A, Ayuso C: **An update on the genetics of Usher syndrome.** *J Ophthalmol* 2011, **2011**:417217.
5. Chaïb H, Kaplan J, Gerber S, Vincent C, Ayadi H, Slim R, Munnich A, Weissenbach J, Petit C: **A newly identified locus for Usher syndrome type I, USH1E, maps to chromosome 21q21.** *Hum Mol Genet* 1997, **6**:27–31.
6. Ahmed ZM, Riazuddin S, Khan SN, Friedman PL, Riazuddin S, Friedman TB: **USH1H, a novel locus for type I Usher syndrome, maps to chromosome 15q22-23.** *Clin Genet* 2009, **75**:86–91.
7. Riazuddin S, Belyantseva IA, Giese AP, Lee K, Indzhykulian AA, Nandamuri SP, Yousaf R, Sinha GP, Lee S, Terrell D, Hegde RS, Ali RA, Anwar S, Andrade-Elizondo PB, Sirmaci A, Parise LV, Basit S, Wali A, Ayub M, Ansar M, Ahmad W, Khan SN, Akram J, Tekin M, Riazuddin S, Cook T, Buschbeck EK, Frolenkov GI, Leal SM, Friedman TB, *et*

*al: Alterations of the CIB2 calcium- and integrin-binding protein cause Usher syndrome type 1 J and nonsyndromic deafness DFNB48. Nat Genet* 2012, **44**:1265–71.

8. Ebermann I, Phillips JB, Liebau MC, Koenekoop RK, Schermer B, Lopez I, Schäfer E, Roux AF, Dafinger C, Bernd A, Zrenner E, Claustres M, Blanco B, Nürnberg G, Nürnberg P, Ruland R, Westerfield M, Benzing T, Bolz HJ: **PDZD7 is a modifier of retinal disease and a contributor to digenic Usher syndrome.** *J Clin Invest* 2010, **120**:1812–23.

9. Puffenberger EG, Jinks RN, Sougnez C, Cibulskis K, Willert RA, Achilly NP, Cassidy RP, Fiorentini CJ, Heiken KF, Lawrence JJ, Mahoney MH, Miller CJ, Nair DT, Politi KA, Worcester KN, Setton RA, Dipiazza R, Sherman EA, Eastman JT, Francklyn C, Robey-Bond S, Rider NL, Gabriel S, Morton DH, Strauss KA: **Genetic mapping and exome sequencing identify variants associated with five novel diseases.** *PLoS One* 2012, **7**:e28936.

10. Khateb S, Zelinger L, Mizrahi-Meissonnier L, Ayuso C, Koenekoop RK, Laxer U, Gross M, Banin E, Sharon D: **A homozygous nonsense CEP250 mutation combined with a heterozygous nonsense C2orf71 mutation is associated with atypical Usher syndrome.** *J Med Genet* 2014. Epub ahead of print.

11. Kremer H, van Wijk E, Märker T, Wolfrum U, Roepman R: **Usher syndrome:molecular links of pathogenesis, proteins and pathway.** *Hum Mol Genet* 2006, **15**: Spec No:R262-70.

12. Michalski N, Michel V, Bahloul A, Lefèvre G, Barral J, Yagi H, Chardenoux S, Weil D, Martin P, Hardelin JP, Sato M, Petit C: **Molecular characterization of the ankle-link complex in cochlear hair cells and its role in the hair bundle functioning.** *J Neurosci* 2007, **13**:6478–88.

13. Grati M, Shin JB, Weston MD, Green J, Bhat MA, Gillespie PG, Kachar B: **Localization of PDZD7 to the stereocilia ankle-link associates this scaffolding protein with the Usher syndrome protein network.** *J Neurosci* 2012, **32**:14288–14293.

14. Bahloul A, Simmler MC, Michel V, Leibovici M, Perfettini I, Roux I, Weil D, Nouaille S, Zuo J, Zadro C, Licastro D, Gasparini P, Avan P, Hardelin JP, Petit C: **VeZatin, an integral membrane protein of adherens junctions, is required for the sound resilience of cochlear hair cells.** *EMBO Mol Med* 2009, **1**:125–38.

15. Kazmierczak P, Sakaguchi H, Tokita J, Wilson-Kubalek EM, Milligan RA, Müller U, Kachar B: **Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells.** *Nature* 2007, **449**:87–91.
16. El-Amraoui A, Petit C: **Cadherins as targets for genetic diseases.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010, **2**(1):a003095.
17. Muller U: **Cadherins and mechanotransduction by hair cells.** *Curr Opin Cell Biol* 2008, **20**:557–566.
18. Sakaguchi H, Tokita J, Muller U, Kachar B: **Tip links in hair cells: molecular composition and role in hearing loss.** *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2009, **17**:388–393.
19. Wang A, Liang Y, Fridell RA, Probst FJ, Wilcox ER, Touchman JW, Morton CC, Morell RJ, Noben-Trauth K, Camper SA, Friedman TB: **Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3.** *Science* 1998, **29**:1447–51.
20. Belyantseva IA, Boger ET, Naz S, Frolenkov GI, Sellers JR, Ahmed ZM, Griffith AJ, Friedman TB: **Myosin-XVa is required for tip localization of whirlin and differential elongation of hair-cell stereocilia.** *Nat Cell Biol* 2005, **7**:148–156.
21. Delprat B, Michel V, Goodyear R, Yamasaki Y, Michalski N, El-Amraoui A, Perfettini I, Legrain P, Richardson G, Hardelin JP, Petit C: **Myosin XVa and whirlin, two deafness gene products required for hair bundle growth, are located at the stereocilia tips and interact directly.** *Hum Mol Genet* 2005, **1**:401–10.
22. Maerker T, van Wijk E, Overlack N, Kersten FF, McGee J, Goldmann T, Sehn E, Roepman R, Walsh EJ, Kremer H, Wolfrum U: **A novel Usher protein network at the periciliary reloading point between molecular transport machineries in vertebrate photoreceptor cells.** *Hum Mol Genet* 2008, **17**:71–86.
23. Sahly I, Dufour E, Schietroma C, Michel V, Bahloul A, Perfettini I, Pepermans E, Estivalet A, Carette D, Aghaie A, Ebermann I, Lelli A, Iribarne M, Hardelin JP, Weil D, Sahel JA, El-Amraoui A, Petit C: **Localization of Usher 1 proteins to the photoreceptor calyceal processes, which are absent from mice.** *J Cell Biol* 2012, **199**:381–99.
24. Cosgrove D, Zallocchi M: **Usher protein functions in hair cells and photoreceptors.** *Int J Biochem Cell Biol* 2014, **46**:80–9.

25. Bonnet C, Grati M, Marlin S, Levilliers J, Hardelin JP, Parodi M, Niasme-Grare M, Zelenika D, Délépine M, Feldmann D, Jonard L, El-Amraoui A, Weil D, Delobel B, Vincent C, Dollfus H, Eliot MM, David A, Calais C, Vigneron J, Montaut-Verient B, Bonneau D, Dubin J, Thauvin C, Duvillard A, Francannet C, Mom T, Lacombe D, Duriez F, Drouin-Garraud V, *et al*: **Complete exon sequencing of all known Usher syndrome genes greatly improves molecular diagnosis.** *Orphanet J Rare Dis* 2011, **6**:21.
26. Cremers FP, Kimberling WJ, Külm M, de Brouwer AP, van Wijk E, te Brinke H, Cremers CW, Hoefsloot LH, Banfi S, Simonelli F, Fleischhauer JC, Berger W, Kelley PM, Haralambous E, Bitner-Glindzicz M, Webster AR, Saihan Z, De Baere E, Leroy BP, Silvestri G, McKay GJ, Koenekoop RK, Millan JM, Rosenberg T, Joensuu T, Sankila EM, Weil D, Weston MD, Wissinger B, Kremer H: **Development of a genotyping microarray for Usher syndrome.** *J Med Genet* 2007, **44**:153–60.
27. Jaijo T, Aller E, García-García G, Aparisi MJ, Bernal S, Avila-Fernández A, Barragán I, Baiget M, Ayuso C, Antiñolo G, Díaz-Llopis M, Külm M, Beneyto M, Nájera C, Millán JM: **Microarray-based mutation analysis of 183 Spanish families with Usher syndrome.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010, **51**:1311–1317.
28. Vozzi D, Aaspöllu A, Athanasakis E, Berto A, Fabretto A, Licastro D, Külm M, Testa F, Trevisi P, Vahter M, Ziviello C, Martini A, Simonelli F, Banfi S, Gasparini P: **Molecular epidemiology of Usher syndrome in Italy.** *Mol Vis* 2011, **17**:1662–8.
29. Aller E, Jaijo T, García-García G, Aparisi MJ, Blesa D, Díaz-Llopis M, Ayuso C, Millán JM: **Identification of large rearrangements of the PCDH15 gene by combined MLPA and a CGH: large duplications are responsible for Usher syndrome.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010, **51**:5480–5485.
30. Roux AF, Faugère V, Vaché C, Baux D, Besnard T, Léonard S, Blanchet C, Hamel C, Mondain M, Gilbert-Dussardier B, Edery P, Lacombe D, Bonneau D, Holder-Espinasse M, Ambrosetti U, Journal H, David A, Lina-Granade G, Malcolm S, Claustres M: **Four-year follow up of diagnostic service in USH1 patients.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011, **52**:4063–4071.
31. Steele-Stallard HB, Le Quesne SP, Lenassi E, Luxon LM, Claustres M, Roux AF, Webster AR, Bitner-Glindzicz M: **Screening for duplications, deletions and a common intronic mutation detects 35% of second mutations in patients with USH2A monoallelic mutations on Sanger sequencing.** *Orphanet J Rare Dis* 2013, **8**:122.



32. Choi BY, Park G, Gim J, Kim AR, Kim BJ, Kim HS, Park JH, Park T, Oh SH, Han KH, Park WY: **Diagnostic application of targeted resequencing for familial nonsyndromic hearing loss.** *PLoS One* 2013, **22**:e68692.
33. Mutai H, Suzuki N, Shimizu A, Torii C, Namba K, Morimoto N, Kudoh J, Kaga K, Kosaki K, Matsunaga T: **Diverse spectrum of rare deafness genes underlies early-childhood hearing loss in Japanese patients: a cross-sectional, multi-center next-generation sequencing study.** *Orphanet J Rare Dis* 2013, **8**:172.
34. Fu Q, Wang F, Wang H, Xu F, Zaneveld JE, Ren H, Keser V, Lopez I, Tuan HF, Salvo JS, Wang X, Zhao L, Wang K, Li Y, Koenekoop RK, Chen R, Sui R: **Next-generation sequencing-based molecular diagnosis of a Chinese patient cohort with autosomal recessive retinitis pigmentosa.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013, **54**:4158–66.
35. Glöckle N, Kohl S, Mohr J, Scheurenbrand T, Sprecher A, Weisschuh N, Bernd A, Rudolph G, Schubach M, Poloschek C, Zrenner E, Biskup S, Berger W, Wissinger B, Neidhardt J: **Panel-based next generation sequencing as a reliable and efficient technique to detect mutations in unselected patients with retinal dystrophies.** *Eur J Hum Genet* 2014, **22**:99–104.
36. Licastro D, Mutarelli M, Peluso I, Neveling K, Wieskamp N, Rispoli R, Vozzi D, Athanasakis E, D'Eustacchio A, Pizzo M, D'Amico F, Ziviello C, Simonelli F, Fabretto A, Scheffer H, Gasparini P, Banfi S, Nigro V: **Molecular diagnosis of Usher syndrome: application of two different next generation sequencing-based procedures.** *PLoS One* 2012, **7**:e43799.
37. Besnard T, García-García G, Baux D, Vaché C, Faugère V, Larrieu L, Léonard S, Millan JM, Malcolm S, Claustres M, Roux AF: **Experience of targeted Usher exome sequencing as a clinical test.** *Mol Genet Genomic Med* 2014, **2**:30–43.
38. Yoshimura H, Iwasaki S, Nishio SY, Kumakawa K, Tono T, Kobayashi Y, Sato H, Nagai K, Ishikawa K, Ikezono T, Naito Y, Fukushima K, Oshikawa C, Kimitsuki T, Nakanishi H, Usami S: **Massively parallel DNA sequencing facilitates diagnosis of patients with Usher syndrome type 1.** *PLoS One* 2014, **9**:e90688.
39. Rong W, Chen X, Zhao K, Liu Y, Liu X, Ha S, Liu W, Kang X, Sheng X, Zhao C: **Novel and recurrent MYO7A mutations in Usher syndrome type 1 and type 2.** *PLoS One* 2014, **9**(5):e97808. doi:10.1371/journal.pone.0097808. eCollection 2014.

40. von Brederlow B, Bolz H, Janecke A, La O, Cabrera A, Rudolph G, Lorenz B, Schwinger E, Gal A: **Identification and in vitro expression of novel CDH23 mutations of patients with Usher syndrome type 1D.** *Hum Mutat* 2002, **19**:268–73.
41. Garcia-Garcia G, Aparisi MJ, Jaijo T, Rodrigo R, Leon AM, Avila-Fernandez A, Blanco-Kelly F, Bernal S, Navarro R, Diaz-Llopis M, Baiget M, Ayuso C, Millan JM, Aller E: **Mutational screening of the USH2A gene in Spanish USH patients reveals 23 novel pathogenic mutations.** *Orphanet J Rare Dis* 2011, **6**:65.
42. Schultz JM, Bhatti R, Madeo AC, Turriff A, Muskett JA, Zalewski CK, King KA, Ahmed ZM, Riazuddin S, Ahmad N, Hussain Z, Qasim M, Kahn SN, Meltzer MR, Liu XZ, Munisamy M, Ghosh M, Rehm HL, Tsilou ET, Griffith AJ, Zein WM, Brewer CC, Riazuddin S, Friedman TB: **Allelic hierarchy of CDH23 mutations causing non-syndromic deafness DFNB12 or Usher syndrome USH1D in compound heterozygotes.** *J Med Genet* 2011, **48**:767–75.
43. Roux AF, Faugère V, Le Guédard S, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Chambert S, Marlin S, Hamel C, Gilbert B, Malcolm S, Claustres M, French Usher Syndrome Collaboration: **Survey of the frequency of USH1 gene mutations in a cohort of Usher patients shows the importance of cadherin 23 and protocadherin 15 genes and establishes a detection rate of above 90%.** *J Med Genet* 2006, **43**:763–8.
44. Ahmed ZM, Riazuddin S, Bernstein SL, Ahmed Z, Khan S, Griffith AJ, Morell RJ, Friedman TB, Riazuddin S, Wilcox ER: **Mutations of the protocadherin gene PCDH15 cause Usher syndrome type 1 F.** *Am J Hum Genet* 2001, **69**(1):25–34.
45. Jaijo T, Oshima A, Aller E, Carney C, Usami S, Millán JM, Kimberling WJ: **Mutation screening of the PCDH15 gene in Spanish patients with Usher syndrome type I.** *Mol Vis* 2012, **18**:1719–26.
46. Riazuddin S, Nazli S, Ahmed ZM, Yang Y, Zulfiqar F, Shaikh RS, Zafar AU, Khan SN, Sabar F, Javid FT, Wilcox ER, Tsilou E, Boger ET, Sellers JR, Belyantseva IA, Riazuddin S, Friedman TB: **Mutation spectrum of MYO7A and evaluation of a novel nonsyndromic deafness DFNB2 allele with residual function.** *Hum Mutat* 2008, **29**:502–11.
47. Liu XZ, Hope C, Liang CY, Zou JM, Xu LR, Cole T, Mueller RF, Bunday S, Nance W, Steel KP, Brown SD: **A mutation (2314delG) in the Usher syndrome type IIA gene: high prevalence and phenotypic variation.** *Am J Hum Genet* 1999, **64**(4):1221–5.

48. Bharadwaj AK, Kasztejna JP, Huq S, Berson EL, Dryja TP: **Evaluation of the myosin VIIA gene and visual function in patients with Usher syndrome type I.** *Exp Eye Res* 2000, **71**:173–81.
49. Aller E, Jaijo T, Beneyto M, Nájera C, Oltra S, Ayuso C, Baiget M, Carballo M, Antiñolo G, Valverde D, Moreno F, Vilela C, Collado D, Pérez-Garrigues H, Navea A, Millán JM: **Identification of 14 novel mutations in the long isoform of USH2A in Spanish patients with Usher syndrome type II.** *J Med Genet* 2006, **43**:e55.
50. Le Quesne SP, Saihan Z, Rangesh N, Steele-Stallard HB, Ambrose J, Coffey A, Emmerson J, Haralambous E, Hughes Y, Steel KP, Luxon LM, Webster AR, Bitner-Glindzicz M: **Comprehensive sequence analysis of nine Usher syndrome genes in the UK National Collaborative Usher Study.** *J Med Genet* 2012, **49**(1):27–36.
51. Ouyang XM, Yan D, Du LL, Hejtmancik JF, Jacobson SG, Nance WE, Li AR, Angeli S, Kaiser M, Newton V, Brown SD, Balkany T, Liu XZ: **Characterization of Usher syndrome type I gene mutations in an Usher syndrome patient population.** *Hum Genet* 2005, **116**(4):292–9.
52. Besnard T, Vaché C, Baux D, Larrieu L, Abadie C, Blanchet C, Odent S, Blanchet P, Calvas P, Hamel C, Dollfus H, Lina-Granade G, Lespinasse J, David A, Isidor B, Morin G, Malcolm S, Tuffery-Giraud S, Claustres M, Roux AF: **Non-USH2A mutations in USH2 patients.** *Hum Mutat* 2012, **33**:504–510.
53. Oshima A, Jaijo T, Aller E, Millan JM, Carney C, Usami S, Moller C, Kimberling WJ: **Mutation profile of the CDH23 gene in 56 probands with Usher syndrome type I.** *Hum Mutat* 2008, **29**(6):E37–46.
54. Janecke AR, Meins M, Sadeghi M, Grundmann K, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Rosenberg T, Gal A: **Twelve novel myosin VIIA mutations in 34 patients with Usher syndrome type I: confirmation of genetic heterogeneity.** *Hum Mutat* 1999, **13**:133–40.
55. Bernal S, Medà C, Solans T, Ayuso C, Garcia-Sandoval B, Valverde D, Del Rio E, Baiget M: **Clinical and genetic studies in Spanish patients with Usher syndrome type II: description of new mutations and evidence for a lack of genotype—phenotype correlation.** *Clin Genet* 2005, **68**:204–14.
56. Jacobson SG, Aleman TS, Sumaroka A, Cideciyan AV, Roman AJ, Windsor EA, Schwartz SB, Rehm HL, Kimberling WJ: **Disease boundaries in the retina of patients**

**with Usher syndrome caused by MYO7A gene mutations.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009, **50**:1886–94.

57. Kaiserman N, Obolensky A, Banin E, Sharon D: **Novel USH2A mutations in Israeli patients with retinitis pigmentosa and Usher syndrome type 2.** *Arch Ophthalmol* 2007, **125**:219–24.

58. Vaché C, Besnard T, le Berre P, García-García G, Baux D, Larrieu L, Abadie C, Blanchet C, Bolz HJ, Millan J, Hamel C, Malcolm S, Claustres M, Roux AF: **Usher syndrome type 2 caused by activation of an USH2A pseudoexon: implications for diagnosis and therapy.** *Hum Mutat* 2012, **33**:104–8.

59. Ouyang XM, Xia XJ, Verpy E, Du LL, Pandya A, Petit C, Balkany T, Nance WE, Liu XZ: **Mutations in the alternatively spliced exons of USH1C cause non syndromic recessive deafness.** *Hum Genet* 2002, **111**(1):26–30.

60. Jaijo T, Aller E, Beneyto M, Najera C, Graziano C, Turchetti D, Seri M, Ayuso C, Baiget M, Moreno F, Morera C, Perez-Garrigues H, Millan JM: **MYO7A mutation screening in Usher syndrome type I patients from diverse origins.** *J Med Genet* 2007, **44**(3):e71.

61. Ross M, Russ C, Costello M, Hollinger A, Lennon NJ, Hegarty R, Nusbaum C, Jaffe DB: **Characterizing and measuring bias in sequence data.** *Genome Biol* 2013, **14**:R51.

62. Le Guédard S, Faugère V, Malcolm S, Claustres M, Roux AF: **Large genomic rearrangements within the PCDH15 gene are a significant cause of USH1F syndrome.** *Mol Vis* 2007, **13**:102–7.

63. Eisenberger T, Neuhaus C, Khan AO, Decker C, Preising MN, Friedburg C, Bieg A, Gliem M, Charbel Issa P, Holz FG, Baig SM, Hellenbroich Y, Galvez A, Platzer K, Wollnik B, Laddach N, Ghaffari SR, Rafati M, Botzenhart E, Tinschert S, Börger D, Bohring A, Schreml J, Körtge-Jung S, Schell-Apacik C, Bakur K, Al-Aama JY, Neuhann T, Herkenrath P, Nürnberg G, *et al*: **Increasing the yield in targeted next-generation sequencing by implicating CNV analysis, non-coding exons and the overall variant load: the example of retinal dystrophies.** *PLoS One* 2013, **8**:e78496.

## **VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 1. Estudio molecular del gen *USH1C*

El apartado III describe el estudio del gen *USH1C* realizado en nuestra cohorte, en el que se analizaron 33 pacientes diagnosticados de USH mediante secuenciación directa de los 28 exones que comprenden dicho gen junto con sus regiones intrónicas adyacentes.

De las 33 familias analizadas, 23 habían sido diagnosticadas de USH1 (21 de origen español, una de origen italiano y una de origen turco) y 10 no habían podido ser clasificadas debido a la ausencia de suficientes datos clínicos, siendo 9 de éstas de origen español y una de origen turco.

Se decidió incluir en el estudio mutacional del gen *USH1C* a esta última familia de origen turco (FRP-284) compuesta por 3 hermanos afectados de USH, ya que estudios previos de ligamiento permitieron excluir todos los loci USH a excepción de *USH1B* y *USH1C*. *USH1B* fue descartado también como responsable de la enfermedad tras el estudio del gen *MYO7A*. Posteriormente, esta familia fue descrita como USH2 asociado a una variante de Dandy Walker (malformación congénita poco frecuente del cerebelo y del cuarto ventrículo, que se caracteriza por hipoplasia del vermis cerebeloso y dilatación quística del cuarto ventrículo sin engrosamiento de la fosa posterior), presentándose en dos de los tres hermanos diagnosticados de USH2 (Simsek *et al.*, 2010).

### 1.1 Clasificación de las variantes

El *screening* mutacional del gen *USH1C* permitió la identificación de 2 mutaciones claramente patológicas, p.C224X y p.D124TfsX7, ambas en homocigosis. La primera fue identificada en una familia diagnosticada de USH1 española y la segunda en una familia USH1 de origen italiano. Ambas familias presentaban una posible consanguinidad, aunque ésta no pudo ser confirmada.

Un total de 47 variantes adicionales fueron identificadas, de ellas 25 ya habían sido descritas como polimorfismos, en base a su elevada frecuencia, localización o naturaleza. De los 22 cambios nuevos, se identificaron: 2 cambios *missense* (p.S190L y p.G379D) y 20 cambios intrónicos, los cuales, excepto uno (c.1086-12G>A), fueron considerados neutrales, debido a su elevada frecuencia dentro de la cohorte de estudio, localización fuera de las regiones canónicas de *splicing* y tras los resultados obtenidos del análisis bioinformático.

Las dos variantes *missense* nuevas (p.S190L y p.G379D) fueron analizadas *in silico* mediante distintos programas, obteniendo resultados contradictorios. Sin embargo, el cambio p.S190L, fue hallado en heterocigosis en el paciente de origen español homocigoto

para la mutación p.C224X. Por tanto, aunque no podemos descartar que p.S190L pueda tener alguna implicación patológica, la mutación p.C224X en homocigosis es suficiente como para producir la enfermedad. El otro cambio, p.G379D, fue detectado en heterocigosis en el paciente de estudio de la familia turca FRP-284 junto a un cambio intrónico en homocigosis, c.1086-12G>A. Los estudios computacionales de este cambio intrónico fueron discordantes, no prediciendo un efecto patológico claro. Además, pudimos comprobar que esta variante ya había sido descrita como rs11024318 en la dbSNP del NCBI encontrándose con una frecuencia de G (98,3%) y A (1,7%) en población europea, y en homocigosis en un 8,7% en población afro-americana. Por lo que parece indicar, que no es la responsable de la enfermedad. Sin embargo, no podemos descartar el posible carácter patológico de la variante *missense* p.G379D.

Los resultados obtenidos en el presente estudio han permitido la identificación de un elevado número de variantes, la mayoría de las cuales han sido descartadas como responsables de la enfermedad en las familias. Aun así, no se puede desestimar que alguno de los nuevos cambios identificados en este estudio, supuestamente no patológicos, sean modificadores del fenotipo, pudiendo provocar alteraciones en la sintomatología de los pacientes (Badano *et al.*, 2006; Khanna *et al.*, 2009).

En este trabajo, se pudo determinar la causa de la enfermedad en 2 familias USH1 (6,06% de nuestra cohorte). Sin embargo, en el resto de casos no identificamos las mutaciones responsables de la enfermedad. Éstas podrían hallarse en regiones no estudiadas del gen, como regiones promotoras, regiones 5' ó 3' no traducidas o regiones intrónicas profundas, dando origen a la inclusión de pseudoexones (Vaché *et al.*, 2012). Otra posibilidad sería la posible existencia de grandes reordenamientos, deleciones o duplicaciones, no detectadas por las técnicas tradicionales de PCR, como se ha visto en otros genes USH (Le Guédard *et al.*, 2007; Aller *et al.*, 2010; Roux *et al.*, 2011; García-García *et al.*, 2014). Concretamente, en el gen *USH1C*, se ha descrito la mutación c.105\_2700del, la cual provoca una deleción que abarca desde el exón 2 al 27 (Bitner-Glindzicz *et al.*, 2000). Sin embargo, puede que la causa de la enfermedad se encuentre en otros genes responsables del USH, tanto genes USH1 como en genes USH relacionados con otro tipo clínico (Liu *et al.*, 1998; Jaijo *et al.*, 2010; Bonnet *et al.*, 2011; García-García *et al.*, 2011) u otros genes responsables no identificados hasta el momento.

### 1.2 Implicación del gen *USH1C* en población española

Hasta la fecha, no se había llevado a cabo el estudio del gen *USH1C* en población española. Como resultado se detectaron sólo 2 mutaciones patológicas, de ellas sólo una en una familia USH1 de origen español.



Estos hallazgos suponen que la implicación del gen *USH1C* en nuestra cohorte de pacientes diagnosticados de USH1 de origen español es del 4,8% (1/21). Si partimos de la serie inicial de 65 pacientes USH1 de origen español que desde 2005 hasta la fecha han sido estudiados para los genes USH1, a excepción de *CIB2* (Jaijo *et al.*, 2006; Jaijo *et al.*, 2007; Aller *et al.*, 2007; Oshima *et al.*, 2008; Aller *et al.*, 2010; Jaijo *et al.*, 2010) la frecuencia de mutaciones en *USH1C* es de 1,5%, indicándonos la baja prevalencia de este gen en nuestra población. Otros estudios realizados en *USH1C* en poblaciones estadounidense-inglesa y en población francesa, revelaron porcentajes de mutación entre el 6-7%, considerando este gen como un subtipo poco frecuente del USH1 (Ouyang *et al.*, 2005; Roux *et al.*, 2006).

### 1.3 Espectro mutacional del gen *USH1C*

Hasta el momento, se han descrito un total de 33 mutaciones distintas de carácter patológico o UV3-UV4 ([https://grenada.lumc.nl/LOVD2/Usher\\_montpellier/variants.php](https://grenada.lumc.nl/LOVD2/Usher_montpellier/variants.php)) en *USH1C*. La mayoría de éstas, se encuentran distribuidas a lo largo de los 13 primeros exones del gen, comunes a todas las isoformas, habiéndose identificado, hasta el momento, sólo 8 mutaciones patológicas en los 8 exones alternativos, pudiendo ser responsables de una sintomatología atípica de USH1 (Saihan *et al.*, 2011; Khateb *et al.*, 2012; Krawitz *et al.*, 2014).

