

# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR EN INDIVIDUOS COLOMBIANOS CON ALBINISMO OCULOCUTÁNEO (OCA)

## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF OCULOCUTANEOUS ALBINISM (OCA) IN A COLOMBIAN COHORT

María C. Lattig<sup>1</sup>, Diana Sanabria<sup>1</sup>, Ángela Fernández<sup>2</sup>, Natalio Izquierdo<sup>3</sup>, Oscar Urtatiz<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Universidad de los Andes, Laboratorio de Genética Humana. Bogotá, Colombia.

<sup>2</sup> Hospital Militar Central. Bogotá, Colombia.

<sup>3</sup> Universidad de Puerto Rico. San Juan, Puerto Rico.

Recibido: Agosto 30 de 2013

Aceptado: Septiembre 17 de 2013

\*Correspondencia del autor. Universidad de los Andes, Cra 1 N° 18A- 12 Bloque M1, Bogotá, Colombia

Email: oa.urtatiz45@uniandes.edu.co.

### RESUMEN

El albinismo oculocutáneo (OCA, por sus siglas en inglés) es un grupo de desórdenes hereditarios autosómicos recesivos que involucran daños en la biosíntesis de melanina. Existen cuatro tipos de OCA que van desde OCA1 hasta OCA4. A nivel molecular se han reportado más de 230 mutaciones en el gen *TYR* como responsable de OCA1 cuyo fenotipo es el más severo y frecuente a nivel mundial de los tipos de OCA. En este estudio se realizó el primer tamizaje molecular del gen *TYR* en 20 casos de individuos albinos colombianos. Mediante la amplificación por PCR y posterior secuenciación por Sanger de las regiones codificantes del gen *TYR*, se encontraron tres mutaciones no reportadas en la literatura. Mediante análisis bioinformáticos se determinó que estas mutaciones tienen un impacto altamente dañino en la estructura y función de la enzima tirosinasa. En 11 individuos fue posible encontrar en ambos alelos del gen *TYR* una mutación que pudiera explicar el fenotipo albino. Sin embargo aún quedan 9 individuos (45%) que requieren el tamizaje molecular de otro gen relacionada con OCA debido a que el tamizaje inicial del gen *TYR* por sí solo no explicaba el fenotipo albino. Para este propósito proponemos analizar el gen *OCA2*. El objetivo de este estudio es entonces el de conocer las bases moleculares de OCA en individuos colombianos con el fin de entender más a fondo la genética e historia de esta condición en nuestra población y poder ofrecer una adecuada asesoría genética.

**Palabras Claves:** Albinismo, tamizaje molecular, gen *TYR*, enzima tirosinasa, mutación fundadora, Colombia.

## ABSTRACT

Oculocutaneous albinism (OCA) is a genetic condition of melanin synthesis that results in hypopigmented hair, skin, and eyes. OCA1, one of the four types of OCA is the most frequent worldwide and is caused by mutations in *TYR* gene. In the present study, we perform the first mutation screening of *TYR* gene in 20 unrelated Colombian cases with OCA. Using PCR and Sanger sequencing of the *TYR* gene coding-region, we found three novel mutations c.551C>G (S184X), c.739T>C (C246R) and c.163 T>G (p.C55G). Bioinformatics analysis showed a probably damaging impact of these mutations on the structure and function of *TYR* protein using straightforward physical and comparative considerations. We found that 11 individuals had two mutations which could explain their albinism. Thus, we still have 9 individuals which need a mutation screening of another gene related to OCA. To this purpose, we propose the *OCA2* gene. The purpose of this study was to identify the molecular basis of oculocutaneous albinism (OCA) in a cohort of 20 Colombian individuals in order to understand the history of the condition in our population and to offer a correct genetics counseling.

**Key words:** albinism, mutation screening, *TYR* gene, tyrosinase enzyme, founder mutation, Colombia.

## INTRODUCCIÓN

El albinismo oculocutáneo (Oculocutaneous Albinism, OCA) es una condición que presenta heterogeneidad clínica y genética. Se caracteriza por ser un desorden de herencia autosómica recesiva definida clínicamente por la ausencia parcial o total de la melanina, la cual es producida en los melanocitos que se encuentran en cabello, piel y ojos (1,2). Los melanocitos de tipo cutáneos se encuentran en cabello y piel, mientras que los melanocitos extracutáneos se encuentran en los ojos y cóclea. Ambos tipos de melanocitos provienen de diferentes linajes ectodermales (3). En individuos con OCA, es común la presencia de anormalidades en el sistema óptico relacionado con la reducción de melanina durante el desarrollo embrionario. Las manifestaciones oftalmológicas incluyen hipopigmentación de iris, nistagmo, hipoplasia macular, estrabismo y fotofobia (4-7).