Ninguna de las 2 mutaciones halladas en nuestra serie (p.C224X y p.D124TfsX7) había sido descrita con anterioridad. De hecho, la mayoría de las mutaciones descritas en el gen *USH1C* responsables de USH1 o de hipoacusia no sindrómica (DFNB18) son propias de cada familia y tan sólo 3 se presentan en frecuencias relativamente altas. Una de ellas, c.216G>A, es altamente frecuente en población acadiana y población de Québec de descendencia francesa. Esta mutación llega a tener una frecuencia alélica del 40% y está presente en un 60% de los pacientes USH1 acadianos debido a un efecto fundador ocurrido durante la colonización de Québec (Ebermann *et al.*, 2007b). La segunda mutación frecuente es la inserción c.238dup, la cual se ha identificado en diferentes poblaciones como Reino Unido, Francia, Alemania, Canadá, Pakistán, Estados Unidos, Grecia y Guinea (Bitner-Glindzicz *et al.*, 2000; Verpy *et al.*, 2000; Zwaeneopel *et al.*, 2001; Ebermann *et al.*, 2007b). En este caso, el estudio mediante haplotipos indicó que, al contrario que la mutación “acadiana”, c.238dup no presentaba un haplotipo común, siendo, hasta ahora, la única mutación recurrente en *USH1C*. Recientemente, Khateb *et al.* (2012) identificaron una tercera mutación, c.1220delG (p.G407EfsX56) en el exón alternativo 15, con un efecto fundador en la población de judíos Yemenitas. Este cambio fue identificado en el 23% de la cohorte estudiada. Al revisar la clínica de estos pacientes portadores de esta nueva mutación, observaron que presentaban una RP típica con formación de espículas a edades

tempanas. Sin embargo, no mostraban signos de hipoacusia hasta edades superiores a los 40 años, siendo ésta de moderada a severa con audiogramas descendientes. Asimismo, tampoco manifestaban problemas vestibulares. Una posible explicación podría ser debida a la localización de esta mutación, pues el exón 15 tan sólo está presente en los transcritos menos frecuentes del gen (variante b3 y variante PDZ-45 (Reiners *et al.*, 2005)). Una expresión relativamente alta del resto de isoformas en la cóclea, podría compensar la función de la harmonina, dando lugar a una manifestación más tardía y leve de la hipoacusia en relación a la RP.

Sin embargo, este no ha sido el único caso en que pacientes con mutaciones en el gen *USHIC* manifiestan una RP asociada a una hipoacusia más leve o tardía, sugiriéndose una correlación entre fenotipos atípicos y mutaciones en los exones alternativos del *USHIC*. Saihan *et al.* (2011) publicaron un trabajo donde identificaban 2 pacientes con 2 mutaciones en el gen *USHIC* en heterocigosis: la primera variante en el exón constitutivo 4, p.R103H, y la segunda variante en el exón alternativo 21, c.2227-1G>A. Ambos pacientes, hermanos, mostraban una RP sectorial pero, uno de ellos presentaba una hipoacusia moderada y una ligera disfunción vestibular, y el otro hermano manifestaba una hipoacusia severa pero, una función vestibular normal. Ambos habían sido capaces de desarrollar el habla. Recientemente, Krawitz *et al.* (2014) identificaron en un paciente que presentaba una clínica atípica de USH1, hipoacusia moderada a partir de los 40 años, inicio de la RP a partir de los 28 años y sin alteración vestibular, una mutación patológica en heterocigosis en el gen *USHIC* en el exón alternativo 27, c.2611G>A (p.A871T).

Hasta la fecha, las mutaciones identificadas en el gen *USHIC* sólo habían sido descritas en pacientes USH1 o en pacientes con hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva, DFNB18. Sin embargo, la correlación genotipo-fenotipo de las nuevas mutaciones identificadas está revelando nuevos fenotipos clínicos asociados a este gen. Por tanto, *USHIC* debería considerarse como candidato en pacientes USH1, en pacientes con hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva, en pacientes con RP (<40 años) y función auditiva normal, y en pacientes con RP y pérdida auditiva leve o de inicio tardío. Los estudios aportados por Saihan *et al.* (2011), Khateb *et al.* (2012) y Krawitz *et al.* (2014) dan, por tanto, importancia a la búsqueda de mutaciones en genes como *USHIC*, cuya sintomatología clínica puede variar de la típica clínica del USH1, sobre todo, en aquellos pacientes clasificados como USH atípicos.

Estos hallazgos realzan la importancia que tienen los estudios clínicos, tanto a la hora de diagnosticar a los pacientes como a la hora de determinar la dirección que deben tomar los rastreos mutacionales en los genes causantes de la enfermedad, permitiendo realizar las correlaciones genotipo-fenotipo.

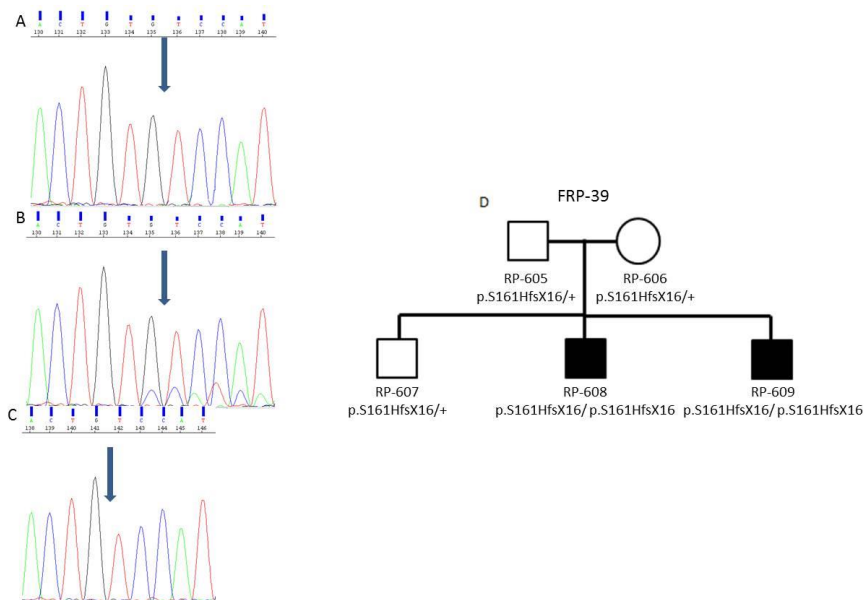
Con respecto a nuestro estudio, aunque los pacientes donde identificamos las dos mutaciones patológicas en el gen *USH1C* (p.C224X y p.D124TfsX7), habían sido previamente diagnosticados de USH1 y existe una correlación genotipo-fenotipo, cabe mencionar que muchos de los pacientes de nuestra cohorte original no han podido ser clasificados clínicamente, debido a la falta de suficientes datos clínicos, y la búsqueda de mutaciones en ellos ha comenzado desde los genes más prevalentes a los menos, ralentizando la identificación de las mutaciones causantes. Con una clínica detallada se hubiera podido establecer el tipo clínico al que pertenecen y obtener una mayor rapidez y eficacia en el diagnóstico molecular.

#### 1.4 Estudios adicionales en el gen *USH1C*

Posteriormente a la realización del rastreo mutacional del gen *USH1C* y a la publicación de los resultados de este *screening*, se llevó a cabo el análisis de todos los exones de este gen en otra familia USH1 de origen español (FRP-39) a la que, previamente, se le había realizado la búsqueda de mutaciones en el resto de genes USH1, a excepción de *USH1C* y *CIB2*.

El *screening* mutacional del gen *USH1C* en esta familia permitió identificar la causa de la enfermedad en los 2 hermanos afectados (RP-608 y RP-609). Ambos presentaban en el exón 5 una mutación *frameshift* (c.480\_481delGT, p.S161HfsX16) en homocigosis, no descrita. Al realizar el análisis de segregación familiar, se comprobó que la mutación segregaba con la enfermedad (Figura 28).

Por tanto, si tenemos en cuenta esta familia junto con los resultados del estudio previo del gen *USH1C*, se ha podido determinar la causa de la enfermedad en 2 familias USH1 de origen español, por lo que la prevalencia del gen en nuestra cohorte de 22 familias USH1 españolas sería del 9,1%. Sin embargo, si consideramos la serie inicial de 65 familias USH1, la implicación del gen *USH1C* en población española es del 3,08%, considerándose un subtipo genético poco frecuente del USH1 en nuestra población.



**Figura 28.** Análisis de segregación familiar de la mutación c.480\_481delGT (p.S161HfsX16) identificada en la familia FRP-39. A) Electroferograma correspondiente a la secuencia salvaje. B) Electroferograma correspondiente a los progenitores y hermano sano, portadores del cambio en heterocigosis. C) Electroferograma correspondiente a la secuencia mutante en homocigosis de los hermanos afectados. D) Árbol familiar de segregación de la mutación p.S161HfsX16.

### 1.5 Terapias para el gen *USH1C*

El diagnóstico molecular es crucial a la hora de poder establecer un posible tratamiento para la enfermedad, ya que en muchas ocasiones las terapias son aplicables o no dependiendo del gen causante de la enfermedad e incluso de la naturaleza de la mutación responsable de la enfermedad.

Goldmann *et al.* (2012) aplicaron una nueva estrategia de terapia dirigida a mutaciones de codón de parada prematuro mediante la administración de determinadas drogas, TRIDs. La utilización del aminoglucósido NB54 y el compuesto químico PTC124, a la mutación p.R31X del gen *USH1C*, permitió restablecer la función de la harmonina en un 80%, tanto en cultivos celulares como en cultivos de retina *ex vivo* de ratones y humanos, así como en cultivos *in vivo* de ratones. Estos compuestos eran capaces de evitar el reconocimiento del codón de parada prematuro al actuar desde las subunidades ribosomales e incorporar un nuevo aminoácido en el proceso de síntesis proteica.

Otra terapia aplicada al gen *USH1C* se ha basado en el mecanismo de recombinación homóloga, usando nucleasas *zinc finger* (ZFN) contra la misma mutación (p.R31X). Mediante esta terapia se pudo observar, la recuperación de la expresión proteica de la harmonina en células procedentes de ratones modelo para el *USH1C*. Las principales ventajas que presenta este tipo de estrategia son que el gen reparado permanece bajo el control de su promotor endógeno, sin que se vea afectado el *splicing* ni la expresión proteica; que no es necesaria una medicación constante; y que ni el tamaño del gen ni el tipo de mutación afectan a la aplicación de esta terapia (Overlack *et al.*, 2012).

Recientemente, Lentz *et al.* (2013) utilizaron la estrategia de los AON en un modelo de ratón portador de la mutación de *splicing* c.216G>A, consiguiendo rescatar la hipoacusia y la disfunción vestibular. Estos AON bloquean la región crítica de *splicing* donde se localiza la mutación c.216A, promoviendo el correcto procesamiento del ARNm. Sin embargo, es necesaria la administración de estas moléculas en estadios tempranos, para el correcto desarrollo de los estereocilios y la recuperación del fenotipo salvaje.

## 2. Análisis de expresión de variantes USH1

El apartado IV describe el análisis de expresión de variantes USH1 identificadas en nuestra cohorte, con el objetivo de verificar si afectan al procesamiento del ARNm.

Los rastreos mutacionales en los genes responsables del USH1 han permitido la identificación de un gran número de cambios, cuya naturaleza patológica, en muchos casos, es incierta (cambios *missense*, silenciosos o intrónicos), haciéndose necesarios los estudios de expresión, con el objetivo de discriminar entre variantes neutras o aquellas que provocan un procesamiento anómalo del ARNm. Además, aunque el carácter patogénico de mutaciones que generan codones de parada prematuros no es cuestionado, mediante este tipo de estudios se ha observado que mutaciones *nonsense* o *frameshift* pueden estar afectando al *splicing* (Wagner *et al.*, 2004).

Los estudios de expresión realizados en este trabajo se basaron en la utilización de predicciones obtenidas con programas bioinformáticos y su posterior corroboración mediante ensayos con minigenes y análisis de ARN extraído a partir de células epiteliales nasales del propio paciente.

### 2.1 Selección de variantes

Mediante un análisis *in silico*, a través de 4 programas bioinformáticos diferentes (*HSF*, *NetGene2*, *SpliceView* y *NNSplice*), se seleccionaron 18 cambios como presuntamente implicados en un defecto en el *splicing*: 9 variantes del gen *MYO7A* (6 *missense*, 2 *frameshift* y un codón de parada prematuro), 3 del gen *CDH23* (2 cambios intrónicos y un cambio *missense*), 5 del gen *PCDH15* (2 variantes intrónicas, un cambio *frameshift*, un cambio *missense* y un codón de parada prematuro) y un cambio intrónico en el gen *USH1C*. Esta selección se basó en el número de programas que apuntaban la existencia de alguna alteración en el procesamiento del ARNm, obteniendo *scores* de 1 a 4. Se seleccionaron los 18 cambios en los que al menos 1 programa bioinformático predecía una alteración en el mecanismo de *splicing* (Tabla 5).

**Tabla 5.** Selección de variantes presuntamente implicadas en un *splicing* anómalo, en base a los resultados obtenidos con los 4 programas bioinformáticos: *SpliceView*, *NNSplice*, *NetGene2* y *HSF*.

<i>Score</i>			
4	3	2	1
c.470G>A (p.S157N) <i>MYO7A</i>	c.6_9dup (p.L4DfsX39) <i>MYO7A</i>	c.521A>G (p.N174S) <i>PCDH15</i>	c.640G>A (p.G214R) <i>MYO7A</i>
c.721C>G (p.R241G) <i>MYO7A</i>	c.1097T>C (p.L366P) <i>MYO7A</i>	c.1737C>G (p.Y579X) <i>PCDH15</i>	c.3508G>A (p.E1170K) <i>MYO7A</i>
c.1342_1343delAG (p.S448LfsX2) <i>MYO7A</i>	c.6049G>A (p.G2017S) <i>CDH23</i>		c.5581C>T (p.R1861X) <i>MYO7A</i>
c.3652G>A (p.G1218R) <i>MYO7A</i>	c.8722+1delG <i>CDH23</i>		
c.1086-12G>A <i>USH1C</i>	c.1304_1305insC (p.T436YfsX12) <i>PCDH15</i>		
c.2289+1G>A <i>CDH23</i>			
c.2868+5G>A <i>PCDH15</i>			
c.3717+2dupT <i>PCDH15</i>			

## 2.2 Análisis mediante minigenes

Los ensayos con minigenes permitieron comprobar si la predicción obtenida con los programas bioinformáticos era correcta o no. Sólo 7 de las 18 variantes estudiadas producían un procesamiento erróneo del ARNm. Tres cambios en el gen *MYO7A* (c.470G>A, c.1342\_1343delAG y c.3652G>A), 3 cambios en *CDH23* (c.2289+1G>A, c.6049G>A y c.8722+1delG) y un cambio en *PCDH15* (c.3717+2dupT) (Tabla 6).

Estos resultados revelaron que aquellas variantes que habían obtenido con los programas bioinformáticos un *score* < 3 no estaban afectando al procesamiento del mensajero. Sin embargo, también se detectaron falsos positivos. No todas las variantes con *score* ≥ 3 habían producido un transcrito anómalo, determinando la necesidad de realizar estudios de expresión tras un análisis bioinformático. Esto concuerda con los estudios realizados por Houdayer *et al.* (2008) y Vreeswijk *et al.* (2009), en los que ninguna herramienta bioinformática puede ser 100% fiable en la predicción de posibles efectos sobre el ARNm, siendo necesaria una combinación de diferentes programas basados en

diferentes matrices, sitios cercanos de *splicing*, activación de sitios críticos de empalme, predicción de sitios de empalme de *novo*, etc. De hecho, las consecuencias de una variante a nivel del transcrito, dependen de una combinación de elementos reguladores del pre-ARNm, incluyendo secuencias consenso de *splicing* propias, así como un conjunto de elementos reguladores auxiliares, que reprimen o promueven el empalme de las secuencias (Le Guédard-Méreuze *et al.*, 2010).

Las mutaciones *frameshift* o *nonsense* son claramente patológicas. Sin embargo, pueden producir defectos en el *splicing*, por lo que deberían ser analizadas *in silico*, y en aquellos casos, en los que se obtengan predicciones positivas sobre un procesamiento anómalo del transcrito, éstas deberían ser estudiadas (Le Guédard-Méreuze *et al.*, 2010; Vaché *et al.*, 2010). En este estudio, se seleccionaron 2 mutaciones de codón de parada prematuro y 3 mutaciones *frameshift*. Sólo en una de las mutaciones *frameshift*, c.1342\_1343delAG (p.S448LfsX2, *MYO7A*), se observó un transcrito anómalo del gen (Tabla 6).

**Tabla 6.** Resultado del análisis con minigenes de las variantes USH1 implicadas en el procesamiento erróneo del ARNm.

Variante	Efecto a nivel ARN según minigenes	Efecto a nivel proteína según minigenes
c.470G>A (p.S157N) <i>MYO7A</i>	<i>Exon skipping</i>	p.T96WfsX29
c.6049G>A (p.G2017S) <i>CDH23</i>		p.T1976_G2017del
c.1342_1343delAG (p.S448LfsX2) <i>MYO7A</i>	Delección parcial del exón implicado	p.N443_E450del
c.3652G>A (p.G1218R) <i>MYO7A</i>		p.Y1211AfsX18
c.8722+1delG <i>CDH23</i>		p.S2909AfsX43
c.2289+1G>A <i>CDH23</i>	Inserción de parte del intrón adyacente al exón implicado + <i>exon skipping</i>	p.N765SfsX35 + p.E727KfsX9
c.3717+2dupT <i>PCDH15</i>		p.V1242RfsX2 + p.A1168_L1239del



### 2.3 Análisis del ARN de células epiteliales nasales

Los genes USH se expresan, principalmente, en las células ciliadas del oído interno y en los fotorreceptores de la retina. Los estudios de expresión revelaron la presencia de algunos transcritos USH en sangre como whirlina (Ebermann *et al.*, 2007a), miosina VIIa (Boulouiz *et al.*, 2007; Qu *et al.*, 2014) y cadherina 23 (Becirovic *et al.*, 2008) pero, la ausencia de otros, siendo el análisis de expresión de transcritos en linfocitos no factible para todos los genes USH. Sin embargo, Cohn *et al.* (2006) observaron la presencia de proteínas USH en el epitelio ciliar de la nariz, mediante inmunohistoquímica. Posteriormente, Vaché *et al.* (2010) demostraron la presencia en células epiteliales nasales de todos los transcritos USH1 y USH2 con todas sus isoformas, a excepción de la isoforma *b* del gen *USH1C*, y el transcrito correspondiente al gen *CLRNI*. Este hallazgo abrió las puertas a la realización de nuevos estudios de expresión de variantes en dicho tejido.

Con el objetivo de corroborar el efecto de mutaciones que previamente habían sido analizadas mediante minigenes, se extrajo ARN de células epiteliales nasales de pacientes y controles, mediante un método no invasivo de raspado del epitelio nasal del cornete medio.

El análisis de ARN permitió confirmar que en 3 de los 8 transcritos USH1 estudiados, el procesamiento del ARNm estaba alterado de la misma forma que se había observado con minigenes: estos 3 cambios corresponderían a un cambio en *MYO7A* (c.5856G>A, p.K1952K), el cual había sido estudiado previamente por minigenes (Jaijo *et al.*, 2011) y dos cambios en *CDH23* (c.2289+1G>A y c.8722+1delG). Además, en el análisis de ARN de la variante c.2289+1G>A (*CDH23*) se pudo observar que, también se producía la inserción de las últimas 54pb del intrón adyacente, junto con las primeras 149pb intrónicas ya detectadas con minigenes.

Los otros cuatro cambios del gen *MYO7A* analizados mediante el ARN de pacientes USH1 (c.6\_9dup, c.640G>A, c.3508G>A y c.5581C>T) no afectaban al *splicing*, tal como se vio con los ensayos con minigenes.

La única variante en la que no pudimos observar el efecto producido en minigenes a partir del análisis de ARN, fue la variante c.6049G>A (*CDH23*), al amplificarse sólo el alelo salvaje. El paciente (RP-1534), portador de este cambio, también poseía la variante c.2289+1G>A. En el análisis de ARN de la variante c.2289+1G>A, se amplificaron los 2 alelos del gen *CDH23*, descartando que el cambio c.6049G>A produjese la degradación del alelo mutado mediante el mecanismo del NMD.

Se ha visto que alelos en los que se localizan mutaciones que generan codones de parada prematuros pueden ser degradados por el mecanismo de NMD (Wagner *et al.*, 2004). En este estudio, sin embargo, en todos los transcritos analizados correspondientes a las variantes de este tipo pudimos comprobar la presencia de ambos alelos, descartando que

estas variantes pudieran dar lugar a NMD. Estos resultados concuerdan con los publicados por Vaché *et al.* (2010), en el que ninguno de los cambios USH que analizaron provocaba la degradación del alelo portador de la mutación.

Aunque los estudios de ARN en células epiteliales nasales son un buen método para determinar la naturaleza patológica de las variantes USH, hay que tener en cuenta los bajos niveles de expresión que presentan los genes USH en este tejido, siendo necesario el uso de PCR-anidadas. En algunas ocasiones se producía la amplificación de uno solo de los alelos, siendo recomendable el diseño de *primers* específicos que incluyeran regiones donde hubiera polimorfismos en heterocigosis en el paciente, con el objetivo de verificar la amplificación de ambos alelos.

Por otra parte, en el procesamiento del ARNm intervienen tanto los elementos reguladores del *splicing* (*enhancers*, silenciadores exónicos e intrónicos), que facilitan el reconocimiento de los sitios correctos de ruptura y empalme entre exones, como los factores de *splicing* específicos de tejido, que intervienen en los procesos de *splicing* alternativo. Todos estos procesos pueden diferir entre tipos celulares distintos e influir en el procesamiento del ARNm, permitiendo la alta diversidad proteómica generada a través del *splicing* alternativo (Vaché *et al.*, 2010).

El estudio de otros tejidos relevantes y accesibles donde se expresen los genes causantes del USH, serían susceptibles de ser utilizados para el análisis de transcritos USH y estudios de expresión de variantes. El grupo de Nakanishi *et al.* (2010) pudieron demostrar, mediante la extracción de ARNm a partir de muestras de células de raíz capilar, la presencia de 7 de los transcritos USH, a excepción de *USHIC* y *CLRNI*, y determinar la naturaleza patológica de 2 variantes USH2 sobre el mecanismo de *splicing*, ampliando las posibilidades de estudios funcionales de expresión a nuevos tejidos.

### 2.4 Función ciliar

Los cilios se encuentran ampliamente distribuidos en el cuerpo humano y realizan funciones específicas en cada tejido. Sin embargo, comparten una ultraestructura y composición muy similar. Diferentes estudios en enfermedades ciliares, como el síndrome de Kartagener o discinesia ciliar primaria, o en procesos víricos a nivel pulmonar han permitido observar, mediante un modelo de video-imagen digital de alta velocidad y precisión, diferencias en el patrón y frecuencia del batido ciliar de células epiteliales bronquiales y de células ciliadas nasales (Armengot *et al.*, 2012b; Mata *et al.*, 2012a; Mata *et al.*, 2012b).

El USH ha sido considerado una ciliopatía, al afectar al desarrollo, cohesión y función de los estereocilios de las células ciliadas del oído interno y de los fotorreceptores en la retina. En base a las similitudes estructurales existentes entre el cilio conector de los fotorreceptores, los cilios de las células epiteliales nasales y el flagelo de los espermatozoides, se han realizado diversos estudios en los que se ha observado una disminución de la movilidad ciliar de estas células en pacientes diagnosticados de USH. Hunter *et al.* (1986) contemplaron una disminución de la movilidad y velocidad espermática, y un aumento en el número de colas anómalas en espermatozoides de pacientes USH, siendo el volumen y la concentración de espermatozoides normal. Bonneau *et al.* (1993) asociaron el USH1 a una disminución de la movilidad en células epiteliales nasales, así como a bronquiectasias.

Existe una gran controversia a la hora de determinar si la RP o síndromes ligados a RP, producen una disminución o variación en el patrón o movilidad ciliar de células nasales o una anomalía en los axonemas de los cilios o flagelos (Fox *et al.*, 1980; Hunter *et al.*, 1988; Roth *et al.*, 1992). Estos resultados contradictorios podrían ser debidos a que el axonema ciliar está compuesto por más de 200 proteínas y existen numerosos genes involucrados en su desarrollo y función. Para la RP se han descrito más de 50 genes, de ellos, solo unos pocos se conoce que se expresen en la región del cilio conector del fotorreceptor, por tanto, diferentes genes implicados en enfermedades ciliares, podrían causar distintos defectos en los cilios o axonemas (Armengot *et al.*, 2012a).

En el presente trabajo se determinó la frecuencia y patrón del batido ciliar en 8 pacientes diagnosticados de USH1 portadores de mutaciones en los genes *MYO7A* y *CDH23*, mediante un modelo de video-imagen digital de alta definición. Todos los pacientes mostraron un patrón de batido ciliar normal, sin embargo, se observó una ligera disminución significativa en la frecuencia del batido ciliar entre pacientes y controles. A la hora de comparar pacientes con mutaciones en *MYO7A* con aquellos portadores de mutaciones en *CDH23*, no se observaron diferencias, aunque la frecuencia del batido ciliar en pacientes *CDH23* fue menor. Nuestros resultados no difieren a los aportados por Armengot *et al.* (2012a) que comprobaron si la movilidad de las células epiteliales nasales estaba comprometida en ciliopatías retinianas. Realizaron un estudio en 13 pacientes diagnosticados de RP y 4 pacientes diagnosticados de USH2, observando que, pacientes de RP aislada no mostraban diferencias significativas en la movilidad ciliar. En cambio, los pacientes USH2 presentaban una ligera disminución del batido ciliar pero, su actividad era suficiente como para no producir un fenotipo clínico.

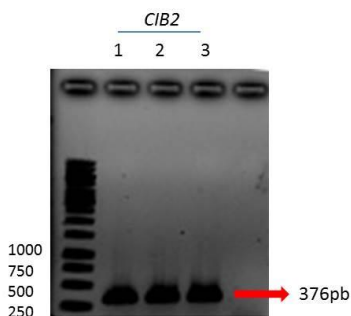
Recientemente, Piatti *et al.* (2014) publicaron un trabajo en el que se estudiaba el transporte mucociliar, la motilidad y la estructura de los cilios respiratorios en 17 pacientes diagnosticados de USH. Pudieron observar que los valores de las funciones respiratorias eran normales pero, la motilidad ciliar parecía estar ligeramente reducida sin que hubieses

alteraciones estructurales apreciables, a excepción de dos pacientes, uno diagnosticado de USH1 y otro de USH2, que mostraban alteraciones en el número y disposición de los microtúbulos periféricos, y otro paciente USH2 que presentaba raíces ciliares anormales. Estos resultados sugieren que una misma mutación en genes como *USH2A*, cuya proteína se expresa en las bases de los cilios conectores de los fotorreceptores y de los estereocilios de las células ciliadas del oído interno, puede afectar tanto a la motilidad como a la estructura, solapándose defectos en cilios motores y cilios sensoriales.

### 2.5 Estudios adicionales: expresión de los genes USH en células epiteliales nasales

Con el objetivo de comprobar la existencia de transcritos procedentes del nuevo gen descrito como responsable del USH1, *CIB2* (Riazuddin *et al.*, 2012), se realizó un análisis de RT-PCR a partir de muestras de ARN de células epiteliales nasales (Tabla S1, apéndice).

Los resultados obtenidos revelaron la presencia de un transcrito de 376pb correspondiente al gen *CIB2*, confirmando la expresión de éste en células epiteliales nasales (Figura 29).



**Figura 29.** Expresión del gen *CIB2* en células epiteliales nasales. El gel de agarosa muestra los productos de las PCR-anidadas obtenidas para este gen USH1.