El albinismo oculocutáneo ha sido reportado en casi todas las poblaciones humanas con una frecuencia promedio de 1 de 17.000 personas, es decir que aproximadamente uno de cada setenta individuos es portador de mutaciones en genes implicados en OCA (8). La prevalencia de los diferentes tipos de albinismo varían a nivel mundial probablemente porque es muy difícil de diagnosticar clínicamente un tipo de OCA entre el amplio espectro de pigmentación de la población. Existen cuatro tipos de OCA que van desde OCA1 hasta OCA4, siendo el OCA1 el más severo y más frecuente (9). Hasta el momento a nivel mundial han sido reportadas más de 230 mutaciones en el gen *TYR* como responsables de OCA1. El tipo *OCA2* es el segundo en prevalencia y es causado por mutaciones en el gen *OCA2* (10). El tipo *OCA3* causado por mutaciones en el gen *TYRP1* es frecuente en población de África, mientras que el úl-

timo tipo, *OCA4* es causado por mutaciones en el gen *SCL45A2* y es frecuente en población de Asia (11).

Aproximadamente el 50% de los casos de OCA a nivel mundial son del tipo OCA1 (12). El gen *TYR* está localizado en el cromosoma 11q14.3. Este gen está compuesto por 5 exones que codifican para una proteína de 529 aminoácidos denominada enzima tirosinasa (13). Esta enzima es una proteína que utiliza cobre como cofactor y está encargada de catalizar la conversión de tirosina a L-dihidroxifenilalanina (DOPA) y de DOPA a DOPAquinona en la ruta metabólica de la biosíntesis de la melanina (14). OCA1 está dividida clínicamente en dos subtipos: OCA1A, en el cual no hay actividad de la enzima tirosinasa, y OCA1B, caracterizada por una baja actividad de la tirosinasa. A nivel molecular, en el OCA1A y en el OCA1B los dos alelos del gen *TYR* presentan mutaciones. Sin embargo, con frecuencia se ha encontrado que algunos individuos con OCA1B, solo presentan una mutación en este gen y en algunos de estos casos, se ha hallado otra mutación en el gen *OCA2* (15). El gen *OCA2* está localizado en el cromosoma 15q11.2-q12 (16). Este gen está compuesto por 24 exones que codifican para una proteína de 828 aminoácidos. La proteína codificada por este gen es importante para una normal biogénesis de los melanosomas (17) y para un procesamiento y transporte normal de las proteínas del melanosoma como TYR y TYRP1 (18,19).

A pesar de que estudios semejantes se han realizado en algunos países de Europa y Estados Unidos, en ningún país de Suramérica se ha hecho este tipo de estudio. En Colombia, no hay estudios sobre las bases moleculares y clínicas de individuos con albinismo oculocutáneo, siendo este el primer estudio de esta magnitud en el país y en la región. El desarrollo de nuevo conocimiento so-

bre esta condición en el país será de gran beneficio para llevar a cabo una correcta asesoría genética en los individuos y familias con albinismo ya que se conocerán las mutaciones más frecuentes en el país. Asimismo, el descubrimiento de mutaciones en nuestra población que han sido reportadas anteriormente en otras poblaciones humanas, nos daría indicios acerca de la historia evolutiva de esta condición en la población colombiana. Por último, este estudio brindara herramientas de educación y sensibilización en la sociedad sobre la condición albina. Por lo mencionado anteriormente, el objetivo general de este estudio fue realizar un tamizaje mutacional del gen *TYR* en 20 individuos colombianos con albinismo oculocutáneo OCA1A/B.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo hace parte de un macro proyecto que busca realizar una caracterización clínico-molecular en individuos con OCA en nuestro país. La parte de caracterización molecular es el objetivo de este trabajo.

Los individuos participantes del proyecto fueron informados de los protocolos a realizar. Todos aprobaron y firmaron un consentimiento informado en conformidad de lo establecido en la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud “Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud” para la investigación en seres humanos y aprobado por el comité de ética de la Universidad de los Andes. La mayoría de individuos fueron contactados por la Fundación Contraste – Albinos por Colombia y seleccionados por nuestro grupo de investigación una vez se constataba el fenotipo albino. Parámetros como hipopigmentación de piel, nistagmo, estrabismo, antecedente de albinismo y endogamia en la familia eran algunos de los criterios para seleccionar a los individuos. La muestra de estudio constó de individuos provenientes de Boyacá, Cundinamarca, Tolima, Meta y Bogotá. Posteriormente se realizó la extracción de ADN de aproximadamente 10 ml de sangre periférica utilizando el kit comercial Corpogen DNA 2000®. Luego de su inscripción cada participante recibió un código de identificación con el fin de proteger la privacidad del individuo. Al final se evaluó una muestra de 20 casos de individuos con OCA, no relacionados entre sí.

**Análisis Mutacional (Amplificación y secuenciación del gen *TYR*):** Para la amplificación de la secuencia codificante del gen *TYR* se diseñaron seis parejas de primers: cuatro para amplificar el primer exón y las otras

dos, para los exones II y III respectivamente, incluyendo entre 60 y 100 pb de las zonas intrónicas flanqueantes (20). Con respecto a los exones IV y V, dada la alta homología que presentan con el pseudogen *TYRL*, un estudio previo (21) propuso una pareja de primers para cada uno de estos exones que fueron empleados en este trabajo (Tabla 1). Posteriormente los productos amplificados se secuenciaron mediante la técnica de Sanger y se alinearon y compararon con la secuencia referencial del gen *TYR* disponible en GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/> (Gene ID: 7299). Se usarán dos softwares para este propósito: *CLC Genomics Workbench 4* creado por CLC Bio y *Geneious* versión 4.8.3 creado por Biomatters. Las mutaciones de-novo que se encontraron en este estudio fueron reportadas a la base de datos de la Universidad de Minnesota *Albinism Database, International Albinism Center* (<http://albinismdb.med.umn.edu/index.html>), curada por William Oetting y al National Center for Biotechnology Information (NCBI). Una vez identificadas en cada individuo se realizará un tamizaje de portadores en los parientes que deseen participar.

## RESULTADOS

Se encontraron tres mutaciones no reportadas en la literatura, c.551C>G (p.S184X), c.739T>C (p.C247R) y c.163T>G (p.C55G). Las tres mutaciones *de-novo* estaban presentes en estado heterocigoto en el exón 1 y por lo menor una de ellas (S184X) fue heredada por lado paterno. Así mismo en cinco individuos no se encontraron mutaciones en la región codificante del gen *TYR*.

En 11 de los 20 casos (55%) fue posible encontrar en ambos alelos del gen *TYR* una mutación que pudiera explicar el fenotipo albino. La mutación c.140G>A (G47D) ubicada en el exón 1 fue encontrada en 8 casos (5 en estado homocigoto y 3 en estado heterocigoto compuesto). También se encontraron mutaciones en menos casos como la c.124G>A (D42N) y la c.230G>A (R77Q) las cuales ya habían sido descritas en la literatura (22,23).

Además se encontró la variante termosensible c.1205G>A (R402Q) en estado heterocigoto en cuatro casos. Estudios han mostrado que células transfectadas con la variante R402Q muestran una actividad enzimática nula de la tirosinasa a 37°C, mientras que a una temperatura de 31°C las células transfectadas presentan una actividad comparable con células silvestres. (24-27).

**Tabla 1.** Resumen de mutaciones encontradas en gen *TYR*.

Individual	Independent Families	Age	Sex	Mutation 1			Mutation 2		
				Nucleotide change	AA change	Parent	Nucleotide change	AA change	Parent
OCA_01	1	27	F	c.140G>A	p.G47D	F	c.140G>A	p.G47D	M
OCA_02	2	5	F	c.140G>A	p.G47D	F	c.124G>A	p.D42N	M
OCA_03	3	38	M	NF			NF		
OCA_04	4	21	M	NF			NF		
OCA_05	5	19	F	c.163 T>G	p.C55G		c.124G>A	p.D42N	
OCA_06	6	30	M	c.140G>A	p.G47D		c.124G>A	p.D42N	
OCA_07	7	64	F	c.739T>C	C247R		NF		
OCA_08		52	M	c.739T>C	C247R		c.1205G>A	p.R402Q	
OCA_09	8	29	F	c.1205G>A	p.R402Q		NF		
OCA_10	9	27	M	NF			NF		
OCA_11	10	18	M	c.1205G>A	p.R402Q		NF		
OCA_12	11	31	F	c.1205G>A	p.R402Q		NF		
OCA_13	12	35	M	c.230G>A	p.R77Q	F	c.230G>A	p.R77Q	M
OCA_14	13	35	M	c.140G>A	p.G47D	F	c.140G>A	p.G47D	M
OCA_15	14	23	M	NF			NF		
OCA_16	15	22	F	NF			NF		
OCA_17	16	52	M	c.140G>A	p.G47D	F	c.140G>A	p.G47D	M
OCA_18	17	25	M	c.140G>A	p.G47D	F	c.140G>A	p.G47D	M
OCA_19	18	42	F	c.140G>A	p.G47D	F	c.140G>A	p.G47D	M
OCA_20	19	62	M	c.551C>G	p.S184X		c.140G>A	p.G47D	
OCA_21	20	16	M	c.551C>G	p.S184X	F	NF		