### 2.6 Aplicaciones de los estudios funcionales

Los análisis *in silico* mediante programas bioinformáticos o los estudios de expresión mediante minigenes, análisis de ARN o estudios de interacción proteica, son

herramientas que permiten predecir o indicar la naturaleza patológica de una variante, así como determinar el efecto causado por dichos cambios.

Este tipo de estudios son de gran utilidad en las nuevas estrategias de diagnóstico molecular como son las plataformas de secuenciación masiva, las cuales aportan la ventaja de poder rastrear todos los genes de interés a la vez. Sin embargo, identifican una gran cantidad de variables cuya naturaleza patológica, en muchos casos, desconocemos.

Los estudios moleculares a nivel de ARN también están permitiendo la identificación de mutaciones intrónicas profundas, que originan la inclusión de pseudoexones, dando lugar a transcritos anómalos del gen. Vaché *et al.* (2012), identificaron en el gen *USH2A* una mutación intrónica profunda, c.7595-2144A>G, que producía la inserción de 152pb del intrón 40. Este cambio fue identificado en 4 pacientes *USH2* con una o ninguna mutación identificada en *USH2A* de población francesa y en 4 pacientes de origen español con una mutación identificada en *USH2A*. Por tanto, sería necesaria la búsqueda de nuevos pseudoexones en transcritos *USH* responsables de la enfermedad, al menos en aquellos pacientes que no presentan mutaciones o presentan únicamente una mutación claramente patológica en los genes *USH*.

### 3. Secuenciación de nueva generación: diagnóstico molecular del USH

En el apartado V se detalla el desarrollo de una nueva plataforma para el diagnóstico molecular del USH. Este tipo de estrategias se han desarrollado con el objetivo de aumentar la rapidez y disminuir el coste en la identificación de las mutaciones causantes de la enfermedad, especialmente, en aquellas genéticamente heterogéneas.

#### 3.1 Panel de genes

Se diseñó un panel de genes basado en el método de secuenciación dirigida HaloPlex, empleando la herramienta *Suredesign* de Agilent para la plataforma MiSeq (Illumina), con el objetivo de capturar todos los exones más 25pb intrónicas adyacentes de un total de 14 genes. Los genes involucrados en el estudio fueron los 10 causantes del USH (*MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH1G*, *CIB2*, *USH2A*, *GPR98*, *DFNB31* y *CLRN1*), 2 genes asociados (*PDZD7* y *HARS*) y 2 genes candidatos (*VEZT* y *MYO15A*). En este diseño también se incluyó la región intrónica del gen *USH2A* en la que se localiza la mutación c.7595-2144A>G, que da lugar a la inclusión de un pseudoexón (Vaché *et al.*, 2012).

#### 3.2 Pacientes

Se analizaron 40 pacientes divididos en 2 grupos de estudio: un grupo control, formado por 8 pacientes con al menos una mutación identificada previamente (6 con una mutación y 2 pacientes con las 2 mutaciones causantes halladas), de los cuales 4 habían sido diagnosticados de USH1 y 4 de USH2; y un grupo de estudio, formado por 32 pacientes sin diagnóstico genético, de los cuales, 13 pacientes estaban diagnosticados de USH1, 16 de USH2 y 3 de USH3.

#### 3.3 Cobertura media por *target*

Existen diferentes estudios de NGS en los que se han analizado los genes responsables del USH mediante la utilización de distintos paneles y plataformas de secuenciación masiva, reflejando resultados dispares entre las coberturas medias obtenidas por *target*. Licastro *et al.* (2012) emplearon dos estrategias de estudio para abordar el diagnóstico molecular de 12 pacientes USH: *Long-PCR* para amplificar los 9 genes USH descritos hasta ese momento y secuenciación mediante las plataformas Illumina y Roche; y

la WES, a través de SOLiD. Los resultados de cobertura media obtenidos con las dos estrategias fueron inferiores al límite utilizado para la validación y diagnóstico (40x). Mediante *Long-PCR* la cobertura media fue de 25x con un 94% de las regiones capturadas, y mediante WES la eficiencia fue inferior, obteniendo una cobertura mínima de 30x sólo para el 50% de las regiones. Asimismo, Besnard *et al.* (2014) desarrollaron un panel de 19 genes, entre ellos 9 de los genes responsables del USH y 2 candidatos (*PDZD7* y *VEZT*), y analizaron 71 pacientes con la plataforma *454 GS Junior System* de Roche. Los resultados obtenidos revelaron una cobertura media por *target* de 77x, con un total de 37 regiones mal cubiertas. Yoshimura *et al.* (2014) analizaron 9 de los genes responsables del USH en 17 pacientes USH1, aplicando la tecnología del *Ion Torrent PGM* secuenciando con el chip 318, obteniendo una cobertura media por *target* de 314,2x y una captura superior a 20x en el 93,8% de las *target*.

En diversos proyectos en los que se han analizado genes responsables de distrofias de retina, los genes USH también han sido incluidos. Fu *et al.* (2013) utilizaron la plataforma HiSeq (Illumina) para el análisis de 31 familias diagnosticadas de ARRP, mediante un panel de 163 genes responsables de enfermedades retinianas. De esta forma, pudieron capturar el 90% de las regiones de interés y obtuvieron una cobertura media por *target* de 56x, permitiéndoles detectar la causa de la enfermedad en un 40% de las familias analizadas. De la misma forma, Glöckle *et al.* (2014) mediante la plataforma SOLiD secuenciaron 105 genes relacionados con distrofias de retina, analizando 170 pacientes con diferentes formas de degeneración retiniana. En este caso, obtuvieron coberturas por *target* de 53,5x, con una eficacia de detección de mutaciones en torno al 55-80%, según el genotipo-fenotipo analizado. Recientemente, Rong *et al.* (2014) mediante un *microarray* que contenía 179 genes relacionados con distrofias de retina y los 10 genes causantes del USH junto *PDZD7*, obtuvieron coberturas medias por *target* de 98,54x, permitiéndoles identificar la causa de la enfermedad en las 3 familias USH chinas estudiadas. Asimismo, Qu *et al.* (2014) empleando también un *array* de captura para 103 genes responsables de distrofias de retina mediante la plataforma HiSeq (Illumina), obtuvieron una cobertura de 200x, hallando la causa de la enfermedad en las 5 familias USH chinas analizadas.

En los estudios sobre hipoacusias sindrómicas y no sindrómicas, los genes USH también han sido incluidos en diversos paneles. Shearer *et al.* (2010) emplearon dos plataformas de secuenciación para abordar el diagnóstico molecular de 9 pacientes con hipoacusia no sindrómica: la plataforma SOLiD y la plataforma GAI-Illumina. Estos dos tipos de secuenciadores analizaron los 54 genes relacionados con hipoacusia que comprende el panel OtoSCOPE (*Otologic Sequence Capture of Pathogenic Exons*), en los que están incluidos los genes USH. Las coberturas medias obtenidas entre estas 2 estrategias fueron muy dispares, mediante SOLiD obtuvieron una cobertura de 71x y con Illumina de 903x, sin embargo, el porcentaje de regiones no capturadas no fue muy diferente. Esto les permitió hallar la causa de la enfermedad en 8 de los 9 pacientes

analizados, identificando en 2 de ellos mutaciones en 4 de los genes USH (*MYO7A*, *CDH23*, *PCDH15* y *USH2A*). Mutai *et al.* (2013) analizaron 84 genes responsables de hipoacusias sindrómicas y no sindrómicas en un total de 15 familias, empleando la tecnología Illumina. Los resultados obtenidos mostraron una cobertura por *target* superior a 100x con más del 90% de las regiones secuenciadas, pudiendo detectar posibles genes candidatos en 7 de las 15 familias analizadas. Así mismo, Shahzad *et al.* (2013) seleccionaron 34 familias pakistaníes diagnosticadas de hipoacusia autosómica recesiva, que mostraban ligamiento a los genes *MYO7A*, *CDH23* y *SLC26A4*, usando la plataforma OtoSeq (*Microdroplet PCR-based Target Enrichment*). Estas 34 familias fueron analizadas mediante la plataforma HiSeq (Illumina), siendo capaces de detectar la causa de la mutación en 28 de ellas. Veintiséis de las familias eran portadoras de mutaciones en *MYO7A*, una de las familias en *CDH23* y otra de las familias en *SLC26A4*. Además, 5 de estas familias analizadas fueron diagnosticadas de USH1.

Además del trabajo de Licastro *et al.* (2012) mencionado anteriormente, se han publicado otros 2 trabajos en los que los genes USH también han sido estudiados mediante la estrategia de WES. Recientemente, el grupo de Reddy *et al.* (2014) empleó este método con el objetivo de identificar las mutaciones causantes de USH en 11 familias libanesas. Mediante esta estrategia, obtuvieron una cobertura media de 133x, presentando el 95% de las regiones una cobertura >30x. De la misma forma, Krawitz *et al.* (2014) analizaron 9 de los genes USH en un total de 44 pacientes USH. En este caso, obtuvieron una cobertura media de 300x con una cobertura >10x en el 95% de las *target*.

Mediante nuestro diseño, basado en el análisis de los 10 genes causantes del USH y 4 genes asociados y/o candidatos, empleando la herramienta HaloPlex para la plataforma MiSeq (Illumina), pudimos obtener una cobertura media por *target* de 1334x, siendo el gen *CLRN1* el mejor cubierto, con una cobertura media de 1817x, y el gen *VEZT* el inferior, con una cobertura media de 935x. La cobertura conseguida en este trabajo fue significativamente mayor a la del resto de los estudios realizados sobre el USH, permitiéndonos obtener resultados más fiables que aquellos donde las regiones capturadas y sus lecturas de base habían sido inferiores.

No obstante, con la metodología de HaloPlex se observó una cobertura muy heterogénea entre las diferentes *target* secuenciadas, hallándose la máxima en el exón 11 del gen *PDZD7* con una cobertura de 3412x y la mínima en la *target* correspondiente a 43pb del exón 2 del gen *MYO15A*, con una cobertura de 6x, siendo ésta inferior al límite utilizado para la validación y el diagnóstico (40x). Asimismo, se ha visto que regiones ricas en GCs son difíciles de capturar, existiendo una relación entre la baja cobertura que pueda tener una *target* y su contenido en GCs, sugiriéndose que ésta podría ser debida a la naturaleza de esa región (Sulonen *et al.*, 2011). En este estudio, se comprobó que la *target* que presentaba una cobertura <40x, correspondiente a parte del exón 2 del gen *MYO15A*,



presentaba un contenido en GCs del 77%, pudiendo explicar su mala captura. De la misma forma, Besnard *et al.* (2014) también observaron en su estudio que, aquellas regiones con porcentajes de GCs superiores al 70% estaban muy mal cubiertas, y que el contenido medio de GCs de los 50 exones mejor cubiertos era del 41%. Sin embargo, la mala cobertura obtenida en algunas regiones, también podría ser debida a la existencia de elementos repetitivos que solaparan con la *target* y no al contenido en GCs.

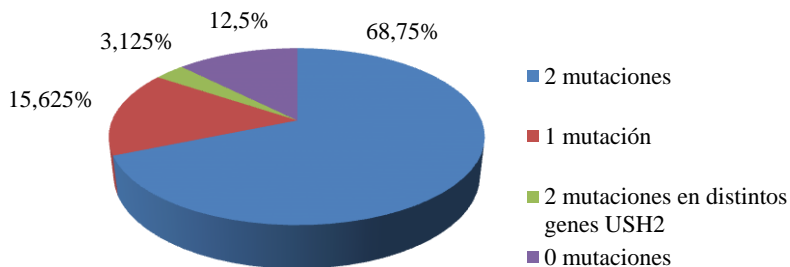
### 3.4 Validación y diagnóstico

#### 3.4.1 Grupo control: validación de la estrategia de diagnóstico

La validación del panel se realizó mediante el análisis del grupo control, con al menos una mutación identificada previamente, siendo capaces de detectar tanto las mutaciones puntuales como los grandes reordenamientos. Además, nos permitió identificar la segunda mutación en 5 de los 6 pacientes en los que sólo se había identificado con anterioridad un cambio patológico.

#### 3.4.2 Grupo de estudio: diagnóstico molecular

En este trabajo, pudimos identificar el 79,7% (51/64) de los alelos mutados en un total de 32 pacientes sin ninguna mutación identificada previamente. Veintidós pacientes con 2 mutaciones bialélicas en un mismo gen, 5 pacientes con una mutación, 4 pacientes sin mutación identificada y un paciente (RP-1950) con dos mutaciones en dos genes USH2 distintos (Figura 30).



**Figura 30.** Representación del porcentaje de pacientes del grupo de estudio en los que identificamos mutaciones patológicas mediante NGS.

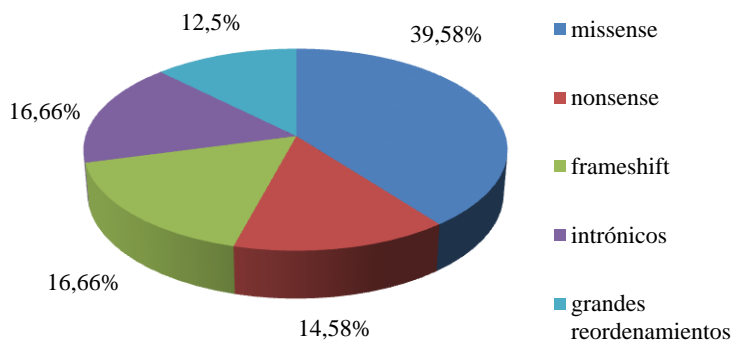
Si comparamos nuestros resultados de detección con los resultados hallados en otros trabajos de NGS sobre el diagnóstico molecular del USH, no observamos diferencias significativas. Licastro *et al.* (2012) obtuvieron para sus 12 pacientes USH analizados mediante, WES y *Long-PCR*, un ratio de identificación del 62,5% de los alelos mutados. Besnard *et al.* (2014) identificaron el 85% de los alelos mutados de un total de 13 pacientes USH sin ninguna mutación identificada previamente. Yoshimura *et al.* (2014) en su estudio para 17 pacientes USH1 pudieron detectar el 85,29% de los alelos mutados. Recientemente, Reddy *et al.* (2014) mediante la estrategia WES fue capaz de hallar la causa de la enfermedad en las 11 familias USH libanesas analizadas, y Krawitz *et al.* (2014) mediante la misma estrategia, pudieron hallar el 88,63% (78/88) de los alelos mutados. Sin embargo, aunque todos estos trabajos presentan un número reducido de pacientes analizados, los resultados con NGS son prometedores.

La tasa de detección de alelos mutados en este trabajo no difiere a la hallada mediante las técnicas tradicionales de secuenciación. Bonnet *et al.* (2011) en su estudio sobre 9 de los genes USH, consiguieron identificar el 84,25% (91/108) de los alelos mutados de 54 pacientes USH y Le Quesne-Stabej *et al.* (2012) en su trabajo sobre el diagnóstico molecular del USH y el gen candidato *SLC4A7*, identificaron el 75% de los alelos mutados (282/376) en 188 pacientes diagnosticados de USH.

### 3.4.3 Espectro mutacional

El análisis de los 38 pacientes con una o ninguna mutación identificada, nos permitió hallar mutaciones patológicas en todos los genes USH, a excepción de *CIB2* y *CLRN1*. Además, el 50% (24/48) de las variantes patológicas identificadas en este estudio no habían sido descritas previamente. De hecho, la mayoría de mutaciones en el USH son propias de cada familia. El total de cambios patológicos identificados en este estudio incluía: 19 mutaciones *missense*, 7 *nonsense*, 8 *frameshifts*, 8 cambios intrónicos y 6 grandes reordenamientos (Figura 31).

El gen donde identificamos un mayor número de mutaciones causantes de la enfermedad fue *USH2A* con un 37,5% (18/48) de las mutaciones, seguido del gen *MYO7A* con una tasa de mutación del 22,92% (11/48), *CDH23* con 14,58% (7/48), *GPR98* con 12,5% (6/48), *PCDH15* con 6,25% (3/48) y *USH1C*, *USH1G* y *DFNB31* con un 2,08% (1/48), respectivamente. Estos resultados son semejantes a los hallados por Le Quesne-Stabej *et al.* (2012) quienes identifican la mayoría de mutaciones en los genes *MYO7A* y *USH2A*.



**Figura 31.** Diagrama del tipo de mutaciones identificadas mediante NGS, incluyendo los 32 pacientes del grupo de estudio y los 6 pacientes del grupo control en los que habíamos identificado otra mutación patológica con anterioridad.

#### 3.4.3.1 Identificación de mutaciones adicionales en otros genes USH

En este estudio se pudo detectar en 2 pacientes, RP-1847 y RP-1923, además de las 2 mutaciones patológicas identificadas en *USH2A*, una tercera variante patológica no descrita en *USH1G* (c.805C>T, p.R269X) y en *DFNB31* (c.2234G>A, p.R745H), respectivamente. Sin embargo, aunque estos 2 nuevos cambios pueden considerarse patológicos, la causa de la enfermedad en estos pacientes reside, posiblemente, en *USH2A*. Esto no descarta que estos cambios en *USH1G* y *DFNB31*, sean posibles modificadores del fenotipo, dando origen a una sintomatología más grave o temprana de la enfermedad.

Diversos estudios han identificado pacientes con mutaciones adicionales en otro gen distinto al causante de la enfermedad, apoyando que estos cambios sean responsables de las variaciones en la sintomatología del paciente. Ebermann *et al.* (2010) identificaron en 2 hermanas homocigotas para la misma mutación en *USH2A*, un codón de parada prematuro en *PDZD7* en una de ellas, agravando el fenotipo retiniano de ésta. Bonnet *et al.* (2011) hallaron en 7 de 54 pacientes (13%) portadores de mutaciones patológicas en genes USH, una o dos mutaciones adicionales en los otros genes causantes del USH, sugiriendo que estos cambios podrían ser los responsables de un posible empeoramiento de los síntomas. Asimismo, Yoshimura *et al.* (2014) identificaron en 4 pacientes USH1 una tercera mutación en otros genes USH1 distintos, sugiriendo que estas mutaciones podrían ser modificadoras del fenotipo, manifestándose una RP más temprana y no viéndose afectada la hipoacusia ni la disfunción vestibular al ser de tipo congénita y no progresiva, en estos pacientes.

### 3.4.3.2 Identificación de mutaciones en genes asociados a distinto tipo clínico al que pertenece el paciente

En este estudio, en los pacientes RP-807 y RP-1781, diagnosticados de USH2, se identificaron 2 mutaciones patológicas en *CDH23*. En el paciente RP-890, diagnosticado de USH3, las 2 mutaciones patológicas se hallaron en el gen *USH2A* y en el paciente RP-1864, diagnosticado de USH2, las 2 mutaciones patológicas se detectaron en el gen *MYO7A*.

Este tipo de situación, en la que pacientes diagnosticados con un tipo clínico son portadores de mutaciones en genes implicados en otro tipo clínico, no es la primera vez que se informa. Jaijo *et al.* (2010) mediante su estudio basado en el *microarray* para el diagnóstico molecular de USH de Asper Biotech, identificaron en 3 pacientes USH2, mutaciones en los genes responsables del USH1, así como en 2 pacientes USH3, hallaron mutaciones en el gen *USH2A* y en el gen *PCDH15*, respectivamente. Asimismo, Bonnet *et al.* (2011) identificaron las mutaciones responsables de la enfermedad en el gen *USH2A* en 3 pacientes diagnosticados como USH3. Del mismo modo, García-García *et al.* (2011) identificaron en un paciente con clínica similar a USH1, 2 mutaciones patológicas en *USH2A*, y en otro paciente con clínica similar a USH3, encontraron mutaciones patológicas en *USH2A*, no descartando que cambios en este gen o en otros genes USH, presentes en estos pacientes, tuvieran un efecto modificador del fenotipo. Recientemente, Besnard *et al.* (2014) hallaron mutaciones en los genes *MYO7A*, *CDH23* y *CLRN1* en pacientes diagnosticados de USH2, y Rong *et al.* (2014) identificaron 2 nuevas mutaciones patológicas en el gen *MYO7A* en un paciente diagnosticado de USH2, sugiriendo que diferentes manifestaciones clínicas pueden darse en base a la localización de la mutación dentro del gen y el dominio proteico al que esté afectando.

Estos resultados secundan el uso de las técnicas de NGS que permiten el estudio de todos los genes USH independientemente del tipo clínico, facilitando la detección de mutaciones en genes asociados a distinto tipo clínico. Además, realzan la importancia de la clínica a la hora de establecer las correlaciones genotipo-fenotipo, identificando caracteres atípicos asociados a genes implicados en otro tipo clínico. Además, se ha visto que algunos genes USH, como el gen *PCDH15*, podría ser responsable de algunos casos de USH3, lo mismo que los genes *USH2A*, *MYO7A*, *CDH23* y *USH1C* podrían ser responsables de casos atípicos (Liu *et al.*, 1998; Astuto *et al.*, 2002; Ben-Yosef *et al.*, 2003; Bernal *et al.*, 2005; Saihan *et al.*, 2011; Le Quesne-Stabej *et al.*, 2012; Khateb *et al.*, 2012; Krawitz *et al.*, 2014).

### 3.5 Detección de grandes reordenamientos

En el USH se ha observado la presencia de grandes reordenamientos en los genes *MYO7A*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH1C*, *USH2A* y *GPR98*, mediante la utilización de diferentes técnicas como MLPA, *array*-CGH o PCR cuantitativa (Bitner-Glindzicz *et al.*, 2000; Le Guédard *et al.*, 2007; Hilgert *et al.*, 2009; Aller *et al.*, 2010; Roux *et al.*, 2011; Besnard *et al.*, 2012; Steele-Stallard *et al.*, 2013; Glöckle *et al.*, 2014; García-García *et al.*, 2014; Qu *et al.*, 2014; Krawitz *et al.*, 2014). Roux *et al.* (2006) determinaron que la frecuencia de grandes reordenamientos, deleciones o duplicaciones, en pacientes USH1 se encontraba en torno al 10%, y García-García *et al.* (2014) sugirieron que grandes deleciones podrían representar el 9,4% de las mutaciones del gen *USH2A*.

El estudio realizado en nuestra cohorte de 38 pacientes con una o ninguna mutación identificada previamente, nos permitió realizar un análisis cuantitativo, gracias a la elevada cobertura media obtenida por *target*. El número de copias inusual de una región pudo ser detectado mediante la comparación de la cobertura normalizada de cada *target* de cada paciente respecto a la cobertura normalizada de las restantes muestras de cada carrera. Aquellos *target* que presentaban una cobertura  $<250x$  no eran utilizados en el análisis del número de variantes, pues eran considerados de baja calidad para este tipo de estudio. Este análisis permitió determinar que el 14,28% (8/56) de los alelos mutados identificados en los 38 pacientes estudiados (6 pacientes con una mutación identificada previamente y 32 pacientes sin ninguna), presentaban grandes reordenamientos. Se identificaron 3 deleciones en el gen *USH2A* en los exones 14, 20 y 44, y 3 duplicaciones: exón 29 del gen *CDH23*, exones 22\_23 del gen *PCDH15* y exones 79\_83 del gen *GPR98*. Todos ellos fueron comprobados mediante MLPA (*USH2A* y *PCDH15*) o *array*-CGH (*GPR98*), a excepción de la duplicación del exón 29 del gen *CDH23*, que no pudo ser corroborada debido a problemas técnicos durante el análisis con el *array*-CGH.

Este no es el único trabajo donde se ha podido observar CNVs mediante NGS. Eisenberger *et al.* (2013) publicaron un estudio sobre un panel de 55 genes de distrofias de retina, donde detectaban, gracias a la elevada cobertura de las *target*, grandes reordenamientos en distintos genes implicados en la degeneración retiniana. Los autores concluyen que una alta y extensa cobertura permitiría el análisis de CNVs y reduciría el riesgo de pérdida de detección de mutaciones que no son identificadas debido a su localización en regiones de baja cobertura. Asimismo, Glöckle *et al.* (2014) hallaron en uno de sus pacientes analizados mediante la plataforma SOLiD, la deleción del exón 14 del gen *USH2A* en homocigosis, y Qu *et al.* (2014) mediante un *array* de captura de genes responsables de distrofias de retina, identificaron en una de las familias estudiadas la deleción de los exones 38-39 del gen *MYO7A* en heterocigosis. Recientemente, Krawitz *et al.* (2014) hallaron en 2 de sus pacientes USH, en heterocigosis, las deleciones de los exones 24-26 y 38-41 del gen *USH2A*, respectivamente.

### 3.6 Casos no resueltos

En 4 de los 32 pacientes estudiados no identificamos ninguna de las dos mutaciones causantes de la enfermedad y en 5 pacientes sólo pudimos identificar una de las mutaciones causantes. Esto pudo ser debido a que la mutación o mutaciones se encontrasen en regiones no cubiertas por nuestro panel, como regiones promotoras, regiones 5' ó 3' no traducidas o regiones intrónicas profundas. Sin embargo, puede que las variantes causantes de la enfermedad no hayan sido detectadas por un mal alineamiento de las secuencias o éstas no hayan superado los filtros de calidad de los programas bioinformáticos. También, cabe asumir que las mutaciones halladas en los 5 pacientes con una única mutación identificada, no sean las responsables de la enfermedad y éstas se ubiquen en otro gen USH no identificado hasta el momento.

Asimismo, en uno de los pacientes donde no identificamos ninguna mutación puntual, RP-531, no pudimos llevar a cabo el análisis cuantitativo del número de variantes, al obtener unos valores de ratio anómalos entre las *target* de este paciente y las *target* normalizadas de la mayoría de genes. Esto pudo ser debido a una deficiencia en el proceso de enriquecimiento del ADN durante el protocolo de amplificación y captura de las *target*, pues la imagen obtenida por el bioanalizador en la etapa de validación y cuantificación de las regiones de ADN de interés enriquecido para este paciente, fue atípica. Por tanto, no podemos descartar que la causa de la enfermedad en este paciente sean grandes reordenamientos.

#### 3.6.1 Posibles casos de digenismo

El estudio mediante NGS nos permitió en dos casos identificar mutaciones en genes distintos. En los pacientes RP-1426 y RP-1950 pudimos detectar 2 mutaciones en 2 genes USH diferentes. En el primer paciente, el cual era portador de la mutación p.Ala2204Pro en el gen *MYO7A*, hallamos un nuevo cambio intrónico, c.5068-2A>T, en el gen *CDH23*. Sin embargo, se descartó una posible herencia digénica al realizar el análisis de segregación, ya que ambos cambios se encontraban en uno solo de los progenitores. En el segundo paciente, RP-1950, identificamos la primera mutación, c.2299delG, en el gen *USH2A* y la segunda, p.Pro4760Ser, en el gen *GPR98*. Sin embargo, no pudimos comprobar la presencia de digenismo al no poseer ADN de familiares.

En diversos estudios mediante secuenciación Sanger se había podido detectar posibles casos de herencia digénica u oligogonismo. Ebermann *et al.* (2010) identificaron en un paciente 2 mutaciones patológicas *frameshift* en heterocigosis en los genes *GPR98* y *PDZD7*, respectivamente. Cada uno de los cambios había sido heredado de un progenitor.

Bonnet *et al.* (2011) hallaron en 3 familias USH, una diagnosticada de USH1 y 2 diagnosticadas de USH2, mutaciones en 2 genes USH distintos.

Los resultados obtenidos en este trabajo junto con los publicados por Yoshimura *et al.* (2014), quienes identifican un posible caso de digenismo en un paciente USH1 con una mutación *frameshift* en *MYO7A* y otra mutación de *splicing* en *PCDH15*; y Besnard *et al.* (2014), quienes identifican dos posibles casos de digenismo, apoyan el uso de la NGS, al identificar de manera rápida y a bajo coste, los posibles casos de herencia digénica, secuenciando todos los genes de interés a la vez.

Los posibles casos de herencia digénica se avalan en análisis moleculares *in vitro* de interacción y colocalización entre las distintas proteínas USH y en estudios realizados en animales modelo. Yan *et al.* (2010) publicaron un trabajo en el que mostraban, en cultivos celulares, las distintas interacciones entre los dominios proteicos en la formación del complejo harmonina/SANS. En él, pudieron observar que determinadas mutaciones en estos dos genes afectaban a la estructura y cohesión de este complejo proteico. Asimismo, Ebermann *et al.* (2010) mediante modelos *knockdown* de *zebrafish* para *GPR98* y *PDZD7* observaron fenotipos consistentes con herencia digénica, sugiriendo que dos mutaciones en genes distintos podrían ser responsables de la enfermedad. Sin embargo, ratones digénicos para *PDZD7* y alguno de los genes USH (*USH2A*, *GPR98*, *DFNB31* o *USH1G*) empleados por Zou *et al.* (2014) no manifestaban ningún signo de hipoacusia neurosensorial.

Por tanto, no podemos descartar que la segunda mutación en estos pacientes con esta supuesta herencia digénica, resida en uno de los dos genes portadores de los cambios y no haya sido identificada al ubicarse en regiones no secuenciadas por nuestro panel o no haya superado los filtros de calidad de los programas bioinformáticos. Le Quesne-Stabej *et al.* (2012) sugieren que los posibles casos de herencia digénica descritos por Bonnet *et al.* (2011) o por Vozzi *et al.* (2011), quienes identifican un paciente con mutaciones en los genes *CDH23* y *PCDH15*, podrían ser casos no resueltos, debido a que en todos ellos, una de las mutaciones halladas en heterocigosis no era una mutación claramente patológica (codón de parada prematuro, *frameshift* o mutaciones de *splicing*) o ésta había sido descrita previamente como un polimorfismo. Los autores proponen que la segunda mutación en esos pacientes podría residir en el gen donde identifican la mutación claramente patológica, considerando la variante *missense* identificada como una variante neutral poco frecuente o como modificadora del fenotipo. Asimismo, Le Quesne-Stabej *et al.* (2012) plantean que el posible caso de herencia digénica descrito por Ebermann *et al.* (2010) en los genes *GPR98* y *PDZD7* con mutaciones claramente patológicas, podría no serlo, y ubicarse la segunda mutación no identificada en el gen *GPR98*, actuando de este modo, el gen *PDZD7* como un modificador del fenotipo.

### 3.7 Genes asociados y candidatos al USH

En este trabajo, se decidió incluir en el estudio por NGS cuatro genes relacionados con el USH: dos asociados, *PDZD7* y *HARS*, y dos candidatos, *VEZT* y *MYO15A*. Estos genes fueron seleccionados en base a su implicación e interacción en la red de proteínas USH, así como por su homología a otras proteínas USH, su posible efecto modificador del fenotipo o la identificación de posibles mutaciones causantes de la enfermedad.

Sin embargo, en ninguno de los pacientes analizados en el presente estudio, identificamos mutaciones patológicas en estos genes. En el estudio realizado por Besnard *et al.* (2014) en el que también analizan los genes *PDZD7* y *VEZT*, tampoco hallaron variantes patológicas en los pacientes analizados.

No podemos descartar que estos genes asociados y/o candidatos no puedan ser responsables de la enfermedad en otros pacientes USH no analizados. Del mismo modo, puede que la causa de la enfermedad en aquellos pacientes estudiados, donde no hemos encontrado ninguna mutación, resida en otros genes del interactoma no analizados u otros genes conocidos responsables de RP o hipoacusia.

### 3.8 Futuros estudios

Hasta hace pocos años, el diagnóstico molecular del USH se realizaba mediante la aplicación de la secuenciación por Sanger junto con la utilización de otras técnicas como MLPA, microchip o *array*-CGH, con el objetivo de identificar las mutaciones causantes de la enfermedad, lo que era un trabajo largo y costoso debido al número de genes implicados en la enfermedad, así como al elevado tamaño de la mayoría de ellos.

Tras el desarrollo de la NGS se ha conseguido una mayor rapidez en el diagnóstico molecular de la enfermedad, con un menor coste por paciente. Además, ha permitido la identificación de la causa subyacente de la enfermedad en aquellos pacientes que no habían podido ser clasificados por falta de suficientes datos clínicos o presentaban fenotipos atípicos que no cuadraban con ninguno de los tipos clínicos, así como en aquellos pacientes portadores de mutaciones en otros genes responsables de distintos tipos clínicos.

No obstante, es necesario realizar mejoras en las nuevas plataformas de secuenciación, pues el principal problema que presentan son sus falsos positivos, debido a un mal alineamiento de las secuencias o a la presencia de homopolímeros. Sería también necesario la inclusión en los paneles de nuevos genes candidatos o nuevas regiones no secuenciadas de los genes USH, que pudieran ser responsables de la enfermedad, como regiones promotoras, regiones UTRs o regiones intrónicas profundas.



Por tanto, estos avances en un diagnóstico genético más rápido y eficaz favorecerán a un mejor diagnóstico clínico y a la posible aplicación de futuros tratamientos o ensayos basados en terapias génicas para el USH.



## **VII. CONCLUSIONES**



## Conclusiones

1. El gen *USH1C* es responsable del 3,08% de los pacientes diagnosticados de USH1 de población española, considerándose como un subtipo poco frecuente del USH1.
2. En nuestra serie, las mutaciones identificadas en el gen *USH1C* son propias de cada familia, no observándose puntos calientes de mutación.
3. Los análisis *in silico* de las variantes identificadas permiten predecir la patogenicidad de una variante sobre el *splicing*. Sin embargo, los estudios funcionales de expresión son esenciales para determinar su implicación patológica sobre el procesamiento del ARNm.
4. Los minigenes son una buena estrategia para determinar el efecto de las variantes sobre el procesamiento del ARNm, sobre todo, en aquellos casos en que los genes implicados en la enfermedad presentan perfiles de expresión restringidos a tejidos de difícil acceso.
5. Los análisis de ARN a partir de células epiteliales nasales de pacientes diagnosticados de USH1, son un buen método para discriminar variantes neutras de aquellas que afectan al *splicing*.
6. Los estudios sobre movilidad ciliar en células epiteliales nasales de pacientes diagnosticados de USH1, han mostrado una disminución estadísticamente significativa de la frecuencia del batido ciliar, aunque presenta una actividad aparentemente suficiente como para no producir un fenotipo clínico.
7. El panel de genes desarrollado para el diagnóstico molecular del USH mediante NGS ha permitido detectar el 79,7% de los alelos mutados de una cohorte de estudio de 32 pacientes USH sin diagnóstico genético previo. Además, ha permitido identificar las mutaciones causantes de la enfermedad en genes responsables de otro tipo clínico, así como detectar posibles casos de herencia digénica o variantes que pudieran actuar como modificadores del fenotipo.
8. El uso de la NGS en el diagnóstico molecular del USH, nos ha permitido identificar en la serie global de pacientes 8 grandes reordenamientos, tanto deleciones como duplicaciones, lo que supone el 14,28% de los alelos mutados responsables de la enfermedad.

## VII. Conclusiones \_\_\_\_\_

9. En ninguno de los pacientes analizados mediante NGS identificamos mutaciones patológicas en los genes propuestos como asociados y candidatos al USH. Sin embargo, no podemos descartar que estos genes no puedan ser responsables de la enfermedad en otros pacientes USH no analizados.

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**





**Bibliografia**

- Abadie C, Blanchet C, Baux D, Larrieu L, Besnard T, Ravel P, Biboulet R, Hamel C, Malcolm S, Mondain M, Claustres M, Roux AF. Audiological findings in 100 USH2 patients. *Clin Genet.* 2012, 82:433-8.
- Adato A, Vreugde S, Joensuu T, Avidan N, Hamalainen R, Belenkiy O, Olender T, Bonne-Tamir B, Ben-Asher E, Espinos C, Millan JM, Lehesjoki AE, Flannery JG, Avraham KB, Pietrokovski S, Sankila EM, Beckmann JS, Lancet D. USH3A transcripts encode clarin-1, a fourtransmembrane- domain protein with a possible role in sensory synapses. *Eur. J. Hum. Genet.* 2002, 10: 339-50.
- Adato A, Michel V, Kikkawa Y, Reiners J, Alagramam KN, Weil D, Yonekawa H, Wolfrum U, El-Amraoui A, Petit C. Interactions in the network of Usher syndrome type 1 proteins. *Hum Mol Genet.* 2005a, 14:347-56.
- Adato A, Lefevre G, Delprat B, Michel V, Michalski N, Chardenoux S, Weil D, El-Amraoui A, Petit C. Usherin, the defective protein in Usher syndrome type IIA, is likely to be a component of interstereocilia ankle links in the inner ear sensory cells. *Hum. Mol. Genet.* 2005b, 14:3921-32.
- Ahmad J, Khan SN, Khan SY, Ramzan K, Riazuddin S, Ahmed ZM, Wilcox ER, Friedman TB, Riazuddin S. DFNB48, a new nonsyndromic recessive deafness locus, maps to chromosome 15q23-q25.1. *Hum Genet.* 2005, 116:407-12.
- Ahmed ZM, Riazuddin S, Bernstein SL, Ahmed Z, Khan S, Griffith AJ, Morell RJ, Friedman TB, Riazuddin S, Wilcox ER. Mutations of the protocadherin gene PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *Am J Hum Genet.* 2001, 6:25-34.
- Ahmed ZM, Riazuddin S, Ahmad J, Bernstein SL, Guo Y, Sabar MF, Sieving P, Riazuddin S, Griffith AJ, Friedman TB, Belyantseva IA, Wilcox ER. PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Hum Mol Genet.* 2003, 12:3215-23.
- Ahmed ZM, Riazuddin S, Aye S, Ali RA, Venselaar H, Anwar S, Belyantseva PP, Qasim M, Riazuddin S, Friedman TB. Gene structure and mutant alleles of PCDH15: nonsyndromic deafness DFNB23 and type 1 Usher syndrome. *Hum Genet.* 2008, 124:215-23.

- Ahmed ZM, Riazuddin S, Khan SN, Friedman PL, Riazuddin S, Friedman TB. USH1H, a novel locus for type I Usher syndrome, maps to chromosome 15q22-23. *Clin Genet.* 2009, 75:86-91.
- Alagramam KN, Yuan H, Kuehn MH, Murcia CL, Wayne S, Srisailpathy CR, Lowry RB, Knaus R, Van Laer L, Bernier FP, Schwartz S, Lee C, Morton CC, Mullins RF, Ramesh A, Van Camp G, Hageman GS, Woychik RP, Smith RJ. Mutations in the novel protocadherin PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *Hum Mol Genet.* 2001a, 10:1709-18.
- Alagramam KN, Murcia CL, Kwon HY, Pawlowski KS, Wright CG, Woychik RP. The mouse Ames waltzer hearing-loss mutant is caused by mutation of Pcdh15, a novel protocadherin gene. *Nat Genet.* 2001b, 27:99-102.
- Alagramam KN, Goodyear RJ, Geng R, Furness DN, van Aken AF, Marcotti W, Kros CJ, Richardson GP. Mutations in protocadherin 15 and cadherin 23 affect tip links and mechanotransduction in mammalian sensory hair cells. *PLoS One.* 2011, 6:e19183.
- Aller E, Jaijo T, Beneyto M, Nájera C, Morera C, Pérez-Garrigues H, Ayuso C, Millán J. Screening of the USH1G gene among Spanish patients with Usher syndrome. Lack of mutations and evidence of a minor role in the pathogenesis of the syndrome. *Ophthalmic Genet.* 2007, 28:151-5.
- Aller E, Jaijo T, García-García G, Aparisi MJ, Blesa D, Díaz-Llopis M, Ayuso C, Millán JM: Identification of large rearrangements of the PCDH15 gene by combined MLPA and a CGH: large duplications are responsible for Usher syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010, 51:5480-5485.
- Aparisi MJ, García-García G, Jaijo T, Rodrigo R, Graziano C, Seri M, Simsek T, Simsek E, Bernal S, Baiget M, Pérez-Garrigues H, Aller E, Millán JM. Novel mutations in the USH1C gene in Usher syndrome patients. *Mol Vis.* 2010, 16:2948-54.
- Arden GB, Fox B. Increased incidence of abnormal nasal cilia in patients with retinitis pigmentosa. *Nature.* 1979, 279:534-6.
- Armengot M, Salom D, Diaz-Llopis M, Millan JM, Milara J, Mata M, Cortijo J. Nasal ciliary beat frequency and beat pattern in retinal ciliopathies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012a, 53:2076-9.

- Armengot M, Bonet M, Carda C, Gómez MJ, Milara J, Mata M, Cortijo J. Development and validation of a method of cilia motility analysis for the early diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2012b, 63:1-8.
- Astuto LM, Bork JM, Weston MD, Askew JW, Fields RR, Orten DJ, Ohliger SJ, Riazuddin S, Morell RJ, Khan S, Riazuddin S, Kremer H, van Hauwe P, Moller CG, Cremers CW, Ayuso C, Heckenlively JR, Rohrschneider K, Spandau U, Greenberg J, Ramesar R, Reardon W, Bitoun P, Millan J, Legge R, Friedman TB, Kimberling WJ. CDH23 mutation and phenotype heterogeneity: a profile of 107 diverse families with Usher syndrome and nonsyndromic deafness. *Am J Hum Genet.* 2002, 71:262-75.
- Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006, 7:125-48. Review.
- Bahloul A, Simmler MC, Michel V, Leibovici M, Perfettini I, Roux I, Weil D, Nouaille S, Zuo J, Zadro C, Licastro D, Gasparini P, Avan P, Hardelin JP, Petit C: Vezatin, an integral membrane protein of adherens junctions, is required for the sound resilience of cochlear hair cells. *EMBO Mol Med.* 2009, 1:125-38.
- Belguith H, Masmoudi S, Medlej-Hashim M, Chouery E, Weil D, Ayadi H, Petit C, Mégarbané A. Re-assigning the DFNB33 locus to chromosome 10p11.23-q21.1. *Eur J Hum Genet.* 2009, 17:122-4.
- Bhattacharya G, Kalluri R, Orten DJ, Kimberling WJ, Cosgrove D. A domain-specific usherin/collagen IV interaction may be required for stable integration into the basement membrane superstructure. *J Cell Sci.* 2004, 117:233-42.
- Becirovic E, Ebermann I, Nagy D, Zrenner E, Seeliger MW, Bolz HJ. Usher syndrome type 1 due to missense mutations on both CDH23 alleles: investigation of mRNA splicing. *Hum Mutat.* 2008, 29:452.
- Belguith H, Masmoudi S, Medlej-Hashim M, Chouery E, Weil D, Ayadi H, Petit C, Mégarbané A. Re-assigning the DFNB33 locus to chromosome 10p11.23-q21.1. *Eur J Hum Genet.* 2009, 17:122-4.
- Belyantseva IA, Boger ET, Naz S, Frolenkov GI, Sellers JR, Ahmed ZM, Griffith AJ, Friedman TB: Myosin-XVa is required for tip localization of whirlin and differential elongation of hair-cell stereocilia. *Nat Cell Biol.* 2005, 7:148-156.
- Ben-Yosef T, Ness SL, Madeo AC, Bar-Lev A, Wolfman JH, Ahmed ZM, Desnick RJ, Willner JP, Avraham KB, Ostrer H, Oddoux C, Griffith AJ, Friedman TB. A mutation

- of PCDH15 among Ashkenazi Jews with the type 1 Usher syndrome. *N Engl J Med.* 2003, 348:1664-70.
- Bernal S, Medà C, Solans T, Ayuso C, Garcia-Sandoval B, Valverde D, Del Rio E, Baiget M. Clinical and genetic studies in Spanish patients with Usher syndrome type II: description of new mutations and evidence for a lack of genotype--phenotype correlation. *Clin Genet.* 2005, 68:204-14.
  - Besnard T, Vaché C, Baux D, Larrieu L, Abadie C, Blanchet C, Odent S, Blanchet P, Calvas P, Hamel C, Dollfus H, Lina-Granade G, Lespinasse J, David A, Isidor B, Morin G, Malcolm S, Tuffery-Giraud S, Claustres M, Roux AF. Non-USH2A mutations in USH2 patients. *Hum Mutat.* 2012, 33:504-10.
  - Besnard T, García-García G, Baux D, Vaché C, Faugère V, Larrieu L, Léonard S, Millan JM, Malcolm S, Claustres M, Roux AF: Experience of targeted Usher exome sequencing as a clinical test. *Mol Genet Genomic Med.* 2014, 2:30-43.
  - Bitner-Glindzicz M, Lindley KJ, Rutland P, Blaydon D, Smith VV, Milla PJ, Hussain K, Furth-Lavi J, Cosgrove KE, Shepherd RM, Barnes PD, O'Brien R, Farndon PA, Sowden J, Liu XZ, Scanlan MJ, Malcom S, Dunne MJ, AYNsley-Green A, Glaser B. A recessive contiguous gene deletion causing infantile hyperinsulinism, enteropathy and deafness identifies the Usher type 1C gene. *Nature Genetics.* 2000, 26: 56-60.
  - Blaydon DC, Mueller RF, Hutchin TP, Leroy BP, Bhattacharya SS, Bird AC, Malcom S, Bitner-Glindzicz M. The contribution of USH1C mutations to syndromic and non-syndromic deafness in the UK. *Clinical Genetics.* 2003, 63: 303-307.
  - Boëda B, El-Amraoui A, Bahloul A, Goodyear R, Daviet L, Blanchard S, Perfettini I, Fath KR, Shorte S, Reiners J, Houdusse A, Legrain P, Wolfrum U, Richardson G, Petit C. Myosin VIIa, harmonin and cadherin 23, three Usher I gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle. *EMBO J.* 2002, 21:6689-99.
  - Bolz H, von Brederlow B, Ramírez A, Bryda EC, Kutsche K, Nothwang HG, Seeliger M, del C-Salcedó Cabrera M, Vila MC, Molina OP, Gal A, Kubisch, C. Mutation of CDH23, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nat Genet.* 2001, 27:108-12.
  - Bonneau D, Raymond F, Kremer C, Klossek JM, Kaplan J, Patte F. Usher syndrome type I associated with bronchiectasis and immotile nasal cilia in two brothers. *J Med Genet.* 1993, 30:253-254

- Bonnet C, Grati M, Marlin S, Levilliers J, Hardelin JP, Parodi M, Niasme-Grare M, Zelenika D, Délépine M, Feldmann D, Jonard L, El-Amraoui A, Weil D, Delobel B, Vincent C, Dollfus H, Eliot MM, David A, Calais C, Vigneron J, Montaut-Verient B, Bonneau D, Dubin J, Thauvin C, Duvillard A, Francannet C, Mom T, Lacombe D, Duriez F, Drouin-Garraud V, Thuillier-Obstoy MF, Sigaudy S, Frances AM, Collignon P, Challe G, Couderc R, Lathrop M, Sahel JA, Weissenbach J, Petit C, Denoyelle F. Complete exon sequencing of all known Usher syndrome genes greatly improves molecular diagnosis. *Orphanet J Rare Dis.* 2011, 6:21.
- Bork JM, Peters LM, Riazuddin S, Bernstein SL, Ahmed ZM, Ness SL, Polomeno R, Ramesh A, Schloss M, Srisailpathy CR, Wayne S, Bellman S, Desmukh D, Ahmed Z, Khan SN, Kaloustian VM, Li XC, Lalwani A, Riazuddin S, Bitner-Glindzicz M, Nance WE, Liu XZ, Wistow G, Smith RJ, Griffith AJ, Wilcox ER, Friedman TB, Morell RJ. Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23. *Am J Hum Genet.* 2001, 68:26-37.
- Bottillo I, De Luca A, Schirinzi A, Guida V, Torrente I, Calvieri S, Gervasini C, Larizza L, Pizzuti A, Dallapiccola B. Functional analysis of splicing mutations in exon 7 of NF1 gene. *BMC Med Genet.* 2007, 12:8:4.
- Boulouiz R, Li Y, Abidi O, Bolz H, Chafik A, Kubisch C, Roub H, Wollnik B, Barakat A. Analysis of MYO7A in a Moroccan family with Usher syndrome type 1B: novel loss-of-function mutation and non-pathogenicity of p.Y1719C. *Mol Vis.* 2007, 13:1862-5.
- Brownstein Z, Friedman LM, Shahin H, Oron-Karni V, Kol N, Abu Rayyan A, Parzefall T, Lev D, Shalev S, Frydman M, Davidov B, Shohat M, Rahile M, Lieberman S, Levy-Lahad E, Lee MK, Shomron N, King MC, Walsh T, Kanaan M, Avraham KB. Targeted genomic capture and massively parallel sequencing to identify genes for hereditary hearing loss in Middle Eastern families. *Genome Biol.* 2011, 12R89.
- Brown SD, Hardisty-Hughes RE, Mburu P. Quiet as a mouse: dissecting the molecular and genetic basis of hearing. *Nat Rev Genet.* 2008, 9:277-90.
- Chaib H, Place C, Salem N, Dodé C, Chardenoux S, Weissenbach J, el Zir E, Loiselet J, Petit C. Mapping of DFNB12, a gene for a non-syndromal autosomal recessive deafness, to chromosome 10q21-22. *Hum Mol Genet.* 1996, 5:1061-4.

- Chaïb H, Kaplan J, Gerber S, Vincent C, Ayadi H, Slim R, Munnich A, Weissenbach J, Petit C. A newly identified locus for Usher syndrome type I, USH1E, maps to chromosome 21q21. *Hum Mol Genet.* 1997, 6:27-31.
- Cohn E, Orten DJ, Weston M, Kimberling W, Cosgrove D. Nasal cytology will assist the diagnosis of specific Usher syndromes. *First International Symposium on Usher syndrome and related disorders*, Omaha, October 3 to 6, 2006. p 22.
- Collin RW, Safieh C, Littink KW, Shalev SA, Garzozzi HJ, Rizel L, Abbasi AH, Cremers FP, den Hollander AI, Klevering BJ, Ben-Yosef T. Mutations in C2ORF71 cause autosomal-recessive retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet.* 2010, 86:783–8.
- Corton M, Nishiguchi KM, Avila-Fernández A, Nikopoulos K, Riveiro-Alvarez R, Tatu SD, Ayuso C, Rivolta C. Exome sequencing of index patients with retinal dystrophies as a tool for molecular diagnosis. *PLoS One.* 2013, 8:e65574.
- Cosgrove D, Zallocchi M. Usher protein functions in hair cells and photoreceptors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014, 46:80-9.
- Cremers FP, Kimberling WJ, Külm M, de Brouwer AP, van Wijk E, te Brinke H, Cremers CW, Hoefsloot LH, Banfi S, Simonelli F, Fleischhauer JC, Berger W, Kelley PM, Haralambous E, Bitner-Glindzicz M, Webster AR, Saihan Z, De Baere E, Leroy BP, Silvestri G, McKay GJ, Koenekoop RK, Millan JM, Rosenberg T, Joensuu T, Sankila EM, Weil D, Weston MD, Wissinger B, Kremer H: Development of a genotyping microarray for Usher syndrome. *J Med Genet.* 2007, 44:153-60.
- Davenport SLH, Omenn GS. The heterogeneity of Usher Syndrome. Amsterdam Excerpta Media Foundation, *International Congress ser abstr.* 1977, 215:87–88.
- Delprat B, Michel V, Goodyear R, Yamasaki Y, Michalski N, El-Amraoui A, Perfettini I, Legrain P, Richardson G, Hardelin JP, Petit C: Myosin XVa and whirlin, two deafness gene products required for hair bundle growth, are located at the stereocilia tips and interact directly. *Hum Mol Genet.* 2005, 14:401-10.
- Di Palma F, Holme RH, Bryda EC, Belyantseva IA, Pellegrino R, Kachar B, Steel KP, Noben-Trauth K. Mutations in Cdh23, encoding a new type of cadherin, cause stereocilia disorganization in waltzer, the mouse model for Usher syndrome type 1D. *Nat Genet.* 2001, 27:103-7.

- Ebermann I, Scholl HP, Charbel Issa P, Becirovic E, Lamprecht J, Jurklics B, Millán JM, Aller E, Mitter D, Bolz H. A novel gene for Usher syndrome type 2: mutations in the long isoform of whirlin are associated with retinitis pigmentosa and sensorineural hearing loss. *Hum Genet.* 2007a, 121:203-11.
- Ebermann I, Lopez I, Bitner-Glindzicz M, Brown C, Koenekoop RK, Bolz HJ. Deafblindness in French Canadians from Quebec: a predominant founder mutation in the USH1C gene provides the first genetic link with the Acadian population. *Genome Biology.* 2007b, 8:R47.
- Ebermann I, Phillips JB, Liebau MC, Koenekoop RK, Schermer B, Lopez I, Schäfer E, Roux AF, Dafinger C, Bernd A, Zrenner E, Claustres M, Blanco B, Nürnberg G, Nürnberg P, Ruland R, Westerfield M, Benzing T, Bolz HJ: PDZD7 is a modifier of retinal disease and a contributor to digenic Usher syndrome. *J Clin Invest.* 2010, 120:1812-23.
- Eisenberger T, Neuhaus C, Khan AO, Decker C, Preising MN, Friedburg C, Bieg A, Gliem M, Charbel Issa P, Holz FG, Baig SM, Hellenbroich Y, Galvez A, Platzer K, Wollnik B, Laddach N, Ghaffari SR, Rafati M, Botzenhart E, Tinschert S, Börger D, Bohring A, Schreml J, Körtge-Jung S, Schell-Apacic C, Bakur K, Al-Aama JY, Neuhann T, Herkenrath P, Nürnberg G, Nürnberg P, Davis JS, Gal A, Bergmann C, Lorenz B, Bolz HJ. Increasing the yield in targeted next-generation sequencing by implicating CNV analysis, non-coding exons and the overall variant load: the example of retinal dystrophies. *PLoS One.* 2013, 8:e78496.
- El-Amraoui A, Petit C. Cadherins as targets for genetic diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010, 2:a003095.
- El-Amraoui A, Petit C. The retinal phenotype of Usher syndrome: pathophysiological insights from animal models. *C R Biol.* 2014, 337:167-77.
- Ernest S, Rauch GJ, Haffter P, Geisler R, Petit C, Nicolson T. Mariner is defective in myosin VIIA: a zebrafish model for human hereditary deafness. *Hum Mol Genet.* 2000, 9:2189-96.
- Espinos C, Millan JM, Beneyto M, Najera C. Epidemiology of Usher syndrome in Valencia and Spain. *Community Genet.* 1998, 1:223-8.
- Eudy JD, Weston MD, Yao S, Hoover DM, Rehm HL, Ma-Edmonds M, Yan D, Ahmad I, Cheng JJ, Ayuso C, Cremers C, Davenport S, Moller C, Talmadge CB, Beisel KW, Tamayo M, Morton CC, Swaroop A, Kimberling WJ, Sumegi J. Mutation

- of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa. *Science*. 1998, 280:1753-7.
- Fox B, Bull TB, Arden GB. Variations in the ultrastructure of human nasal cilia including abnormalities found in retinitis pigmentosa. *J Clin Pathol*. 1980, 33:327-35.
  - Fu Q, Wang F, Wang H, Xu F, Zaneveld JE, Ren H, Keser V, Lopez I, Tuan HF, Salvo JS, Wang X, Zhao L, Wang K, Li Y, Koenekoop RK, Chen R, Sui R: Next-generation sequencing-based molecular diagnosis of a Chinese patient cohort with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013, 54:4158-66.
  - Garcia-Garcia G, Aparisi MJ, Jaijo T, Rodrigo R, Leon AM, Avila-Fernandez A, Blanco-Kelly F, Bernal S, Navarro R, Diaz-Llopis M, Baiget M, Ayuso C, Millan JM, Aller E. Mutational screening of the USH2A gene in Spanish USH patients reveals 23 novel pathogenic mutations. *Orphanet J Rare Dis*. 2011, 6:65.
  - García-García G, Besnard T, Baux D, Vaché C, Aller E, Malcolm S, Claustres M, Millan JM, Roux AF. The contribution of GPR98 and DFNB31 genes to a Spanish Usher syndrome type 2 cohort. *Mol Vis*. 2013, 19:367-73.
  - García-García G, Aller E, Jaijo T, Aparisi MJ, Larrieu L, Faugère V, Blanco-Kelly F, Ayuso C, Roux AF, Millán JM. Novel deletions involving the USH2A gene in patients with Usher syndrome and retinitis pigmentosa. *Molecular Vision* 2014, 20:1398 -1410
  - Geller SF, Guerin KI, Visel M, Pham A, Lee ES, Dror AA, Avraham KB, Hayashi T, Ray CA, Reh TA, Bermingham-McDonogh O, Triffo WJ, Bao S, Isosomppi J, Västinsalo H, Sankila EM, Flannery JG. CLRN1 is nonessential in the mouse retina but is required for cochlear hair cell development. *PLoS Genet*. 2009, 5:e1000607.
  - Geng R, Melki S, Chen DH, Tian G, Furness DN, Oshima-Takago T, Neef J, Moser T, Askew C, Horwitz G, Holt JR, Imanishi Y, Alagramam KN. The mechanosensory structure of the hair cell requires clarin-1, a protein encoded by Usher syndrome III causative gene. *J Neurosci*. 2012, 32:9485-98.
  - Gerber S, Bonneau D, Gilbert B, Munnich A, Dufier JL, Rozet JM, Kaplan J. USH1A: chronicle of a slow death. *Am J Hum Genet*. 2006, 78:357-9.
  - Gibson F, Walsh J, Mburu P, Varela A, Brown KA, Antonio M, Beisel KW, Steel KP, Brown SD. A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1. *Nature*. 1995, 374:62-4.



- Gillespie PG, Müller U. Mechanotransduction by hair cells: models, molecules, and mechanisms. *Cell*. 2009, 139:33-44.
- Glöckle N, Kohl S, Mohr J, Scheurenbrand T, Sprecher A, Weissschuh N, Bernd A, Rudolph G, Schubach M, Poloschek C, Zrenner E, Biskup S, Berger W, Wissinger B, Neidhardt J. Panel-based next generation sequencing as a reliable and efficient technique to detect mutations in unselected patients with retinal dystrophies. *Eur J Hum Genet*. 2014, 22:99-104.
- Goldmann T, Overlack N, Möller F, Belakhov V, van Wyk M, Baasov T, Wolfrum U, Nagel-Wolfrum K. A comparative evaluation of NB30, NB54 and PTC124 in translational read-through efficacy for treatment of an USH1C nonsense mutation. *EMBO Mol Med*. 2012, 4:1186-99.
- Grati M, Shin JB, Weston MD, Green J, Bhat MA, Gillespie PG, Kachar B: Localization of PDZD7 to the stereocilia ankle-link associates this scaffolding protein with the Usher syndrome protein network. *J Neurosci* 2012, 32:14288-14293.
- Hashimoto T, Gibbs D, Lillo C, Azarian SM, Legacki E, Zhang XM, Yang XJ, Williams DS. Lentiviral gene replacement therapy of retinas in a mouse model for Usher syndrome type 1B. *Gene Ther*. 2007, 14:584-94.
- Heissler SM, Manstein DJ. Functional characterization of the human myosin-7a motor domain. *Cell Mol Life Sci*. 2012, 69:299-311.
- Held N, Smits BM, Gockeln R, Schubert S, Nave H, Northrup E, Cuppen E, Hedrich HJ, Wedekind D. A mutation in Myo15 leads to Usher-like symptoms in LEW/Ztm-ci2 rats. *PLoS One*. 2011, 6:e15669.
- Hilgert N, Kahrizi K, Dieltjens N, Bazazzadegan N, Najmabadi H, Smith RJ, Van Camp G. A large deletion in GPR98 causes type IIC Usher syndrome in male and female members of an Iranian family. *J Med Genet*. 2009, 46:272-6.
- Houdayer C, Dehainault C, Mattler C, Michaux D, Caux-Moncoutier V, Pagès-Berhouet S, d'Enghien CD, Laugé A, Castera L, Gauthier-Villars M, Stoppa-Lyonnet D. Evaluation of in silico splice tools for decision-making in molecular diagnosis. *Hum Mutat*. 2008, 29:975-82.
- Hunter DG, Fishman GA, Mehta RS, Kretzer FL. Abnormal sperm and photoreceptor axonemes in Usher's syndrome. *Arch Ophthalmol*. 1986, 104:385-9.

- Hunter DG, Fishman GA, Kretzer FL. Abnormal axonemes in X-linked retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*. 1988, 106:362-8.
- Jaijo T, Aller E, Oltra S, Beneyto M, Nájera C, Ayuso C, Baiget M, Carballo M, Antiñolo G, Valverde D, Moreno F, Vilela C, Perez-Garrigues H, Navea A, Millán JM. Mutation profile of the MYO7A gene in Spanish patients with Usher syndrome type I. *Hum Mutat*. 2006, 27:290-1.
- Jaijo T, Aller E, Beneyto M, Najera C, Graziano C, Turchetti D, Seri M, Ayuso C, Baiget M, Moreno F, Morera C, Perez-Garrigues H, Millan JM MYO7A mutation screening in Usher syndrome type I patients from diverse origins. *J Med Genet*. 2007, 44:e71.
- Jaijo T, Aller E, García-García G, Aparisi MJ, Bernal S, Avila-Fernández A, Barragán I, Baiget M, Ayuso C, Antiñolo G, Díaz-Llopis M, Külm M, Beneyto M, Nájera C, Millán JM: Microarray-based mutation analysis of 183 Spanish families with Usher syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010, 51:1311-1317.
- Jaijo T, Aller E, Aparisi MJ, García-García G, Hernan I, Gamundi MJ, Nájera C, Carballo M, Millán JM. Functional analysis of splicing mutations in MYO7A and USH2A genes. *Clin Genet*. 2011, 79:282-8.
- Jaijo T, Oshima A, Aller E, Carney C, Usami S, Millán JM, Kimberling WJ. Mutation screening of the PCDH15 gene in Spanish patients with Usher syndrome type I. *Mol Vis*. 2012, 18:1719-26.
- Jain PK, Lalwani AK, Li XC, Singleton TL, Smith TN, Chen A, Deshmukh D, Verma IC, Smith RJ, Wilcox ER. A gene for recessive nonsyndromic sensorineural deafness (DFNB18) maps to the chromosomal region 11p14-p15.1 containing the Usher syndrome type 1C gene. *Genomics*. 1998, 50:290-2.
- Jaworek TJ, Bhatti R, Latief N, Khan SN, Riazuddin S, Ahmed ZM. USH1K, a novel locus for type I Usher syndrome, maps to chromosome 10p11.21-q21.1. *J Hum Genet*. 2012, 57:633-7.
- Joensuu T, Hämäläinen R, Yuan B, Johnson C, Tegelberg S, Gasparini P, Zelante L, Pirvola U, Pakarinen L, Lehesjoki AE, de la Chapelle A, Sankila EM. Mutations in a novel gene with transmembrane domains underlie Usher syndrome type 3. *Am J Hum Genet*. 2001, 69:673-84.

- Joensuu T. Positional cloning of the Usher syndrome type III gene (USH3). Doctoral Thesis. Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine. University of Helsinki. 2002.
- Johnson KR, Gagnon LH, Webb LS, Peters LL, Hawes NL, Chang B, Zheng QY. Mouse models of USH1C and DFNB18: phenotypic and molecular analyses of two new spontaneous mutations of the Ush1c gene. *Hum Mol Genet.* 2003, 12:3075-86.
- Khateb S, Zelinger L, Ben-Yosef T, Merin S, Crystal-Shalit O, Gross M, Banin E, Sharon D. Exome sequencing identifies a founder frameshift mutation in an alternative exon of USH1C as the cause of autosomal recessive retinitis pigmentosa with late-onset hearing loss. *PLoS One.* 2012, 7:e51566.
- Khanna H, Davi, EE, Murga-Zamalloa CA, Estrada-Cuzcano A, Lopez I, den Hollander AI, Zonneveld MN, Othman MI, Waseem N, Chakarova CF, Maubaret C, Diaz-Font A, Macdonald I, Muzny DM, Wheeler DA, Morgan M, Lewis LR, Logan CV, Tan PL, Beer MA, Inglehearn CF, Lewis RA, Jacobson SG, Bergmann C, Beales PL, Attié-Bitach T, Johnson CA, Otto EA, Bhattacharya SS, Hildebrandt F, Gibbs RA, Koenekoop RK, Swaroop A, Katsanis N. A common allele in RPGRIP1L is a modifier of retinal degeneration in ciliopathies. *Nat Genet.* 2009, 41:739-45.
- Khateb S, Zelinger L, Mizrahi-Meissonnier L, Ayuso C, Koenekoop RK, Laxer U, Gross M, Banin E, Sharon D. A homozygous nonsense CEP250 mutation combined with a heterozygous nonsense C2orf71 mutation is associated with atypical Usher syndrome. *J Med Genet.* 2014, 51:460-9.
- Kazmierczak P, Sakaguchi H, Tokita J, Wilson-Kubalek EM, Milligan RA, Müller U, Kachar B: Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. *Nature.* 2007, 449:87-91.
- Kelley PM, Weston MD, Chen ZY, Orten DJ, Hasson T, Overbeck LD, Pinnt J, Talmadge CB, Ing P, Mooseker MS, Corey D, Sumegi J, Kimberling WJ. The genomic structure of the gene defective in Usher syndrome type Ib (MYO7A). *Genomics.* 1997, 40:73-9.
- Kikkawa Y, Shitara H, Wakana S, Kohara Y, Takada T, Okamoto M, Taya C, Kamiya K, Yoshikawa Y, Tokano H, Kitamura K, Shimizu K, Wakabayashi Y, Shiroishi T, Kominami R, Yonekawa H. Mutations in a new scaffold protein Sans cause deafness in Jackson shaker mice. *Hum Mol Genet.* 2003, 12:453-61.

- Kimberling WJ, Möller CG, Davenport S, Priluck IA, Beighton PH, Greenberg J, Reardon W, Weston MD, Kenyon JB, Grunkemeyer JA, et al. Linkage of Usher syndrome type I gene (USH1B) to the long arm of chromosome 11. *Genomics*. 1992, 14:988-94.
- Kimberling WJ, Weston MD, Möller C, van Aarem Cremers CWRJ, Sumegi J, Ing PS, Connolly C, Martini A, Milani M, Tamayo ML, Bernal J, Greenberg J, Ayuso, C. Gene mapping of Usher syndrome type IIa: localization of the gene to a 2.1 –cM segment on chromosome 1q41. *Am J Human Genet*. 1995, 56:216-223.
- Krawitz PM, Schiska D, Krüger U, Appelt S, Heinrich V, Parkhomchuk D, Timmermann B, Millan JM, Robinson PN, Mundlos S, Hecht J, Gross M. Screening for single nucleotide variants, small indels and exon deletions with a next-generation sequencing based gene panel approach for Usher syndrome. *Mol Genet Genomic Med*. 2014, 2:393-401.
- Kremer H, Wijk van E, Märker T, Wolfrum U, Roepman R. Usher syndrome:molecular links of pathogenesis, proteins and pathway. *Human Molecular Genetics*. 2006, 15.
- Küssel-Andermann P, El-Amraoui A, Safieddine S, Nouaille S, Perfettini I, Lecuit M, Cossart P, Wolfrum U, Petit C. Vezatin, a novel transmembrane protein, bridges myosin VIIA to the cadherin-catenins complex. *EMBO J*. 2000, 19:6020-9.
- Le Guédard S, Faugère V, Malcolm S, Claustres M, Roux AF. Large genomic rearrangements within the PCDH15 gene are a significant cause of USH1F syndrome. *Mol Vis*. 2007, 13:102-7.
- Le Guédard-Méreuze S, Vaché C, Baux D, Faugère V, Larrieu L, Abadie C, Janecke A, Claustres M, Roux AF, Tuffery-Giraud S. *Ex vivo* splicing assays of mutations at noncanonical positions of splice sites in USHER genes. *Hum Mutat*. 2010, 31:347-55.
- Le Quesne Stabej P, Saihan Z, Rangesh N, Steele-Stallard HB, Ambrose J, Coffey A, Emmerson J, Haralambous E, Hughes Y, Steel KP, Luxon LM, Webster AR, Bitner-Glindzicz M. Comprehensive sequence analysis of nine Usher syndrome genes in the UK National Collaborative Usher Study. *J Med Genet*. 2012, 49:27-36.
- Lentz J, Savas S, Ng SS, Athas G, Deininger P, Keats B. The USH1C 216G-->A splice-site mutation results in a 35-base-pair deletion. *Hum Genet*. 2005, 116, 225-7.

- 
- Lentz JJ, Gordon WC, Farris HE, MacDonald GH, Cunningham DE, Robbins CA, Tempel BL, Bazan NG, Rubel EW, Oesterle EC, Keats BJ. Deafness and retinal degeneration in a novel USH1C knock-in mouse model. *Dev Neurobiol.* 2010, 70:253-67.
  - Lentz JJ, Jodelka FM, Hinrich AJ, McCaffrey KE, Farris HE, Spalitta MJ, Bazan NG, Duelli DM, Rigo F, Hastings ML. Rescue of hearing and vestibular function by antisense oligonucleotides in a mouse model of human deafness. *Nat Med.* 2013, 19:345-50.
  - Licastro D, Mutarelli M, Peluso I, Neveling K, Wieskamp N, Rispoli R, Vozzi D, Athanasakis E, D'Eustacchio A, Pizzo M, D'Amico F, Ziviello C, Simonelli F, Fabretto A, Scheffer H, Gasparini P, Banfi S, Nigro V: Molecular diagnosis of Usher syndrome: application of two different next generation sequencing-based procedures. *PLoS One.* 2012, 7:e43799.
  - Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol.* 2012, 2012:251364.
  - Liu X, Udovichenko IP, Brown SD, Steel KP, Williams DS. Myosin VIIa participates in opsin transport through the photoreceptor cilium. *J Neurosci.* 1999, 19:6267-74.
  - Liu X, Bulgakov OV, Darrow KN, Pawlyk B, Adamian M, Liberman MC, Li T. Usherin is required for maintenance of retinal photoreceptors and normal development of cochlear hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007, 104:4413-8.
  - Liu XZ, Walsh J, Tamagawa Y, Kitamura K, Nishizawa M, Steel KP, Brown SD. Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. *Nat Genet.* 1997a, 17:268-9.
  - Liu XZ, Walsh J, Mburu P, Kendrick-Jones J, Cope MJ, Steel KP, Brown SD. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet.* 1997b, 16:188-90.
  - Liu XZ, Hope C, Walsh J, Newton V, Ke XM, Liang CY, Xu LR, Zhou JM, Trump D, Steel KP, Bunday S, Brown SD. Mutations in the myosin VIIA gene cause a wide phenotypic spectrum, including atypical Usher syndrome. *Am J Hum Genet.* 1998, 63:909-12.

- Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, Pallen MJ. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol.* 2012, 30:434-9.
- Lu ZX, Peng J, Su B. A human-specific mutation leads to the origin of a novel splice form of neuropsin (KLK8), a gene involved in learning and memory. *Hum Mutat.* 2007, 28:978-984.
- Maerker T, Wijk EV, Overlack N, Kersten FF, McGee J, Goldmann T, Sehn E, Roepman R, Walsh EJ, Kremer H, Wolfrum U. A novel Usher protein network at the periciliary reloading point between molecular transport machineries in vertebrate photoreceptor cells. *Hum. Mol. Genet.* 2008, 17:71-86.
- Malm E, Ponjavic V, Möller C, Kimberling WJ, Stone ES, Andréasson S. Alteration of rod and cone function in children with Usher syndrome. *Eur J Ophthalmol.* 2011, 21:30-8.
- Manor U, Disanza A, Grati M, Andrade L, Lin H, Di Fiore PP, Scita G, Kachar B. Regulation of stereocilia length by myosin XVa and whirlin depends on the actin-regulatory protein Eps8. *Curr Biol.* 2011, 21:167-72.
- Martin DM, Raphael Y. Have you heard? Viral-mediated gene therapy restores hearing. *Neuron.* 2012, 75:188-90.
- Mata M, Lluch-Estellés J, Armengot M, Sarrión I, Carda C, Cortijo J. New adenylate kinase 7 (AK7) mutation in primary ciliary dyskinesia. *Am J Rhinol Allergy.* 2012a, 26:260-4.
- Mata M, Sarrion I, Armengot M, Carda C, Martinez I, Melero JA, Cortijo J. Respiratory syncytial virus inhibits ciliogenesis in differentiated normal human bronchial epithelial cells: effectiveness of N-acetylcysteine. *PLoS One.* 2012b, 7:e48037.
- Mburu P, Mustapha M, Varela A, Weil D, El-Amraoui A, Holme RH, Rump A, Hardisty RE, Blanchard S, Coimbra RS, Perfettini I, Parkinson N, Mallon AM, Glenister P, Rogers MJ, Paige AJ, Moir L, Clay J, Rosenthal A, Liu XZ, Blanco G, Steel KP, Petit C, Brown SD. Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31. *Nat Genet.* 2003, 34:421-8.

- McGee J, Goodyear RJ, McMillan DR, Stauffer EA, Holt JR, Locke KG, Birch DG, Legan PK, White PC, Walsh EJ, Richardson GP. The very large G-protein-coupled receptor VLRG1: a component of the ankle link complex required for the normal development of auditory hair bundles. *J Neurosci.* 2006, 26:6543-53.
- McMillan DR, Kayes-Wandover KM, Richardson JA, White PC. Very large G protein-coupled receptor-1, the largest known cell surface protein, is highly expressed in the developing central nervous system. *J Biol Chem.* 2002, 277:785-92.
- Millán JM, Aller E, Jaijo T, Blanco-Kelly F, Gimenez-Pardo A, Ayuso C: An update on the genetics of Usher syndrome. *J Ophthalmol.* 2011, 2011:417217.
- Michalski N, Michel V, Bahloul A, Lefèvre G, Barral J, Yagi H, Chardenoux S, Weil D, Martin P, Hardelin JP, Sato M, Petit C. Molecular characterization of the ankle-link complex in cochlear hair cells and its role in the hair bundle functioning. *J Neurosci.* 2007, 27:6478-88.
- Mustapha M, Chouery E, Torchard-Pagnez D, Nouaille S, Khrais A, Sayegh FN, Mégarbané A, Loiselet J, Lathrop M, Petit C, Weil D. A novel locus for Usher syndrome type I, USH1G, maps to chromosome 17q24-25. *Hum Genet.* 2002a, 110:348-50.
- Mustapha M, Chouery E, Chardenoux S, Naboulsi M, Paronnaud J, Lemainque A, Mégarbané A, Loiselet J, Weil D, Lathrop M, Petit C. DFNB31, a recessive form of sensorineural hearing loss, maps to chromosome 9q32-34. *Eur J Hum Genet.* 2002b, 10:210-2.
- Mutai H, Suzuki N, Shimizu A, Torii C, Namba K, Morimoto N, Kudoh J, Kaga K, Kosaki K, Matsunaga T: Diverse spectrum of rare deafness genes underlies early-childhood hearing loss in Japanese patients: a cross-sectional, multi-center next-generation sequencing study. *Orphanet J Rare Dis.* 2013, 8:172.
- Nagel-Wolfrum K, Baasov T, Wolfrum U. Therapy strategies for Usher syndrome Type 1C in the retina. *Adv Exp Med Biol.* 2014, 801:741-7.
- Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hotta Y, Mizuta K, Mineta H, Minoshima S. Hair roots as an mRNA source for mutation analysis of Usher syndrome-causing genes. *J Hum Genet.* 2010, 55:701-3.
- Ness SL, Ben-Yosef T, Bar-Lev A, Madeo AC, Brewer CC, Avraham KB, Kornreich R, Desnick RJ, Willner JP, Friedman TB, Griffith AJ. Genetic homogeneity and

- phenotypic variability among Ashkenazi Jews with Usher syndrome type III. *J Med Genet.* 2003, 40:767-72.
- Nishimura DY, Baye LM, Perveen R, Searby CC, Avila-Fernandez A, Pereiro I, Ayuso C, Valverde D, Bishop PN, Manson FD, Urquhart J, Stone EM, Slusarski DC, Black GC, Sheffield VC. Discovery and functional analysis of a retinitis pigmentosa gene, C2ORF71. *Am J Hum Genet* 2010, 86:686–95.
  - Ogun O, Zallocchi M. Clarin-1 acts as a modulator of mechanotransduction activity and presynaptic ribbon assembly. *J Cell Biol.* 2014, 207:375-391.
  - Ouyang XM, Hejtmancik JF, Jacobson SG, Xia XJ, Li A, Du LL, Newton V, Kaiser M, Balkany T, Nance WE, Liu XZ. *USH1C*: a rare cause of *USH1* in a non-Acadian population and a founder effect of the Acadian allele. *Clinical Genetics.* 2003, 63:150-153.
  - Ouyang XM, Yan D, Du LL, Hejtmancik JF, Jacobson SG, Nance WE, Li AR, Angeli S, Kaiser M, Newton V, Brown SD, Balkany T, Liu XZ. Characterization of Usher syndrome type I gene mutations in an Usher syndrome patient population. *Human Genetics.* 2005, 116:292-299.
  - Oshima A, Jaijo T, Aller E, Millan JM, Carney C, Usami S, Moller C, Kimberling WJ. Mutation profile of the *CDH23* gene in 56 probands with Usher syndrome type I. *Hum Mutat.* 2008, 29:E37-46.
  - Overlack N, Goldmann T, Wolfrum U, Nagel-Wolfrum K. Gene repair of an Usher syndrome causing mutation by zinc-finger nuclease mediated homologous recombination. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012, 53:4140-6.
  - Pan L, Zhang M. Structures of usher syndrome 1 proteins and their complexes. *Physiology (Bethesda).* 2012, 27:25-42.
  - Petit C. Usher syndrome: from genetics to pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2001, 2:271-97.
  - Piatti G, De Santi MM, Brogi M, Castorina P, Ambrosetti U. Emerging ciliopathies: are respiratory cilia compromised in Usher syndrome? *Am J Otolaryngol.* 2014, 35:340-6.



- Pieke-Dahl S, Möller CG, Kelley PM, Astuto LM, Cremers CW, Gorin MB, Kimberling WJ. Genetic heterogeneity of Usher syndrome type II: localisation to chromosome 5q. *J Med Genet.* 2000, 37:256-62.
- Phillips JB, Blanco-Sanchez B, Lentz JJ, Tallafuss A, Khanobdee K, Sampath S, Jacobs ZG, Han PF, Mishra M, Titus TA, Williams DS, Keats BJ, Washbourne P, Westerfield M. Harmonin (Ush1c) is required in zebrafish Müller glial cells for photoreceptor synaptic development and function. *Dis Model Mech.* 2011, 4:786-800.
- Phillips JB, Västinsalo H, Wegner J, Clément A, Sankila EM, Westerfield M. The cone-dominant retina and the inner ear of zebrafish express the ortholog of CLRN1, the causative gene of human Usher syndrome type 3A. *Gene Expr Patterns.* 2013, 13:473-81.
- Puffenberger EG, Jinks RN, Sougnez C, Cibulskis K, Willert RA, Achilly NP, Cassidy RP, Fiorentini CJ, Heiken KF, Lawrence JJ, Mahoney MH, Miller CJ, Nair DT, Politi KA, Worcester KN, Setton RA, Dipiazza R, Sherman EA, Eastman JT, Francklyn C, Robey-Bond S, Rider NL, Gabriel S, Morton DH, Strauss KA: Genetic mapping and exome sequencing identify variants associated with five novel diseases. *PLoS One.* 2012, 7:e28936.
- Qu LH, Jin X, Xu HW, Li SY, Yin ZQ. Detecting novel genetic mutations in Chinese Usher syndrome families using next-generation sequencing technology. *Mol Genet Genomics.* 2014, [Epub ahead of print]
- Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, Bertoni A, Swerdlow HP, Gu Y. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics.* 2012, 13:341.
- Rebeh IB, Yoshimi N, Hadj-Kacem H, Yanohco S, Hammami B, Mnif M, Araki M, Ghorbel A, Ayadi H, Masmoudi S, Miyazaki H. Two missense mutations in SLC26A4 gene: a molecular and functional study. *Clin Genet.* 2010, 78:74-80.
- Reddy R, Fahiminiya S, El Zir E, Mansour A, Megarbane A, Majewski J, Slim R. Molecular genetics of the usher syndrome in Lebanon: identification of 11 novel protein truncating mutations by whole exome sequencing. *PLoS One.* 2014, 9:e107326.
- Reiners J, Reidel B, El-Amraoui A, Boëda B, Huber I, Petit C, Wolfrum U. Differential distribution of harmonin isoforms and their possible role in Usher-1

- protein complexes in mammalian photoreceptor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003, 44:5006-15.
- Reiners J, van Wijk E, Marker, T, Zimmermann U, Jurgens K, te Brinke H, Overlack N, Roepman R, Knipper M, Kremer H, Wolfrum U. Scaffold protein harmonin (USH1C) provides molecular links between Usher syndrome type 1 and type 2. *Hum. Mol. Genet.* 2005, 14:3933-43.
  - Riazuddin S, Belyantseva IA, Giese AP, Lee K, Indzhykulian AA, Nandamuri SP, Yousaf R, Sinha GP, Lee S, Terrell D, Hegde RS, Ali RA, Anwar S, Andrade-Elizondo PB, Sirmaci A, Parise LV, Basit S, Wali A, Ayub M, Ansar M, Ahmad W, Khan SN, Akram J, Tekin M, Riazuddin S, Cook T, Buschbeck EK, Frolenkov GI, Leal SM, Friedman TB, Ahmed ZM: Alterations of the CIB2 calcium- and integrin-binding protein cause Usher syndrome type 1J and nonsyndromic deafness DFNB48. *Nat Genet.* 2012, 44:1265-71.
  - Rivolta C, Sweklo EA, Berson EL, Dryja TP. Missense mutation in the USH2A gene: association with recessive retinitis pigmentosa without hearing loss. *Am J Hum Genet.* 2000, 66:1975-8.
  - Rong W, Chen X, Zhao K, Liu Y, Liu X, Ha S, Liu W, Kang X, Sheng X, Zhao C. Novel and recurrent MYO7A mutations in Usher syndrome type 1 and type 2. *PLoS One.* 2014, 9:e97808.
  - Rosenberg T, Haim M, Hauch AM, Parving A. The prevalence of Usher syndrome and other retinal dystrophy-hearing impairment associations. *Clin. Genet.* 1997, 51:314-21.
  - Roth Y, Kronenberg J. Nasal ciliary motility in retinitis pigmentosa. *Auris Nasus Larynx.* 1992, 19:275-7.
  - Roux AF, Faugère V, Le Guédard S, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Chambert S, Marlin S, Hamel C, Gilbert B, Malcolm S, Claustres M, French Usher Syndrome Collaboration. Survey of the frequency of USH1 gene mutations in a cohort of Usher patients shows the importance of cadherin 23 and protocadherin 15 genes and establishes a detection rate of above 90%. *J Med Genet.* 2006, 43:763-8.
  - Roux AF, Faugère V, Vaché C, Baux D, Besnard T, Léonard S, Blanchet C, Hamel C, Mondain M, Gilbert-Dussardier B, Edery P, Lacombe D, Bonneau D, Holder-Espinasse M, Ambrosetti U, Journel H, David A, Lina-Granade G, Malcolm S, Claustres M. Four-year follow-up of diagnostic service in USH1 patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011, 52:4063-71.

- Sahly I, Dufour E, Schietroma C, Michel V, Bahloul A, Perfettini I, Pepermans E, Estivalet A, Carette D, Aghaie A, Ebermann I, Lelli A, Iribarne M, Hardelin JP, Weil D, Sahel JA, El-Amraoui A, Petit C. Localization of Usher 1 proteins to the photoreceptor calyceal processes, which are absent from mice. *J Cell Biol.* 2012, 199:381-99.
- Saihan Z, Stabej Ple Q, Robson AG, Rangesh N, Holder GE, Moore AT, Steel KP, Luxon LM, Bitner-Glindzicz M, Webster AR. Mutations in the USH1C gene associated with sector retinitis pigmentosa and hearing loss. *Retina.* 2011, 31:1708-16.
- Sankila EM, Pakarinen L, Kääriäinen H, Aittomäki K, Karjalainen S, Sistonen P, de la Chapelle A. Assignment of an Usher syndrome type III (USH3) gene to chromosome 3q. *Hum Mol Genet.* 1995, 4:93-8.
- Savas S, Frischhertz B, Pelias MZ, Batzer MA, Deininger PL, Keats BJB. The USH1C 216G->A mutation and the 9-repeat VNTR(t,t) allele are in complete linkage disequilibrium in the Acadian population. *Human Genetics.* 2002, 110:95-97.
- Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet.* 2010, 19:R227-40.
- Seiler C, Finger-Baier KC, Rinner O, Makhankov YV, Schwarz H, Neuhaus SC, Nicolson T. Duplicated genes with split functions: independent roles of protocadherin15 orthologues in zebrafish hearing and vision. *Development.* 2005, 132:615-23.
- Shahzad M, Sivakumaran TA, Qaiser TA, Schultz JM, Hussain Z, Flanagan M, Bhinder MA, Kissell D, Greinwald JH Jr, Khan SN, Friedman TB, Zhang K, Riazuddin S, Riazuddin S, Ahmed ZM. Genetic analysis through OtoSeq of Pakistani families segregating prelingual hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013, 149:478-87.
- Shearer AE, DeLuca AP, Hildebrand MS, Taylor KR, Gurrola J 2nd, Scherer S, Scheetz TE, Smith RJ. Comprehensive genetic testing for hereditary hearing loss using massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010, 107:21104-9.
- Simsek T, Ozdamar Y, Simsek E, Men G. Usher Syndrome Associated With a Variant of Dandy-Walker Malformation. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 2010, 47 Online:e1-4.

- Smith RJ, Pelias MZ, Daiger SP, Keats B, Kimberling W, Hejtmancik JF. Clinical variability and genetic heterogeneity within the Acadian Usher population. *Am J Med Genet.* 1992,43:964-969.
- Söllner C, Rauch GJ, Siemens J, Geisler R, Schuster SC, Müller U, Nicolson T; Tübingen 2000 Screen Consortium. Mutations in cadherin 23 affect tip links in zebrafish sensory hair cells. *Nature.* 2004, 428:955-9.
- Spandau UH, Rohrschneider K. Prevalence and geographical distribution of Usher syndrome in Germany. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2002, 240:495-498.
- Steele-Stallard HB, Le Quesne Stabej P, Lenassi E, Luxon LM, Claustres M, Roux AF, Webster AR, Bitner-Glindzicz M: Screening for duplications, deletions and a common intronic mutation detects 35% of second mutations in patients with USH2A monoallelic mutations on Sanger sequencing. *Orphanet J Rare Dis.* 2013, 8:122.
- Sulonen AM, Ellonen P, Almusa H, Lepistö M, Eldfors S, Hannula S, Miettinen T, Tyyntismä H, Salo P, Heckman C, Joensuu H, Raivio T, Suomalainen A, Saarela J. Comparison of solution-based exome capture methods for next generation sequencing. *Genome Biol.* 2011, 12:R94.
- Tao W. Application of encapsulated cell technology for retinal degenerative diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 2006, 6:717-26.
- Tran VK, Takeshima Y, Zhang Z, Yagi M, Nishiyama A, Habara Y, Matsuo M. Splicing analysis disclosed a determinant single nucleotide for exon skipping caused by a novel intraexonic four-nucleotide deletion in the dystrophin gene. *J Med Genet.* 2006, 43:924-930.
- Tucker BA, Mullins RF, Streb LM, Anfinson K, Eyestone ME, Kaalberg E, Riker MJ, Drack AV, Braun TA, Stone EM. Patient-specific iPSC-derived photoreceptor precursor cells as a means to investigate retinitis pigmentosa. *Elife.* 2013, 2:e00824.
- Usher CH. Bowman's lecture: On a few hereditary eye affections. *Trans Ophthalm Soc. UK.* 1935, 55:164-245.
- Vaché C, Besnard T, Blanchet C, Baux D, Larrieu L, Faugère V, Mondain M, Hamel C, Malcolm S, Claustres M, Roux AF. Nasal epithelial cells are a reliable source to study splicing variants in Usher syndrome. *Hum Mutat.* 2010, 31:734-41.

- Vaché C, Besnard T, le Berre P, García-García G, Baux D, Larrieu L, Abadie C, Blanchet C, Bolz HJ, Millan J, Hamel C, Malcolm S, Claustres M, Roux AF: Usher syndrome type 2 caused by activation of an USH2A pseudoexon: implications for diagnosis and therapy. *Hum Mutat.* 2012, 33:104-8.
- van Wijk E, Pennings RJ, te Brinke H, Claassen A, Yntema HG, Hoefsloot LH, Cremers FP, Cremers CW, Kremer H. Identification of 51 novel exons of the Usher syndrome type 2A (USH2A) gene that encode multiple conserved functional domains and that are mutated in patients with Usher syndrome type II. *Am J Hum Genet.* 2004, 74:738-44.
- van Wijk E, van der Zwaag B, Peters T, Zimmermann U, Te Brinke H, Kersten FF, Marker T, Aller E, Hoefsloot LH, Cremers CW, Cremers FP, Wolfrum U, Knipper M, Roepman R, Kremer H. The DFNB31 gene product whirlin connects to the Usher protein network in the cochlea and retina by direct association with USH2A and VLGR1. *Hum. Mol. Genet.* 2006, 15:751-65.
- Vernon M. Sociological and psychological factors associated with hearing loss. *J. Speech Hear Res.* 1969, 12:541-63. Review.
- Verpy E, Leibovici M, Zwaenepoel I, Liu XZ, Gal A, Salem N, Mansour A, Blanchard S, Kobayashi I, Keats BJ, Slim R, Petit C. A defect in harmonin, a PDZ-domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C. *Nature Genetics.* 2000, 26:51-5.
- Vozzi D, Aaspõllu A, Athanasakis E, Berto A, Fabretto A, Licastro D, Külm M, Testa F, Trevisi P, Vahter M, Ziviello C, Martini A, Simonelli F, Banfi S, Gasparini P. Molecular epidemiology of Usher syndrome in Italy. *Mol Vis.* 2011, 17:1662-8.
- Vreeswijk MP, Kraan JN, van der Klift HM, Vink GR, Cornelisse CJ, Wijnen JT, Bakker E, van Asperen CJ, Devilee P. Intronic variants in BRCA1 and BRCA2 that affect RNA splicing can be reliably selected by splice-site prediction programs. *Hum Mutat.* 2009, 30:107-14.
- Wagner EJ, Baines A, Albrecht T, Brazas RM, Garcia-Blanco MA. Imaging alternative splicing in living cells. *Methods Mol Biol.* 2004, 257:29-46.
- Wang A, Liang Y, Fridell RA, Probst FJ, Wilcox ER, Touchman JW, Morton CC, Morell RJ, Noben-Trauth K, Camper SA, Friedman TB: Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science.* 1998, 29:1447-51.

- Wayne S, Der Kaloustian VM, Schloss M, Polomeno R, Scott DA, Hejtmancik JF, Sheffield VC, Smith RJ. Localization of the Usher syndrome type ID gene (Ush1D) to chromosome 10. *Hum Mol Genet.* 1996, 5:1689-92.
- Weil D, Blanchard S, Kaplan J, Guilford P, Gibson F, Walsh J, Mburu P, Varela A, Levilliers J, Weston MD, et al. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature.* 1995, 374:60-1.
- Weil D, El-Amraoui A, Masmoudi S, Mustapha M, Kikkawa Y, Lainé S, Delmaghani S, Adato A, Nadifi S, Zina ZB, Hamel C, Gal A, Ayadi H, Yonekawa H, Petit C. Usher syndrome type I G (USH1G) is caused by mutations in the gene encoding SANS, a protein that associates with the USH1C protein, harmonin. *Hum Mol Genet.* 2003, 12:463-71.
- Weston MD, Luijendijk MW, Humphrey KD, Möller C, Kimberling WJ. Mutations in the VLGR1 gene implicate G-protein signaling in the pathogenesis of Usher syndrome type II. *Am J Hum Genet.* 2004, 74:357-66.
- Wu L, Pan L, Wei Z, Zhang M. Structure of MyTH4-FERM domains in myosin VIIa tail bound to cargo. *Science.* 2011, 331:757-60.
- Yagi H, Tokano H, Maeda M, Takabayashi T, Nagano T, Kiyama H, Fujieda S, Kitamura K, Sato M. Vlg1 is required for proper stereocilia maturation of cochlear hair cells. *Genes Cells.* 2007, 12:235-50.
- Yan J, Pan L, Chen X, Wu L, Zhang M. The structure of the harmonin/sans complex reveals an unexpected interaction mode of the two Usher syndrome proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010, 107:4040-5.
- Yang J, Liu X, Zhao Y, Adamian M, Pawlyk B, Sun X, McMillan DR, Liberman MC, Li T. Ablation of whirlin long isoform disrupts the USH2 protein complex and causes vision and hearing loss. *PLoS Genet.* 2010, 6:e1000955.
- Yoshimura H, Iwasaki S, Nishio SY, Kumakawa K, Tono T, Kobayashi Y, Sato H, Nagai K, Ishikawa K, Ikezono T, Naito Y, Fukushima K, Oshikawa C, Kimitsuki T, Nakanishi H, Usami S. Massively parallel DNA sequencing facilitates diagnosis of patients with Usher syndrome type 1. *PLoS One.* 2014, 9:e90688.
- Zallocchi M, Meehan DT, Delimont D, Askew C, Garige S, Gratton MA, Rothermund-Franklin CA, Cosgrove D. Localization and expression of clarin-1, the Clrn1 gene product, in auditory hair cells and photoreceptors. *Hear Res.* 2009, 255:109-20.

- Zou J, Luo L, Shen Z, Chiodo VA, Ambati BK, Hauswirth WW, Yang J. Whirlin replacement restores the formation of the USH2 protein complex in whirlin knockout photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011, 52:2343-51.
- Zou J, Zheng T, Ren C, Askew C, Liu XP, Pan B, Holt JR, Wang Y, Yang J. Deletion of PDZD7 disrupts the Usher syndrome type 2 protein complex in cochlear hair cells and causes hearing loss in mice. *Hum Mol Genet*. 2014, 23:2374-90.
- Zwaenepoel I, Verpy E, Blanchard S, Meins M, Apfelstedt-Sylla E, Gal A, Petit C. Identification of the Three Novel Mutations in the USH1C Gene and Detection of Thirty-One Polymorphisms Used for Haplotype Analysis. *Human Mutation*. 2001, 17:34-41.





## **IX. APÉNDICE**



## 1. Trabajo no relacionado con los objetivos de la tesis

### Artículo

#### Two novel disease-causing mutations in the *CLRN1* gene in patients with Usher syndrome type 3

Gema García-García,<sup>1</sup> **María J. Aparisi**,<sup>1</sup> Regina Rodrigo,<sup>1</sup> María D. Sequedo,<sup>1</sup> Carmen Espinós,<sup>1,2</sup> Jordi Rosell,<sup>3</sup> José L. Olea,<sup>4</sup> M. Paz Mendívil,<sup>5</sup> María A Ramos-Arroyo,<sup>6</sup> Carmen Ayuso,<sup>2,7</sup> Teresa Jaijo,<sup>1,2</sup> Elena Aller,<sup>1,2</sup> and José M. Millán<sup>1,2,8</sup>

**(The first two authors contributed equally to this work)**

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Enfermedades Neurosensoriales. Instituto de Investigación Sanitaria IIS - La Fe. Valencia, Spain. <sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia, Spain. <sup>3</sup>Servicio de Genética. Hospital Universitario Son Espases. Palma de Mallorca, Spain. <sup>4</sup>Servicio de Oftalmología. Hospital Universitario Son Espases. Palma de Mallorca, Spain. <sup>5</sup>Servicio de Oftalmología, Hospital de Basurto, Bilbao, Spain. <sup>6</sup>Servicio de Genética. Hospital Virgen del Camino, Pamplona, Spain. <sup>7</sup>Servicio de Genética, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD). Madrid, Spain. <sup>8</sup>Unidad de Genética. Hospital Universitario La Fe. Valencia, Spain.

*Molecular Vision*. 2012; 18:3070-8.

### ABSTRACT

**Purpose:** To identify the genetic defect in Spanish families with Usher syndrome (USH) and probable involvement of the *CLRN1* gene.

**Methods:** DNA samples of the affected members of our cohort of USH families were tested using an USH genotyping array, and/or genotyped with polymorphic markers specific for the USH3A locus. Based on these previous analyses and clinical findings, *CLRN1* was directly sequenced in 17 patients susceptible to carrying mutations in this gene.

**Results:** Microarray analysis revealed the previously reported mutation p.Y63X in two unrelated patients, one of them homozygous for the mutation. After *CLRN1* sequencing, we found two novel mutations, p.R207X and p.I168N. Both novel mutations segregated with the phenotype.

**Conclusions:** To date, 18 mutations in *CLRN1* have been reported. In this work, we report two novel mutations and a third one previously identified in the Spanish USH sample. The prevalence of *CLRN1* among our patients with USH is low.

## INTRODUCTION

Usher syndrome (USH) is an autosomal recessive disease characterized by the association of hearing loss and visual impairment due to retinitis pigmentosa (RP), with or without vestibular dysfunction. USH is the most frequent cause of concurrent deafness and blindness of genetic origin, and general prevalence ranges from 3.3 to 6.4 per 100,000 live births. However, recent studies indicate that the prevalence might be as high as 1 per 6,000 [1,2].

USH is clinically and genetically heterogeneous. Three clinical forms have been distinguished: USH1, USH2, and USH3. Nine genes have been identified responsible so far [3,4]. Five causative genes have been reported for USH1: *MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*, and *USH1G*. Three genes have been described for USH2 (*USH2A*, *GPR98*, and *DFNB31*), and one gene has been described for USH3: *CLRN1*. There is growing evidence suggesting that at least eight of these proteins (all except clarin 1) form a network, which is critical for developing and maintaining the sensorineural cells in the inner ear and the retina [5-7].

The *CLRN1* gene is complex. At least 11 splice variants have been reported [8]. The main splice variant is composed of three exons that code for a 232 amino acid protein, clarin 1. Clarin 1 is a four-transmembrane protein expressed in the hair cells of the organ of Corti and in the neural retina [9,10].

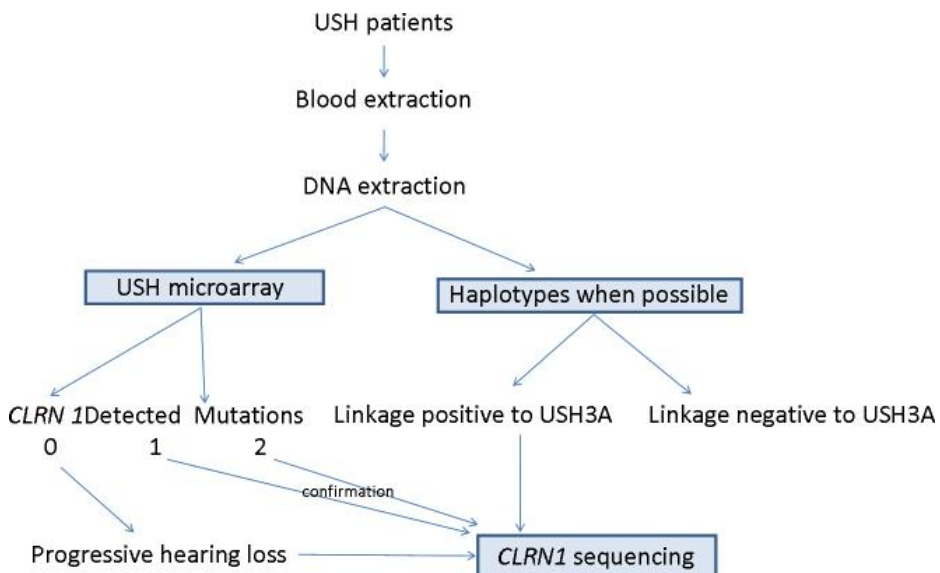
The clarin 1 protein is thought to be expressed in mouse cochlea transiently from embryonic day 18 (E18) to postnatal day 6 (P6) in basal parts of the hair cells, whereas in apical parts (stereocilia) clarin 1 expression is lost already at P1. In the adult mouse retina, clarin 1 localizes to inner segments, connecting cilia and ribbon synapses. The function of clarin 1 remains unknown; however, the spatiotemporal expression pattern of clarin 1 in hair cells implicates protein involvement in synaptic maturation [11,12]. Structural and sequence homology with the synaptic protein stargazin suggest a role for clarin 1 in the plasma membranes surrounding the ribbon synapses of the inner ear and retina transport [9].

USH3 is characterized by progressive hearing loss, retinitis pigmentosa, and variable vestibular dysfunction; the progressiveness of hearing loss is a distinctive feature of USH1 and USH2 [13]. Although the *CLRN1* gene was initially described as responsible for USH3 cases, recent studies have demonstrated that mutations in *CLRN1* are also seen in Usher clinical forms similar to USH1 and USH2 or even isolated RP [14-16].

Usher syndrome type 3 is rare except among Finns and Ashkenazi Jews. In fact, most studies show that *USH3* represents less than 5% in the majority of populations. In Finland, at least 40% of patients with Usher syndrome display type 3 whereas *USH1* accounts for 34% of cases, and *USH2* represents only 12% [17]. Furthermore, most patients carry one of the two named “Finnish mutations.” The Finnish founder mutation, Finmajor, is the nonsense mutation c.528T>G at codon 176 (p.Y176X), and is responsible for 94% of the patients with *USH3* studied [18]. The Finminor mutation is c.359T>A (p.M120K), which is responsible for virtually the rest of the *CLRN1* alleles.

Among Ashkenazi Jews, the single mutation c.144T>C (p.N48K) is responsible for approximately 40% of *USH* cases, which means virtually 100% of the *USH3* cases in the Ashkenazi population [9]. Haplotype analysis suggests a founder effect and an ancestral origin for these three mutations.

In this study, we sequenced the coding region of *CLRN1* in 17 unrelated patients with *USH* according to our algorithm for *USH3* diagnosis (Figure 1). We found the mutation previously described p.Y63X [9] and two novel pathogenic mutations, p.R207X and p.I168N.



**Figure 1.** Algorithm for the study of *USH3* in our series. When the family has more than one affected member or there is consanguinity, we haplotype the family to discard or not discard linkage to *CLRN1*. In parallel, we send DNA for *USH* microarray genotyping. If haplotypes are compatible with *USH3A* linkage or the *USH* microarray detects only one mutation, we perform direct sequencing of *CLRN1*. All the mutations detected with the *USH* microarray were confirmed with direct sequencing.

## **METHODS**

### **Subjects**

Spanish subjects with Usher syndrome were mainly recruited from the Federación de Asociaciones de Afectados de Retinosis Pigmentaria del Estado Español (FARPE) and the Ophthalmology and ENT Services of several Spanish hospitals as part of a large study of the genetics of Usher syndrome in Spain. Informed consent approved by the Ethics Committee of the Hospital La Fe was obtained for all patients, and the study followed the tenets of the Declaration of Helsinki.

Subjects were classified as having USH based on their clinical history and underwent mutation screening of *CLRN1* as part of the algorithm for the molecular diagnosis of USH performed in our laboratory, which includes previous analysis with the Asper Biotech Usher genotyping microarray and linkage analysis and haplotype compatibility when possible. DNA from 50 individuals without a family history of hearing impairment or visual alterations were screened as healthy controls to evaluate the frequency of the mutations found in the patient sample.

### **Clinical evaluation**

Auditory function was assessed with otoscopy, standard pure tone audiometry (250–800 Hz), and tympanometry. In many cases, the localization of hearing loss in the cochlea was confirmed with otoacoustic emissions and auditory brainstem responses. Ophthalmological evaluations comprised funduscopy, a acuity test, a visual field test, and electroretinography. Vestibular evaluation was performed with a bithermal-caloric test, a rotatory test, computerized dynamic posturography, and a Romberg test.

### **Microarray analysis**

Genomic DNA was extracted from peripheral blood collected in EDTA tubes using an automated DNA extractor (MagNA Pure compact Instrument, Roche Applied Science, GmbH). Five micrograms of DNA were sent to Asper Biotech (Tartu, Estonia) for analysis with the USH microarray. This microarray detects 612 mutations from the nine USH genes [20].

The results obtained from the microarray were confirmed with direct sequencing. All exons where a mutation was identified were amplified with PCR. Amplicons were directly sequenced with dye termination chemistry (Prism Big Dye Terminator v1.1, Applied Biosystems, Inc. [ABI] Foster City, CA), and purified sequencing reactions were

resolved in a sequencer (Prism 3130xl; ABI). To ascertain parental origin, segregation analysis was performed in cases in which at least two pathologic variants were identified.

### **Construction of haplotypes**

Haplotypes were constructed using the intragenic single nucleotide polymorphism (SNP) c.57A>T rs3796242 and two flanking extragenic markers D3S3661 and D3S1279 located upstream and downstream of *CLRNI*, respectively.

### **Mutation screening**

Exons 0, 2, and 3 (corresponding to the main isoform; NM\_174878.2) and exon 1 (expressed in isoform NM\_052995), including intron-exon boundaries of the *CLRNI* gene, were amplified using primers previously described by Adato et al. [9] with modifications and standard PCR conditions. Primers used for amplification of the four *CLRNI* exons are shown in Table 1. PCR products were sequenced using the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems). The sequences obtained were compared with the consensus genomic sequence NG\_009168.1 using the BLAST program. In cases where mutations were detected, we performed segregation analysis. To construct family trees, we used Cyrillic version 2.02 software.

### **Predictions of the pathogenic effect of missense variations**

To predict whether a rare missense variant is deleterious, we used the combined results of three computer algorithms: Sort Intolerant From Tolerant (SIFT) uses sequence homology to predict whether a change is tolerated or deleterious. The polymorphism phenotyping program PolyPhen uses sequence conservation, structure, and SWISS-PROT annotation to characterize an amino acid substitution as probably damaging, possibly damaging, benign, or unknown. Pmut provides prediction by neural networks, which use internal databases, secondary structure prediction, and sequence conservation. This program provides a binary prediction of “neutral” or “pathologic.”

**Table 1.** Primers used for amplification of the coding sequence of the *CLRN1* gene.

Exon	Primers	Sequences (5'-3')	Size (bp)	Primers described by
0	0-D	TCCCATTGCTCACAAAGGTCTTGTTTTG	380	Present study
	0-R	ATTCCTCGCAACACTGGGAA		Present study
1	1-D	TCACTATCTGAAACTATCTTGTTGT	910	9
	1-R	AAGCCCCTGAACTTTATAGG		9
2	2-D	TCAGAAGGATTTTAGTGATGTTTGA	358	9
	2-R	AGACGGTCTTTTTGACATATTGAAAAGCACA		Present study
3	3AB-D	ATGTCAATGGGGATGATGGT	981	9
	3AB-D-N	TTTACACATTGACCCTCTTCC	946	Present study
	3AB-R	CAGGCTGTAACTCGAACTCC		Present study
	3B-D	GTAGCTGCAGATCTAATGTAC	242	Present study
	3B-R	GTCAAGCAATTTCCCACCAG		Present study
	3BC-D	AAGTATACTCTTAGGCCAGGC	944	Present study
	3BC-R	CCTTTGTGGCTAGACTGAATT		Present study

## RESULTS

### Mutation analysis

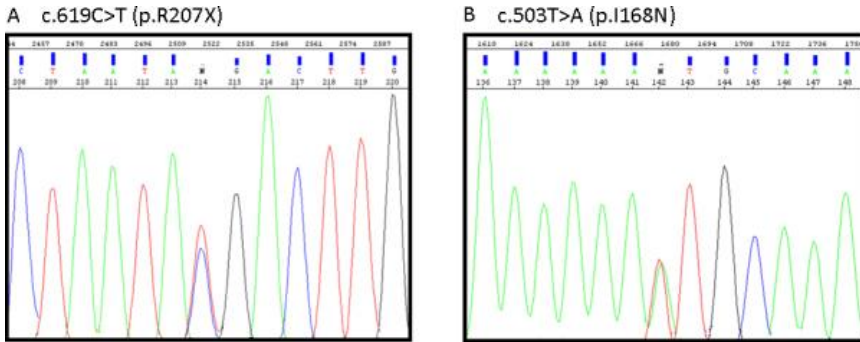
Previous studies identified two *CLRN1* mutations responsible for USH in two Spanish families. The mutation c.189C>A that led to a substitution of a tyrosin by a stop codon resulting in a truncated protein (p.Y63X) was found by Adato et al. in 2002 [21] in homozygous state in a family diagnosed with USH1. The second mutation (p.C40G) was homozygously found in a possible consanguineous Spanish USH3 family by Aller et al. in 2004 [21]. Both mutations were incorporated in the Usher genotyping microchip from Asper Ophthalmics (Tartu, Estonia). Further microchip analyses identified the p.Y63X mutation in homozygous state in the patient of another consanguineous family (FRP-44) and in heterozygous state in a patient from a second family (FRP-529).

The screening of the *CLRN1* gene in the affected woman of FRP-529 revealed a novel nonsense mutation in exon 3, c.619C>T, that led to a truncated protein in codon 207, p.R207X. Figure 2A shows the electropherogram of the sequence showing the c.619C>T mutation. The segregation analysis revealed that the mother was the carrier of the novel mutation p.R207X whereas the father was the carrier of p.Y63X. The healthy sib was a carrier of p.Y63X.

Haplotype analysis in the family FRP-360 was compatible with disease association with the USH3A locus. After *CLRN1* mutation screening was conducted in this family, the c.619C>T (p.R207X) mutation was detected heterozygously in both affected men together



with the missense mutation c.503T>A (p.I168N). Figure 2B shows the electropherogram corresponding to the c.503T>A mutation.



**Figure 2.** Electropherograms showing the novel *CLRN1* mutations identified in this study. **A:** c.619C>T mutation (p.R207X). **B:** c.503T>A mutation (p.I168N).

No other pathological mutations were found in *CLRN1* in any of the additional 15 USH samples. Table 2 shows the mutations in *CLRN1* found in the Spanish USH population detected in this and previous studies.

### In silico prediction

We performed computational analysis with the programs SIFT, PolyPhen, and Pmut to infer the pathologic effect of the variant p.I168N. These programs generated a pathogenic nature prediction for the change. The SIFT program predicted that the substitution of an isoleucine for an asparagine in codon 168 (p.I168N) of the protein would affect its function (score of 0.00; normalized probabilities less than 0.05 are predicted to be deleterious; those greater than or equal to 0.05 are predicted to be tolerated). The program Pmut predicted that change in p.I168N was pathologic with a reliability of 0.9485. Finally, the program PolyPhen predicted that the amino acid substitution probably damaged the protein.

**Table 2.** Mutations identified in the *CLRN1* gene in the Spanish USH population.

Nucleotide change	Exon	Predicted effect	No. of alleles	No. of families	References
c.118C>T	0	p.C40G	2	1	[22]
c.189C>A	0	p.Y63X	9	3	[9]
<b>c.503T&gt;A</b>	<b>3</b>	<b>p.I168N</b>	1	1	Present Study
<b>c.619C&gt;T</b>	<b>3</b>	<b>p.R207X</b>	2	2	Present Study

The novel mutations detected in this study are marked in bold. The reference sequence for nomenclature is NM\_174878.2. Column 4 indicates the number of mutated alleles in the total Spanish USH series. Column 5 indicates the number of families in which the mutation was detected.

### **Clinical description**

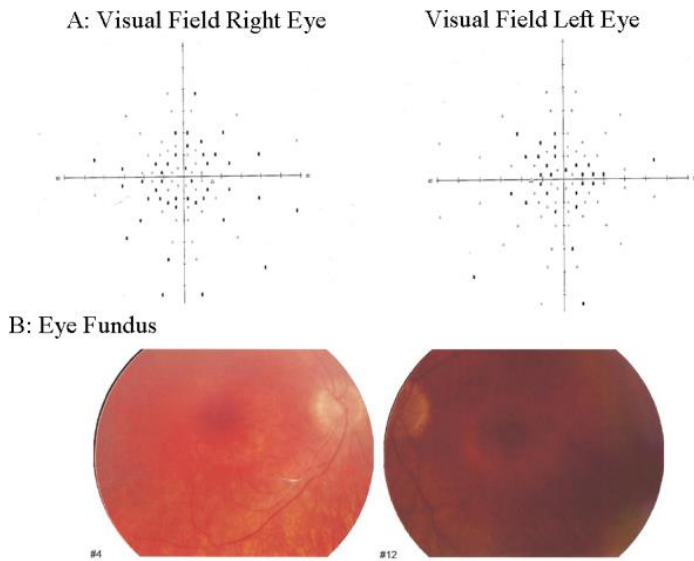
Patients included in this study displayed a wide range of ophthalmological and audiological symptoms even among patients from the same family.

The patient RP-614 from family FRP-44 carried the p.Y63X homozygously. She was the daughter of a consanguineous marriage. Her hearing loss was prelingual and severe. The patient used audiphones until the age of 33 when she underwent a cochlear implantation. Hearing loss appeared to be progressive. The onset of the visual phenotype occurred when she was 14 years old but progressed rapidly to severe RP. No data about vestibular function were available.

The patient RP-1850 from FRP-259 carried the p.Y63X mutation together with the novel p.R207X. She was a 19-year-old woman who presented with a bilateral severe progressive sensorineural hearing loss corrected with audiphones. Currently, she is waiting for cochlear implantation. She showed a delay in gait development and vestibular hyporeflexia. The onset of RP when she was 9 years old included night blindness and peripheral visual loss. Fundus ophthalmoscopy showed pigmentary anomalies typical of RP since she was young, attenuated arteriolar vessels and increased bright of the internal limitant membrane. The visual field showed an anular scotoma reduced by 15°. Her best-corrected visual acuity was 0.4 in both eyes, but she experienced a rapid progression of visual loss in the last year. The eye fundus and visual field of the patient are shown in Figure 3.

The patients from FRP-360 were compound heterozygotes for p.R207X and p.I168N and displayed discordant phenotypes. Patient RP-1520 is a 52-year-old man who started with night visual alterations at 6 years old, but was not diagnosed until he was 15. Visual acuity was 0.05 in both eyes, and he presented with pseudophakia. The eye fundus was typical of RP, and the visual field was reduced by 5° around the fixation point in both eyes. He had normal speech acquisition and normal motor milestones (he started gait at 9 months old). At 13 years old, he presented with a progressive hearing loss, without tinnitus or balance dysfunction. He needed audiphones at 42 years old, and currently he shows a moderate bilateral sensorineural hearing loss in the range of 79–80 dB and normal vestibular function.

Patient RP-1521 is a 49-year-old man who presented with severe hearing loss since he was born. He showed a delay in speech acquisition, starting to speak at 36 months and requiring deaf school education. He has had subjective symptoms of vestibular dysfunction since he was 10 years old. The first ophthalmological symptoms were detected at the age of 8 years old as night blindness and tunnel vision. The eye fundus was typical of RP with a reduction of  $10^\circ$  in OD and  $20^\circ$  in OI. The visual acuity was 0.2 (OD) and 0.3 (OI). A brief clinical description of the patients with mutations in *CLRN1* is shown in appendix 1.



**Figure 3.** Ophthalmological features of the patient compound heterozygote for p.Y63X and p.R207X. **A:** Visual field, right eye and visual field, left eye. **B:** Eye fundus photography.

## DISCUSSION

A total of 18 *CLRN1* mutations have been documented in patients with USH or RP around the world (Human Gene Mutation Database; Leiden Open Variation Database for Usher Syndrome). With the exception of the mutations p.Y176X and p.M120K found in the Finnish population [18] and p.N48K found in Ashkenazi Jews [9], the other mutations were mostly found in a single family.

Besides of these three common mutations, seven indels, one nonsense, and seven missense mutations have been reported to date: a deletion c.459\_461delATT [18], a gross

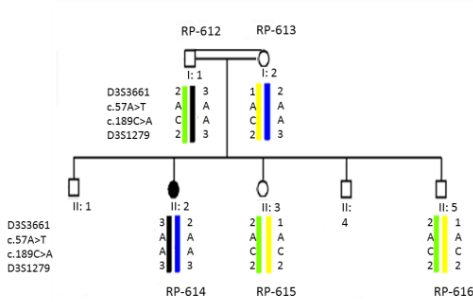
deletion of 23 bp (c.187\_209del23bp) that led to a frameshift at codon 63 and a stop codon 25 amino acids forward, a p.Y63X stop mutation [9], a c.165delC deletion [10] and a small indel mutation c.145\_152delCAGGinsTGTCCAAT [10], a c.149\_152delCAGG [16], a c.181delA [22], c.502dupA insertion [23], the c.161T>C (p.L54P) [24], the c.449T>C (p.L150P) [10], the c.118T>G (p.C40G) [21], the c.313T>C (p.S105P) [16] and the c.368C>A (p.A123D) [25]. Finally, Khan et al. [26] found two homozygous missense mutations, c.92C>T (p.P31L) and c.461T>G (p.L154W), in two consanguineous Pakistani families with isolated RP and no audiological symptoms.

Two of the mutations found in this study are truncating, the p.Y63X mutation that has been found in two unrelated families being the carriers of Catalonian origin and p.R207X, found in heterozygous state in two unrelated families being the carriers of Basque origin. The other mutation, p.I168N, is a missense and was found in a family together with the p.R207X mutation.

The physiologic consequences of the p.R207X and p.I168N mutations are unknown. Despite *CLRN1* was identified in 2002, little is known about the protein, its function, or its domains. Clarin 1 is a membrane protein with four transmembrane domains that belongs to the family of vertebrate tetraspanins. The p.I168N mutation is located in the second extracellular loop. This mutation affects an isoleucine residue, hydrophobic and aliphatic substituted by the polar hydrophilic asparagine. To date, only two mutations have been described in the second extracellular loop, and they lead to truncated proteins. Thus, p.I168N could impair clarin 1 in some way, perhaps by altering the trafficking of the protein from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane as has been observed for other missense mutations [26]. The mutation p.R207X leads to a clarin 1 that lacks the C-terminal domain. This C-terminal has a tobacco mosaic virus signature and could serve as a protein binding motif [9].

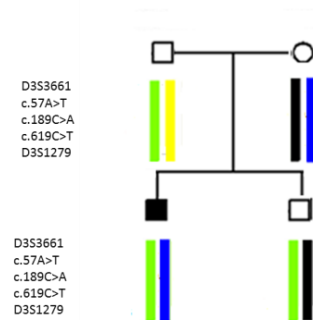
In the total Spanish series, the mutation p.Y63X was observed in 9 alleles of affected patients from 3 different families. The p.R207X mutation was detected in 3 alleles of affected patients from 2 families. A common haplotype was seen for p.R207X but not for p.Y63X (Figure 4).

## A FRP-44

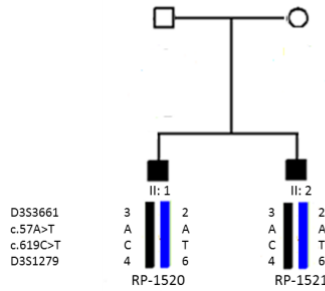


## B

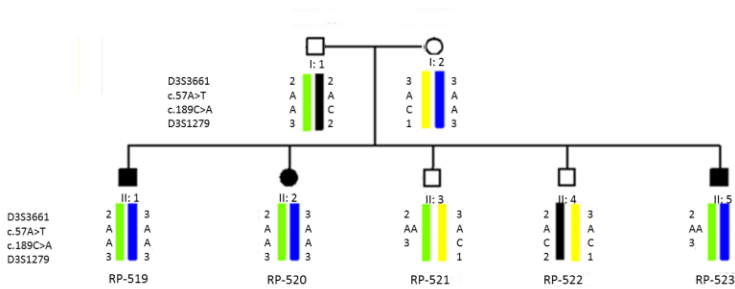
## FRP-529



## C FRP-360



## D FRP-26



**Figure 4.** Pedigrees and haplotypes from four Spanish families with *CLRN1* mutations. **A:** Patient homozygote for c.189C>A (p.Y63X). **B:** Patient compound heterozygote for c.189C>A (p.Y63X) and c.619C>T (p.R207X). **C:** Patients compound heterozygotes for c.619C>T (p.Y63X) and c.503T>A (p.I168N). **D:** Patients homozygotes for c.169C>A (p.Y63X) initially described in [9].

The classical ophthalmological features of USH3 were defined by Joensuu [13] as night blindness, mid-peripheral visual field defects, and slowly progressive tunnel function vision at a mean age of 30 years. Fundus appearance was typical of RP with thin vessels and granular pigmentation in the midperiphery retina. The progression of RP resulted in a severe visual handicap at 20–30 years. The diagnosis of RP is usually made at the mean age of 17 years. Later, Plantiga et al. [27] found a visual acuity less than 0.05, severely impaired at mean age 37 years old, and tubular vision without peripheral islands at 30 years old. The visual deterioration rate was also similar to USH2A and USH1B, perhaps with more rapid progression in USH3A than USH2A, especially concerning visual field loss. The retinal degeneration pattern and structural changes in USH3A were similar to those in USH2A [28].

In the patients reported here, the mean age of diagnosis of RP was 11.5 years. Nevertheless, patient RP-1521 from family FRP-360 was diagnosed when he first noticed symptoms (8 years old), probably because his parents and the ophthalmologist were aware of the disease of his brother RP-1520. Visual acuity was poor except the younger patient, RP-1850, who is 19 years old, but she experienced a considerable loss of vision in the last year. All patients displayed night blindness and visual field loss as the first symptoms, and the eye fundus was typical of RP. Cataracts were present in two patients (RP-614 and RP-1520). RP-1850 has not developed cataracts at the age of 19 and neither has RP-1521 at the age of 50 years old while the elder brother has cataracts in both eyes.

Hearing loss was prelingual, severe, and progressive, and vestibular dysfunction was present except in patient RP-1520 who had postlingual moderate deafness with normal vestibular reflexes. These findings and especially the clinical features of the two affected sibs of FRP-360 illustrate the impressive wide spectrum of sensorineural hearing impairment in type and degree and the high degree of intersubject and intrafamilial variability due to *CLRN1* mutations as previously reported [14].

The variable phenotype may cause USH3 to be underdiagnosed, and mutations in *CLRN1* might be more prevalent than previously thought. Nevertheless, the screening of *CLRN1* indicates that this gene is responsible for a low percentage of cases in our Spanish USH cohort.

### **Acknowledgments**

We acknowledge the Usher patients, their families and FARPE (Federación de Afectados por Retinosis Pigmentaria de España) for their collaboration. We also acknowledge Almudena Ávila Fernández and Fiona Blanco Kelly for their helpful work. This work has been supported by PI08/90311 and PI10/01825, from the Spanish Ministry

of Economy and Competitiveness and AP112/11 from the Conselleria de Sanidad de la Comunidad Valenciana. Gema García-García and María José Aparisi are recipient of a fellowship from the Spanish Ministry of Education (REF: AP2008–02760 and AP2009–3344 respectively). Regina Rodrigo and Carmen Espinós have a researcher-contract SNS Miguel Servet (CP09/118 and CP08/53 respectively) from the Institute of Health Carlos III. CIBERER is an initiative of the Institute of Health Carlos III, Ministry of Economy and Competitiveness.

**Appendix: Table 1.** Clinical description of the patients in whom mutations in the *CLRN1* gene were found.

Patient	Mutations	Sex/Year of Birth	Diagnosis	Age of diagnosis	Sensorineural Hearing Loss	Vestibular Function	Onset of Night Blindness	Onset of Visual Field Loss	Visual Field	Visual Acuity	Eye Fundus	ERG	Cataracts
FRP44	PY63X/ p.Y63X	F/1977	USH3	14	Pretinagnal severe progressive	Not available	14	14	3	0.1/ 0.1	1	Not available	BE
FRP259	PY63X/ p.R207X	F/1992	USH3	9	Pretinagnal severe progressive	Vestibular Dysfunction <sup>A</sup>	9	9	3	0.4 /0.4	1	No response	No
FRP360 (II-1)	p.R207X/ p.I168N	M/ 1959	USH3	15	Postinagnal moderate progressive	Normal	6	7	3	0.05/ 0.05	1	No response	BE
FRP360 (II-2)	p.R207X/ p.I168N	M/ 1961	USH3	8	Pretinagnal severe progressive	Vestibular Dysfunction	8	8	3	0.2/0.3	1	No response	No

- Eye fundus: 1. Peripheral bone spicules, attenuated vessels, pale optic nerve.
- Visual field: normal: 0/ peripheral constriction or diffuse scotoma: 1/ annular scotoma or tubular field with isloles: 2/ Tubular central: 3/ islots or absolute scotoma: 4
- A: results of clinical examinations.
- B: both eyes



**REFERENCES**

1. Kimberling WJ, Möller C. Clinical and molecular genetics of Usher syndrome. *J Am Acad Audiol.* 1995;6:63–72. [PubMed]
2. Kimberling WJ, Hildebrand MS, Shearer AE, Jensen ML, Halder JA, Cohn ES, Weleber RG, Stone EM, Smith RJH. Frequency of Usher syndrome in two pediatric populations: implications for genetic screening of deaf and hard of hearing children. *Genet Med.* 2010;12:512–6. [PMC free article] [PubMed]
3. Saihan Z, Webster AR, Luxon L, Bitner-Glindzicz M. Update on Usher syndrome. *Curr Opin Neurol.* 2009;22:19–27. [PubMed]
4. Millán JM, Aller E, Jaijo T, Blanco-Kelly F, Gimenez-Pardo A, Ayuso C. An update on the genetics of usher syndrome. *J Ophthalmol.* 2011;2011:417217. [PMC free article] [PubMed]
5. Reiners J, Nagel-Wolfrum K, Jürgens K, Märker T, Wolfrum U. Molecular basis of human Usher syndrome: deciphering the meshes of the Usher protein network provides insights into the pathomechanisms of the Usher disease. *Exp Eye Res.* 2006;83:97–119. [PubMed]
6. Kremer H, van Wijk E, Märker T, Wolfrum U, Roepman R. Usher syndrome: molecular links of pathogenesis, proteins and pathways. *Hum Mol Genet.* 2006;15(Spec No 2):R262–70. [PubMed]
7. Maerker T, van Wijk E, Overlack N, Kersten FF, McGee J, Goldmann T, Sehn E, Roepman R, Walsh EJ, Kremer H, Wolfrum U. A novel Usher protein network at the periciliary reloading point between molecular transport machineries in vertebrate photoreceptor cells. *Hum Mol Genet.* 2008;17:71–86. [PubMed]
8. Västinsalo H, Jalkanen R, Dinculescu A, Isosomppi J, Geller S, Flannery JG, Hauswirth WW, Sankila EM. Alternative splice variants of the USH3A gene Clarin 1 (CLRN1). *Eur J Hum Genet.* 2011;19:30–5. [PMC free article] [PubMed]
9. Adato A, Vreugde S, Joensuu T, Avidan N, Hamalainen R, Belenkiy O, Olender T, Bonne-Tamir B, Ben-Asher E, Espinos C, Millán JM, Lehesjoki AE, Flannery JG, Avraham KB, Pietrokovski S, Sankila EM, Beckmann JS. *Lancet.* USH3A transcripts encode clarin-1, a four-transmembrane-domain protein with a possible role in sensory synapses. *Eur J Hum Genet.* 2002;10:339–50. [PubMed]
10. Fields RR, Zhou G, Huang D, Davis JR, Möller C, Jacobson SG, Kimberling WJ, Sumegi J. Usher syndrome type III: revised genomic structure of the USH3 gene and

identification of novel mutations. *Am J Hum Genet.* 2002;71:607–17. [PMC free article] [PubMed]

11. Zallocchi M, Meehan DT, Delimont D, Askew C, Garige S, Gratton MA, Rothermund-Franklin CA, Cosgrove D. Localization and expression of clarin-1, the *Clrn1* gene product, in auditory hair cells and photoreceptors. *Hear Res.* 2009;255:109–20. [PMC free article] [PubMed]

12. Geng R, Geller SF, Hayashi T, Ray CA, Reh TA, Bermingham-McDonogh O, Jones SM, Wright CG, Melki S, Imanishi Y, Palczewski K, Alagramam KN, Flannery JG. Usher syndrome IIIA gene *clarin-1* is essential for hair cell function and associated neural activation. *Hum Mol Genet.* 2009;18:2748–60. [PMC free article] [PubMed]

13. Joensuu T. Positional cloning of the Usher syndrome type III gene (*USH3*). Doctoral Thesis. Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine. University of Helsinki. 2002.

14. Pennings RJ, Fields RR, Huygen PL, Deutman AF, Kimberling WJ, Cremers CW. Usher syndrome type III can mimic other types of Usher syndrome. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2003;112:525–30. [PubMed]

15. Aller E, Jaijo T, Beneyto M, Nájera C, Oltra S, Ayuso C, Baiget M, Carballo M, Antiñolo G, Valverde D, Moreno F, Vilela C, Collado D, Pérez-Garrigues H, Navea A, Millán JM. Identification of 14 novel mutations in the long isoform of *USH2A* in Spanish patients with Usher syndrome type II. *J Med Genet.* 2006;43:e55. [PubMed]

16. Sadeghi M, Cohn ES, Kimberling WJ, Tranebjaerg L, Möller C. Audiological and vestibular features in affected subjects with *USH3*: a genotype/phenotype correlation. *Int J Audiol.* 2005;44:307–16. [PubMed]

17. Vastinsalo H, Isosomppi J, Aittakorpi A, Sankila EM. Two Finnish *USH1B* patients with three novel mutations in myosin VIIA. *Mol Vis.* 2006;12:1093–7. [PubMed]

18. Joensuu T, Hämäläinen R, Yuan B, Johnson C, Tegelberg S, Gasparini P, Zelante L, Pirvola U, Pakarinen L, Lehesjoki AE, de la Chapelle A, Sankila EM. Mutations in a novel gene with transmembrane domains underlie Usher syndrome type 3. *Am J Hum Genet.* 2001;69:673–84. [PMC free article] [PubMed]

19. Cremers FP, Kimberling WJ, Külm M, de Brouwer AP, van Wijk E, te Brinke H, Cremers CW, Hoefsloot LH, Banfi S, Simonelli F, Fleischhauer JC, Berger W, Kelley PM, Haralambous E, Bitner-Glindzicz M, Webster AR, Saihan Z, De Baere E, Leroy BP, Silvestri G, McKay GJ, Koenekoop RK, Millan JM, Rosenberg T, Joensuu T, Sankila EM,

- Weil D, Weston MD, Wissinger B, Kremer H. Development of a genotyping microarray for Usher syndrome. *J Med Genet.* 2007;44:153–60. [PMC free article] [PubMed]
20. Kurg A, Tönisson N, Georgiou I, Shumaker J, Tollett J, Metspalu A. Arrayed primer extension: solid-phase four-color DNA resequencing and mutation detection technology. *Genet Test.* 2000;4:1–7. [PubMed]
21. Aller E, Jaijo T, Oltra S, Alió J, Galán F, Nájera C, Beneyto M, Millán JM. Mutation screening of USH3 gene (clarin-1) in Spanish patients with Usher syndrome: low prevalence and phenotypic variability. *Clin Genet.* 2004;66:525–9. [PubMed]
22. Dreyer B, Brox V, Tranebjaerg L, Rosenberg T, Sadeghi AM, Möller C, Nilssen. Spectrum of USH2A mutations in Scandinavian patients with Usher syndrome type II. *Hum Mutat.* 2008;29:451. [PubMed]
23. Ebermann I, Wilke R, Lauhoff T, Lübben D, Zrenner E, Bolz HJ. Two truncating USH3A mutations, including one novel, in a German family with Usher syndrome. *Mol Vis.* 2007;13:1539–47. a. [PubMed]
24. Isosomppi J, Västinsalo H, Geller SF, Heon E, Flannery JG, Sankila EM. Disease-causing mutations in the CLRN1 gene alter normal CLRN1 protein trafficking to the plasma membrane. *Mol Vis.* 2009;15:1806–18. [PMC free article] [PubMed]
25. Ebermann I, Lopez I, Bitner-Glindzicz M, Brown C, Koenekoop RK, Bolz HJ. Deafblindness in French Canadians from Quebec: a predominant founder mutation in the USH1C gene provides the first genetic link with the Acadian population. *Genome Biol.* 2007;8:R47. b. [PMC free article] [PubMed]
26. Khan MI, Kersten FF, Azam M, Collin RW, Hussain A, Shah ST, Keunen JE, Kremer H, Cremers FP, Qamar R, den Hollander AI. CLRN1 mutations cause nonsyndromic retinitis pigmentosa. *Ophthalmology.* 2011;118:1444–8. [PubMed]
27. Plantinga RF, Pennings RJ, Huygen PL, Sankila EM, Tuppurainen K, Kleemola L, Cremers CW, Deutman AF. Visual impairment in Finnish Usher syndrome type III. *Acta Ophthalmol Scand.* 2006;84:36–41. [PubMed]
28. Herrera W, Aleman TS, Cideciyan AV, Roman AJ, Banin E, Ben-Yosef T, Gardner LM, Sumaroka A, Windsor EA, Schwartz SB, Stone EM, Liu XZ, Kimberling WJ, Jacobson SG. Retinal disease in Usher syndrome III caused by mutations in the clarin-1 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:2651–60. [PubMed]

2. **Tabla S1.** *Primers* empleados en la PCR-anidada para la amplificación del transcrito del gen *CIB2*, a partir de ARN de células epiteliales nasales.

<i>Gene</i>	<i>Exons</i>	<i>Primers</i>	<i>Sequence 5'-&gt;3'</i>	<i>Size (bp)</i>
<i>CIB2</i>	1-6	CIB2_EXP_1-6-EXT-D	CAACTACCAGGACTGCACCTT	509
		CIB2_EXP_1-6-EXT-R	GGAAAGTGCTGAGGAAGTCAG	
	3-5	CIB2_EXP_3-5-INT-D	TGCATTCGCGATTCTATGAGC	376
		CIB2_EXP_3-5-INT-R	TCCTCAATGACCTTGTCGCA	

## **X. RESUMEN**



## Resumen

- **Introducción**

El síndrome de Usher (USH) es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, caracterizada por la asociación de hipoacusia neurosensorial, retinosis pigmentaria (RP), y en algunas ocasiones, disfunción vestibular. Se considera la forma más común de sordoceguera de origen genético, siendo responsable de más del 50% de los individuos sordociegos. Su rango de prevalencia varía entre 3,2-6,2/100000 nacidos vivos.

En base a la edad de inicio, gravedad y progresión de los síntomas, el USH puede ser dividido en tres tipos clínicos: USH1, USH2 y USH3, cada uno de los cuales presentan distintos subtipos genéticos. Hasta la fecha, se han identificado 10 genes responsables del USH, 6 para el USH1 (*MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH1G* y *CIB2*), 3 para el USH2 (*USH2A*, *GPR98* y *DFNB31*) y uno para el USH3 (*CLRN1*). No obstante, se han propuesto una serie de genes como asociados y candidatos a producir la enfermedad, en base a su homología con otras proteínas USH, su interacción en la red de proteínas USH, su implicación en la estructura ciliar o a la identificación de mutaciones supuestamente responsables de la enfermedad o posible efecto modificador del fenotipo. Estos genes son: *PDZD7*, *HARS*, *VEZT*, *MYO15A* y *CEP250*.

La mayoría de las proteínas codificadas por los genes USH interactúa con al menos otra de ellas en una red proteica, denominada interactoma Usher. Esta red de proteínas se localiza, principalmente, en las células ciliadas del oído interno y en los fotorreceptores de la retina, y es fundamental para el correcto funcionamiento de estas células sensoriales.

El principal problema al que se ha enfrentado el diagnóstico molecular para el USH ha sido su gran heterogeneidad genética y el gran tamaño de alguno de sus genes implicados. La búsqueda de mutaciones en esta enfermedad ha ido evolucionando a lo largo del tiempo, desde los rastreos mutacionales exón a exón mediante secuenciación por Sanger, en base a la clínica del paciente, hasta la aplicación de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva (NGS). Esto ha permitido la identificación de la causa de la enfermedad en un menor tiempo y coste.

Existen diferentes tipos de plataformas de secuenciación masiva que difieren, principalmente, en el tipo de reacciones químicas que llevan a cabo y en el tamaño de las secuencias obtenidas. No obstante, todas ellas se basan en la secuenciación masiva de moléculas de ADN amplificadas de forma paralela, obteniéndose cientos de millones de bases, a un reducido coste por nucleótido y en un menor tiempo.

Sin embargo, aunque la NGS presenta un mayor rendimiento diagnóstico al poder procesar todos los exones de manera simultánea, no muestra la sensibilidad alcanzada por la secuenciación convencional. Además, uno de los principales problemas que presenta la NGS son los falsos positivos debidos a un mal alineamiento de las secuencias o por la presencia de homopolímeros, siendo, hasta la fecha, necesarios los estudios complementarios para verificar el cambio detectado mediante otras técnicas de diagnóstico, como secuenciación por Sanger, MLPA, *array*-CGH o PCR cuantitativa.

La búsqueda de mutaciones en pacientes diagnosticados de USH ha permitido, en la mayoría de casos, determinar la causa subyacente a la enfermedad. Sin embargo, en muchos de los cambios identificados como mutaciones *missense*, silenciosas o intrónicas, desconocemos si afectan al procesamiento del ARN mensajero (ARNm), haciéndose necesarios los estudios funcionales de expresión.

Los genes causantes del USH se expresan, principalmente, en las células ciliadas del oído interno y en los fotorreceptores de la retina. Estudios *in silico* y ensayos mediante minigenes han permitido llevar a cabo el análisis de las variantes, determinando la naturaleza patológica de éstas en el procesamiento del ARNm, dada la inaccesibilidad de los tejidos donde se expresan estos genes. Sin embargo, recientemente, diversos estudios han demostrado la presencia de proteínas y transcritos USH en células epiteliales nasales, haciéndose factibles los análisis de ARN, a partir de muestras obtenidas del propio paciente. Además, en este tejido epitelial ciliar, se ha observado que pacientes USH muestran una ligera disminución de la movilidad ciliar.

Actualmente, esta enfermedad no tiene cura. Sin embargo, se están desarrollando distintos tipos de estrategias para mejorar la calidad de vida de los pacientes que la padecen. Éstas van desde audífonos o implantes cocleares para contrarrestar la hipoacusia, hasta el uso de factores neurotróficos, terapia génica o trasplantes de retina para paliar la degeneración de los fotorreceptores en la retina.

- **Objetivos**

- 1) Determinar la implicación del gen *USH1C* en nuestra cohorte de pacientes diagnosticados de USH1 y estimar su prevalencia en población española.
- 2) Determinar la naturaleza patológica de las variantes identificadas en los genes USH1 mediante análisis de expresión, basados en minigenes y ARNm obtenido de células epiteliales nasales de pacientes.



- 3) Desarrollar una plataforma de secuenciación masiva para los genes responsables del USH, genes asociados y candidatos.

- **Metodología**

### **Estudio molecular del gen *USH1C***

El estudio molecular del gen *USH1C* se llevó a cabo en 34 pacientes USH, 24 de los cuales habían sido diagnosticados de USH1 (22 de origen español, uno de origen italiano y uno de origen turco). Los 10 pacientes restantes no habían podido ser clasificados debido a la ausencia de suficientes datos clínicos (9 de origen español y uno de origen turco).

El rastreo mutacional se realizó sobre los 28 exones que comprenden dicho gen junto con las regiones intrónicas adyacentes, a partir de la amplificación por PCR de las secuencias exónicas y su posterior secuenciación por Sanger.

Las variantes identificadas fueron analizadas con programas bioinformáticos con el objetivo de obtener una predicción sobre su naturaleza patológica.

### **Análisis de expresión de las variantes USH1**

Ciento ocho variantes identificadas en nuestra cohorte, en los genes responsables del USH1 (*MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15* y *USH1G*) (Jaijo *et al.*, 2006; Jaijo *et al.*, 2007; Aller *et al.*, 2007; Oshima *et al.*, 2008; Aparisi *et al.*, 2010; Jaijo *et al.*, 2012) fueron analizadas mediante los programas bioinformáticos *SpliceView*, *NetGene2*, *NNSplice* y *HSF*, con el objetivo de obtener una predicción sobre su posible efecto en el procesamiento del ARNm.

En base a los resultados obtenidos tras el análisis *in silico*, se seleccionaron 18 variantes como presuntamente implicadas en un procesamiento anómalo del *splicing*. Estos cambios fueron analizados mediante minigenes, a partir de la clonación del fragmento de interés en el vector de expresión *pSPL3* y su posterior transfección en células COS-7 de mamífero. Tras la transfección, se extrajo el ARN de estas células y se retrotranscribió a ADN complementario (ADNc), para verificar el carácter patológico de la variante sobre el *splicing*.

La extracción de ARN de células epiteliales nasales se realizó mediante un método no invasivo de raspado del epitelio nasal del cornete medio en 8 pacientes USH1 y controles, con el objetivo de corroborar el efecto observado en minigenes. El ARN extraído fue retrotranscrito a ADNc, el cual fue utilizado como molde en las PCR-anidadas.

A través de un sistema de video-imagen digital de alta definición se evaluó la movilidad de los cilios de las células epiteliales nasales de 8 pacientes USH1 y 30 controles, con el objetivo de determinar si la frecuencia y/o patrón del batido ciliar de estas células estaba comprometido.

### **Desarrollo de una plataforma de secuenciación masiva para el diagnóstico molecular del USH**

Se diseñó un panel que incluía los 10 genes responsables del USH, 2 genes asociados (*PDZD7* y *HARS*) y 2 candidatos (*VEZT* y *MYO15A*), mediante el método de secuenciación dirigida HaloPlex empleando la herramienta *Suredesign* de Agilent para la plataforma MiSeq (Illumina), con el objetivo de realizar la secuenciación masiva de todos ellos.

Se crearon 481 *targets* correspondientes a las regiones exónicas, más 25pb intrónicas flanqueantes y la región intrónica correspondiente al pseudoexón 40 de *USH2A* (Vaché *et al.*, 2012), con un tamaño total de 132,763Kb.

Un total de 40 pacientes USH fueron analizados. Éstos fueron divididos en dos grupos de estudio: grupo control, formado por 8 pacientes con al menos una mutación identificada, y grupo de estudio, formado por 32 pacientes sin identificar la causa de la enfermedad.

- **Resultados y discusión**

#### **Estudio molecular del gen *USH1C***

Hasta la fecha, no se había llevado a cabo el estudio del gen *USH1C* en población española. Como resultado de este *screening* mutacional se identificaron 3 mutaciones, en homocigosis, con una clara implicación patológica, p.C224X, p.S161HfsX16 y p.D124TfsX7, en 3 pacientes USH1 no relacionados. Las dos primeras se identificaron en dos familias de origen español y la tercera en una familia de origen italiano.

En este estudio, también se identificaron 47 cambios adicionales, 22 de los cuales no habían sido descritos previamente. De éstos, se identificaron: 2 variantes *missense* (p.S190L y p.G379D) y 20 cambios intrónicos, los cuales, excepto uno (c.1086-12G>A), fueron considerados neutrales, debido a su elevada frecuencia dentro de la cohorte de estudio, su localización fuera de las regiones canónicas de *splicing* y tras la realización de un estudio bioinformático. Las dos variantes *missense* fueron analizadas *in silico*, obteniendo predicciones contradictorias.

El cambio intrónico c.1086-12G>A se identificó en homocigosis en los tres hermanos afectados de una misma familia turca (FRP-284), la cual había sido descrita por Simsek *et al.* (2010) como USH2 asociado a una variante de Dandy Walker. Los resultados *in silico* de esta variante predecían un posible efecto sobre el procesamiento del ARNm. Sin embargo, pudimos comprobar que este cambio ya había sido descrito como rs11024318 en la dbSNP del NCBI con una MAF (*Minor Allele Frequency*) de 0,0857. Por lo que parece indicar, que no es responsable de la enfermedad.

Como resultado de este estudio, se identificó la causa subyacente de la enfermedad en 3 de los 34 pacientes analizados en nuestra cohorte (8,82%). Estos resultados suponen que la implicación del gen *USHIC* en la serie inicial de 65 pacientes USH1 de origen español que desde 2005 hasta la fecha han sido estudiados para los 5 genes USH1 (*MYO7A*, *USHIC*, *CDH23*, *PCDH15* y *USH1G*) (Jaijo *et al.*, 2006; Jaijo *et al.*, 2007; Aller *et al.*, 2007; Oshima *et al.*, 2008; Aller *et al.*, 2010; Jaijo *et al.*, 2010) es del 3,08% (2/65). Indicándonos la baja tasa de mutación de este gen en comparación con el resto de genes USH1.

Mediante los rastreos mutacionales en el gen *USHIC* se ha observado que la mayoría de mutaciones descritas son específicas de cada familia y se distribuyen, principalmente, a lo largo de los 13 primeros exones del gen, comunes a todas las isoformas. De hecho, sólo 3 mutaciones han sido descritas con relativa frecuencia. La mutación c.216G>A, la cual es altamente frecuente en población acadiana y población de Québec de descendencia francesa, debido a un efecto fundador (Ebermann *et al.*, 2007b). La mutación c.238dup, la cual se ha identificado en diversas poblaciones, siendo, hasta la fecha, la única mutación recurrente del *USHIC* (Bitner-Glindzicz *et al.*, 2000; Verpy *et al.*, 2000; Zwaenepoel *et al.*, 2001), y la mutación c.1220delG, la cual es relativamente frecuente en población judío Yemenita debido a un efecto fundador. Además, este cambio produce un fenotipo atípico del USH1 con una RP típica con espículas pero, sin problemas auditivos hasta después de los 40 años y con ausencia de disfunción vestibular (Khateb *et al.*, 2012).

Estos hallazgos, realzan la importancia de la clínica y las correlaciones genotipo-fenotipo, sugiriendo al gen *USHIC* como candidato a ser responsable de la enfermedad tanto en aquellos pacientes diagnosticados de USH1 o de hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva, como en aquellos pacientes que muestran una sintomatología atípica.

Además, la identificación de mutaciones en el gen *USHIC* es esencial para poder acceder en un futuro a determinadas terapias. Actualmente, se están realizando ensayos mediante la aplicación de diversas estrategias (administración de aminoglucósidos, nucleasas *zinc fingers*, adenovirus, oligonucleótidos antisentido, etc.), con el objetivo de

restablecer el fenotipo salvaje en ratones mutantes para este gen (Goldmann *et al.*, 2012; Lentz *et al.*, 2013; Nagel-Wolfrum *et al.*, 2014).

### **Análisis de expresión de las variantes USH1**

Las 18 variantes que, en base a los resultados obtenidos mediante los programas bioinformáticos, estaban presuntamente implicadas en un procesamiento anómalo del ARNm fueron: 9 variantes del gen *MYO7A* (6 *missense*, 2 *frameshift* y un codón parada prematuro), 3 del gen *CDH23* (2 cambios intrónicos y un cambio *missense*), 5 del gen *PCDH15* (2 variantes intrónicas, un cambio *frameshift*, un cambio *missense* y un codón de parada prematuro) y un cambio intrónico del gen *USH1C*.

Con el objetivo de verificar la predicción obtenida con los programas bioinformáticos, se utilizaron minigenes basados en el vector de clonación *pSPL3*. Los ensayos con minigenes revelaron que sólo 7 de las 18 variantes estudiadas, producían un procesamiento anómalo del ARNm: tres cambios en el gen *MYO7A* (c.470G>A, c.1342\_1343delAG y c.3652G>A), 3 cambios en *CDH23* (c.2289+1G>A, c.6049G>A y c.8722+1delG) y un cambio en *PCDH15* (c.3717+2dupT).

Estos resultados demuestran la importancia de los estudios de expresión mediante minigenes, sobre todo, en aquellas enfermedades cuyos genes se expresan, principalmente, en tejidos de difícil acceso. Además, resaltan la necesidad de comprobar las predicciones obtenidas tras los análisis bioinformático, detectando falsos positivos que precedían defectos sobre el *splicing*.

Asimismo, estos estudios destacan la importancia de analizar cambios claramente patológicos como mutaciones de codón de parada prematuro o *frameshift*, que pudieran repercutir sobre el procesamiento del ARNm. En este estudio, se comprobó que un cambio *frameshift* (c.1342\_1343delAG, p.S448LfsX2, *MYO7A*), estaba afectando al *splicing* produciendo un transcrito anómalo del gen.

Los análisis de ARN extraído de células epiteliales nasales de pacientes permitieron confirmar que 3 de los 8 transcritos USH1 estudiados, estaban afectando al procesamiento del ARNm, de la misma forma que se había observado con minigenes. Los otros 5 transcritos USH1 estudiados, excepto el transcrito portador de la mutación c.6049G>A en el que no pudimos comprobar el efecto producido, no afectaban al procesamiento del ARNm, tal y como se había visto con minigenes.

Los estudios de ARN de células epiteliales nasales de pacientes son un buen método para determinar la naturaleza de las variantes USH1. Sin embargo, los bajos niveles

de expresión de los genes USH en este tejido, hace que sea necesario el uso de PCR-anidadas para su análisis.

El USH ha sido considerado una ciliopatía al afectar al desarrollo, cohesión y función de los cilios de las células ciliadas del oído interno y a los fotorreceptores de la retina. Los resultados del estudio de la movilidad ciliar en células epiteliales nasales de 8 pacientes diagnosticados de USH1, revelaron un patrón de batido normal, pero una ligera disminución en la frecuencia sin que conllevara un efecto sobre el fenotipo. Estos resultados concuerdan con los publicados por Armengot *et al.* (2012a) quienes observaban una disminución de la frecuencia de batido ciliar en pacientes USH2.

### **Desarrollo de una plataforma de secuenciación masiva para el diagnóstico molecular del USH**

Se diseñó un panel de 14 genes (10 genes causantes del USH y 4 genes asociados y/o candidatos) mediante la herramienta *SureDesign* (Agilent) para HaloPlex y la plataforma MiSeq (Illumina). El estudio se realizó sobre 40 pacientes USH, 8 de los cuales ya presentaban al menos una mutación conocida.

En este estudio, se obtuvo una cobertura media por *target* de 1334x. Únicamente una región exónica de 43pb correspondiente al exón 2 del gen *MYO15A*, mostró una cobertura inferior al límite utilizado para la validación y el diagnóstico (<40x). La cobertura obtenida fue muy superior al resto de trabajos publicados para los genes responsables del USH (Licastro *et al.*, 2012; Besnard *et al.*, 2014; Yoshimura *et al.*, 2014) permitiéndonos detectar no sólo mutaciones puntuales, si no también variaciones en el número de copias (CNVs), identificando grandes reordenamientos, deleciones o duplicaciones, responsables de la enfermedad.

El grupo de pacientes control, con al menos una mutación identificada previamente, permitió la validación del panel utilizado. Además, se pudo identificar la segunda mutación patológica en 5 de los 6 pacientes en los que previamente se había identificado una variante patológica.

La secuenciación masiva de estos genes permitió detectar el 79,7% de los alelos mutados de los 32 pacientes USH estudiados sin diagnóstico genético previo. Además, permitió identificar la presencia de mutaciones adicionales en otros genes USH que pudieran actuar como modificadores del fenotipo, así como posibles casos de herencia digénica y la presencia de mutaciones causantes de la enfermedad en otros genes asociados a otros tipos clínicos.

El estudio global de los 38 pacientes USH (6 pacientes con una mutación y 32 sin ninguna) permitió identificar 24 variantes patológicas nuevas y permitió determinar que el

14,28% (8/56) de los alelos mutados identificados era debido a la presencia de grandes reordenamientos, deleciones o duplicaciones.

Sin embargo, en 4 de los 32 pacientes sin ninguna mutación previa, no pudimos hallar ninguna de las dos mutaciones causantes de la enfermedad y en 5 pacientes sólo pudimos identificar una de las mutaciones causantes. Esto pudo ser debido a que las mutaciones se encontrasen en regiones no cubiertas por nuestro panel, como regiones promotoras, regiones UTRs o regiones intrónicas profundas, o por un mal alineamiento de las secuencias o que éstas no hubieran superado los filtros de calidad de los programas bioinformáticos. También cabe asumir que la causa de la enfermedad pudiera residir en otros genes USH no identificados hasta la fecha.

Ninguno de los pacientes analizados presentaba mutaciones patológicas en los 4 genes propuestos como asociados y/o candidatos. Sin embargo, esto no descarta que no puedan ser responsables de la enfermedad en otros pacientes USH no analizados.

El desarrollo de la NGS ha permitido una mayor rapidez en el diagnóstico de la enfermedad, con un menor coste por paciente; permitiendo, además, determinar la causa de la enfermedad en aquellos pacientes con una clínica atípica o sin clasificar, o la identificación de posibles casos de herencia digénica o portadores de mutaciones que pudieran producir modificaciones en el fenotipo clínico. Sin embargo, es necesario realizar mejoras en el diseño de los paneles de genes, abarcando zonas no cubiertas que pudieran contener la causa de la enfermedad, así como mejoras en las plataformas para conseguir una mejor captura en regiones ricas en homopolímeros o GCs.

- **Conclusiones**

1. El gen *USH1C* es responsable del 3,08% de los pacientes diagnosticados de USH1 de población española, considerándose como un subtipo poco frecuente del USH1.
2. En nuestra serie, las mutaciones identificadas en el gen *USH1C* son propias de cada familia, no observándose puntos calientes de mutación.
3. Los análisis *in silico* de las variantes identificadas permiten predecir la patogenicidad de una variante sobre el *splicing*. Sin embargo, los estudios funcionales de expresión son esenciales para determinar su implicación patológica sobre el procesamiento del ARNm.
4. Los minigenes son una buena estrategia para determinar el efecto de las variantes sobre el procesamiento del ARNm, sobre todo, en aquellos casos en que los genes implicados

en la enfermedad presentan perfiles de expresión restringidos a tejidos de difícil acceso.

5. Los análisis de ARN a partir de células epiteliales nasales de pacientes diagnosticados de USH1, son un buen método para discriminar variantes neutras de aquellas que afectan al *splicing*.
6. Los estudios sobre movilidad ciliar en células epiteliales nasales de pacientes diagnosticados de USH1, han mostrado una disminución estadísticamente significativa de la frecuencia del batido ciliar, aunque presenta una actividad aparentemente suficiente como para no producir un fenotipo clínico.
7. El panel de genes desarrollado para el diagnóstico molecular del USH mediante NGS ha permitido detectar el 79,7% de los alelos mutados de una cohorte de estudio de 32 pacientes USH sin diagnóstico genético previo. Además, ha permitido identificar las mutaciones causantes de la enfermedad en genes responsables de otro tipo clínico, así como detectar posibles casos de herencia digénica o variantes que pudieran actuar como modificadores del fenotipo.
8. El uso de la NGS en el diagnóstico molecular del USH, nos ha permitido identificar en la serie global de pacientes 8 grandes reordenamientos, tanto deleciones como duplicaciones, lo que supone el 14,28% de los alelos mutados responsables de la enfermedad.
9. En ninguno de los pacientes analizados mediante NGS identificamos mutaciones patológicas en los genes propuestos como asociados y candidatos al USH. Sin embargo, no podemos descartar que estos genes no puedan ser responsables de la enfermedad en otros pacientes USH no analizados.





**XI. PUBLICACIONES  
RELACIONADAS CON LA TESIS  
DOCTORAL**



- **Publicaciones relacionadas con la tesis doctoral**

**María José Aparisi**, Elena Aller, Carla Fuster-García, Gema García-García, Regina Rodrigo, Rafael P. Vázquez-Manrique, Fiona Blanco-Kelly, Carmen Ayuso, Anne-Françoise Roux, Teresa Jaijo, José María Millán. Targeted next generation sequencing for the molecular diagnosis of Usher syndrome. *Orphanet J of Rare Dis.* 2014; 9:168.

García-García G, Aller E, Jaijo T, **Aparisi MJ**, Larrieu L, Faugère V, Blanco-Kelly F, Ayuso C, Roux AF, Millán JM. Novel deletions involving the USH2A gene in patients with Usher syndrome and retinitis pigmentosa. *Mol Vis.* 2014; 20:1398 -1410.

**Aparisi MJ**, García-García G, Aller E, Sequedo MD, Martínez-Fernández de la Cámara C, Rodrigo R, Armengot M, Cortijo J, Milara J, Díaz-Llopis M, Jaijo T, Millán JM. Study of USH1 splicing variants through minigenes and transcript analysis from nasal epithelial cells. *PLoS One.* 2013, 8:e57506.

García-García G, **Aparisi MJ**, Rodrigo R, Sequedo MD, Espinós C, Rosell J, Olea JL, Mendizábal MP, Ramos-Arroyo MA, Jaijo T, Aller E, Millán JM. Two novel disease-causing mutations in the *CLRN1* gene in UH3A patients. *Mol Vis.* 2012, 18:3070-8.

García-García G, **Aparisi MJ**, Jaijo T, Rodrigo R, Leon AM, Avila-Fernandez A, Blanco-Kelly F, Bernal S, Navarro R, Diaz-Llopis M, Baiget M, Ayuso C, Millan JM, Aller E. Mutational screening of the *USH2A* gene in Spanish patients reveals 23 novel pathogenic mutations. *Orphanet J Rare Dis.* 2011, 6:65.

**Aparisi MJ**, García-García G, Jaijo T, Rodrigo R, Graziano C, Seri M, Simsek T, Simsek E, Bernal S, Baiget M, Pérez-Garrigues H, Aller E, Millán JM. Novel mutations in the *USH1C* gene in Usher syndrome patients. *Mol Vis.* 2010, 16:2948-54.

Aller E, Jaijo T, García-García G, **Aparisi MJ**, Blesa D, Díaz-Llopis M, Ayuso C, Millán JM. Identification of large rearrangements of the *PCDH15* gene by combined MLPA and a CGH: large duplications are responsible for Usher syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010, 51:5480-5.

Jaijo T, Aller E, **Aparisi MJ**, García-García G, Hernan I, Gamundi MJ, Nájera C, Carballo M, Millán JM. Functional analysis of splicing mutations in *MYO7A* and *USH2A* genes. *Clin Genet.* 2011, 79:282-8.

Aller E, Jaijo T, van Wijk E, Ebermann I, Kersten F, García-García G, Voesenek K, **Aparisi MJ**, Hoefsloot L, Cremers C, Díaz-Llopis M, Pennings R, Bolz HJ, Kremer H, Millán JM. Sequence variants of the *DFNB31* gene among Usher syndrome patients of diverse origin. *Mol Vis.* 2010, 16:495-50.

Jaijo T, Aller E, García-García G, **Aparisi MJ**, Bernal S, Avila-Fernández A, Barragán I, Baiget M, Ayuso C, Antiñolo G, Díaz-Llopis M, Külm M, Beneyto M, Nájera C, Millán JM. Microarray-based mutation analysis of 183 Spanish families with Usher syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010, 51:1311-7.

## **XII. ABREVIATURAS**



- **Abreviaturas**

<b>AAV</b>	<i>Adeno-Associated Virus</i>
<b>ADNc</b>	<i>Ácido Desoxirribonucleico-complementario</i>
<b>ANK</b>	<i>Ankyrin</i>
<b>AON</b>	<i>Antisense Oligonucleotides</i>
<b>Amp<sup>r</sup></b>	<i>Ampicillin resistance</i>
<b>ARNm</b>	<i>Ácido ribonucleico-mensajero</i>
<b>ARNt</b>	<i>Ácido ribonucleico-transferencia</i>
<b>Array-CGH</b>	<i>Array-Comparative Genomic Hybridization</i>
<b>ARRP</b>	<i>Nonsyndromic Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa</i>
<b>BIAP</b>	<i>Bureau International d'Audiophonologie</i>
<b>CaX-B</b>	<i>Calcium Exchanger <math>\beta</math></i>
<b>CC</b>	<i>Coiled-coil</i>
<b>CEN</b>	<i>Central Region</i>
<b>CIB2</b>	<i>Calcium and Integrin Binding Protein</i>
<b>CNTF</b>	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
<b>CNVs</b>	<i>Copy Number Variations</i>
<b>DFNA</b>	<i>Nonsyndromic deafness autosomal dominant</i>
<b>DFNB</b>	<i>Nonsyndromic deafness autosomal recessive</i>
<b>DHA</b>	<i>Docosahexaenoic Acid</i>
<b>EAR/EPTP</b>	<i>Epilepsy Associated Repeat/Epitempin Repeat</i>
<b>EC</b>	<i>Extracelular Cadherin Repeats</i>

<b>EGF-Lam</b>	<i>Laminin EGF (Epidermal Growth Factor)-like</i>
<b>ERG</b>	<i>Electroretinography</i>
<b>FERM</b>	<i>4.1, Ezrin, Radixin, Moesin</i>
<b>FN3</b>	<i>Fibronectin type III</i>
<b>FRET</b>	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
<b>GCL</b>	<i>Ganglion Cell Layer</i>
<b>GPS</b>	<i>Glutathione S-Transferase</i>
<b>INL</b>	<i>Inner Nuclear Layer</i>
<b>IPL</b>	<i>Inner Plexiform Layer</i>
<b>IPSCs</b>	<i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
<b>IQ</b>	<i>Isoleucine-Glutamine</i>
<b>LamG</b>	<i>Laminin G-like</i>
<b>LamNT</b>	<i>Laminin N-terminal</i>
<b>MAF</b>	<i>Minor Allele Frequency</i>
<b>MCS</b>	<i>Multiple Cloning Site</i>
<b>MLPA</b>	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
<b>MyTH4</b>	<i>Myosin Tail Homology4</i>
<b>NGS</b>	<i>Next Generation Sequencing</i>
<b>NMD</b>	<i>Nonsense Mediated Decay</i>
<b>ONL</b>	<i>Outer Nuclear Layer</i>
<b>OPL</b>	<i>Outer Plexiform Layer</i>
<b>OtoSCOPE</b>	<i>Otologic Sequence Capture of Pathogenic Exons</i>
<b>OtoSeq</b>	<i>Microdroplet PCR-based Target Enrichment</i>



<b>PMB</b>	<i>PDZ Binding Motif</i>
<b>P-rich</b>	<i>Prolin-rich</i>
<b>PDZ</b>	<i>PSD95, Disc large, ZO-1(Zonula ocludens-1)</i>
<b>PDZD7</b>	<i>PDZ Domain-Containing Protein 7</i>
<b>PST</b>	<i>Prolin Serin Threonine-rich</i>
<b>RP</b>	<i>Retinosis pigmentaria</i>
<b>RPE</b>	<i>Retinal Pigment Epithelium</i>
<b>RT</b>	<i>Reverse Transcription</i>
<b>SAH</b>	<i>Single Alpha Helix</i>
<b>SAM</b>	<i>Sterile Alpha Motif</i>
<b>SH3</b>	<i>Src Homology 3</i>
<b>SMRT</b>	<i>Single Molecule Real Time Sequencing</i>
<b>SP</b>	<i>Signal Peptide</i>
<b>TM</b>	<i>Transmembrane</i>
<b>TRIDs</b>	<i>Translational Read-through-Inducing Drugs</i>
<b>USH</b>	<i>Usher syndrome</i>
<b>USH1</b>	<i>Usher syndrome type I</i>
<b>USH2</b>	<i>Usher syndrome type II</i>
<b>USH3</b>	<i>Usher syndrome type III</i>
<b>VNTR</b>	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
<b>WES</b>	<i>Whole Exome Sequencing</i>
<b>WGS</b>	<i>Whole Genome Sequencing</i>
<b>WT</b>	<i>Wild Type</i>

**ZFN**

*Zinc Finger*

## **XIII. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS**



- **Índice de Tablas**

**Tabla 1.** Tipos clínicos del USH.

**Tabla 2.** Subtipos genéticos del USH.

**Tabla 3.** Comparación de las plataformas de secuenciación de nueva generación de bancada: Ion Torrent, 454 GS Junior y MiSeq con la secuenciación tradicional Sanger.

**Tabla 4.** Modelos animales de ratón desarrollados para el USH.

**Tabla 5.** Selección de variantes presuntamente implicadas en un *splicing* anómalo, en base a los resultados obtenidos con los 4 programas bioinformáticos: *SpliceView*, *NNSplice*, *NetGene2* y *HSF*.

**Tabla 6.** Resultado del análisis con minigenes de las variantes USH1 implicadas en el procesamiento erróneo del ARNm.

- **Índice de Figuras**

**Figura 1.** Representación del oído humano.

**Figura 2.** Representación del órgano de Corti.

**Figura 3.** Representación de los estereocilios de las células ciliadas del oído interno.

**Figura 4.** Representación del sistema vestibular.

**Figura 5.** Anatomía del globo ocular humano.

**Figura 6.** Estructura interna de la retina.

**Figura 7.** Representación de los dos tipos de fotorreceptores: bastones y conos.

**Figura 8.** Representación de la visión normal frente la visión en túnel producida por RP.

**Figura 9.** Fotografía del fondo de ojo de una persona sana y un afecto de RP.

**Figura 10.** Representación de la proteína miosina VIIa.

**Figura 11.** Esquema de las tres isoformas de la harmonina (a, b y c).

**Figura 12.** Representación de las isoformas codificadas por el gen *CDH23*.

**Figura 13.** Representación de la proteína protocadherina 15.

**Figura 14.** Representación de la proteína SANS codificada por el gen *USH1G*.

**Figura 15.** Representación de la proteína codificada por el gen *CIB2*.

**Figura 16.** Representación de la isoforma corta (a) y larga (b) de la usherina.

**Figura 17.** Representación de la proteína VLGR1b codificada por el gen *GPR98*.

**Figura 18.** Representación de las dos isoformas codificadas por el gen *DFNB31*.

**Figura 19.** Representación de la clarina-1.

**Figura 20.** Representación de las tres isoformas de la proteína PDZD7.

**Figura 21.** Representación de la proteína miosina XVa.

**Figura 22.** Representación de las uniones formadas entre los estereocilios y cinetocilio a lo largo de su desarrollo.

**Figura 23.** Interactoma formado por las proteínas USH2 en las *ankle links*.

**Figura 24.** Interactoma formado por las proteínas USH1 en la diferenciación del estereocilio.

**Figura 25.** Representación del interactoma formado por las proteínas USH2 en los fotorreceptores.

**Figura 26.** Representación del vector pSPL3.

**Figura 27.** Representación del protocolo de minigenes.

**Figura 28.** Análisis de segregación familiar de la mutación c.480\_481delGT (p.S161HfsX16) identificada en la familia FRP-39.

**Figura 29.** Expresión del gen *CIB2* en células epiteliales nasales.

**Figura 30.** Representación del porcentaje de pacientes del grupo de estudio en los que identificamos mutaciones patológicas mediante NGS.

**Figura 31.** Diagrama del tipo de mutaciones identificadas mediante NGS, incluyendo los 32 pacientes del grupo de estudio y los 6 pacientes del grupo control en los que habíamos identificamos otra mutación patológica con anterioridad.

- **Apéndice**

**Tabla S1.** *Primers* empleados en la PCR-anidada para la amplificación del transcrito del gen *CIB2*, a partir de ARN de células epiteliales nasales.