Novel mutations are shaded. NF, not found; M, mother; F, father

## DISCUSIÓN/CONCLUSIONES

Si bien se pudo determinar las mutaciones presentes en ambos alelos del gen *TYR* en 11 individuos de una muestra albina de nuestro país, aún quedan 9 individuos (45%) que requieren el tamizaje molecular de otro gen con el fin de encontrar aquellas mutaciones faltantes que expliquen el fenotipo albino. Estos resultados son congruentes con lo reportado en la literatura (15), por lo tanto es necesario continuar este tamizaje molecular en el gen *OCA2*, ya que mutaciones en este gen causan la segunda forma más frecuente de OCA (cerca del 30% de los casos mundialmente) (12). Actualmente, estamos llevando a cabo el diseño y compra de primers para amplificar y secuenciar los 24 exones de este gen en aquellos individuos para los cuales no se encontró ninguna mutación en el gen *TYR* o solo se encontró en un alelo. Esperamos tener los resultados de este tamizaje molecular antes de la fecha del congreso ACCB para de esta forma completar la tabla 1 y determinar la frecuencia de mutaciones en el gen *TYR* y *OCA2* en una muestra de población Colombiana con albinismo oculocutáneo.

Este sería el primer estudio de esta magnitud en Sudamérica.

Respecto a las tres mutaciones *de-novo* encontradas en este estudio, dos de ellas, p.C247R y p.C55G son mutaciones no-sinónimas (missense), es decir, la sustitución de un nucleótido genera un cambio de codón por lo cual se produce un aminoácido diferente. Este cambio de aminoácido puede tener o no un efecto importante en la estructura de la proteína. Para predecir el posible impacto de la sustitución de aminoácido en la estructura y función de la proteína tirosinasa por parte de las dos mutaciones *de-novo* encontradas utilizamos el programa PolyPhen-2 versión 2.2.2 (28). De acuerdo a la simulación por parte de este software, ambas mutaciones son altamente dañinas en la estructura de la enzima tirosinasa (ver material suplementario). La mutación C247R es el cambio de una cisteína por una arginina en la posición 247 de la proteína, mientras que la mutación C55G es el cambio de una cisteína por una glicina en la posición 55. La última mutación *de-novo* encontrada, p.S184X, es una mutación sin sentido (nonsense),

la cual genera un codón de parada. En este caso no se hizo un análisis bioinformático debido a que el efecto que una mutación sin sentido generaría en una proteína es bastante obvio y más si tenemos en cuenta que esta mutación se encuentra ubicada en el primer exón.

La mutación c.140G>A (p.G47D) se encontró con una alta frecuencia en nuestra muestra de estudio (40%). La mutación no-sinónima G47D consiste de una sustitución de guanina por adenina en el nucleótido 140 en el exón 1 del gen *TYR* generando un cambio en el codón 47 del RNAm produciendo ácido aspártico en lugar de glicina. Esta mutación también presenta un impacto significativo en la función y estructura de la tirosinasa de acuerdo a la simulación por PolyPhen 2 (ver suplementario). Interesantemente, la mutación G47D también ha sido reportada en población albina judío sefardita y de Puerto Rico, presentando un mismo haplotipo genético, lo cual sugiere que la mutación G47D en ambas poblaciones tiene el mismo origen (29,30). Se cree que esta mutación se originó en el pueblo judío-marroquí y judío-sefardita. Esta población tuvo varias oleadas de emigración y durante el siglo XV llegaron a América huyendo de Europa por aspectos religiosos del momento. Las islas canarias y Puerto Rico hacían parte de los lugares que visitaron durante sus viajes de exploración (31). En base a lo anterior es posible pensar que esta mutación pudo haber llegado a nuestra población Colombiana desde hace mucho tiempo generando un número de portadores (efecto fundador), que de igual forma, probablemente tuvo origen en la población judío sefardita que llegó a América en el siglo XV. Para comprobar si la mutación G47D presente en nuestra población se debe a un efecto fundador, es necesario realizar un análisis de haplotipo de los individuos colombianos que tienen la mutación G47D y compararlo con el haplotipo reportado en población Judío-Sefardita y de Puerto Rico. En el momento ya tenemos analizados en nuestra muestra de estudio dos de los tres polimorfismos reportados en los estudios previos (29,30). Actualmente estamos trabajando en la identificación del último polimorfismo para tener finalmente el haplotipo de nuestra muestra Colombiana (más información en Suplementos). De igual forma, pronto tendremos dos muestras de ADN de individuos con la mutación G47D en estado homocigoto provenientes de Puerto Rico, esto nos permitirá evaluar más sitios polimórficos para tener más claridad y exactitud del haplotipo entre ambas poblaciones y conocer más acerca de la historia evolutiva de esta condición en la población colombiana.

Aun es debatible la contribución de la variante termosensible p.R402Q en el fenotipo albino. Se sabe que esta variante alélica altera el plegamiento de la enzima tirosinasa afectando el tráfico intracelular de esta proteína (26,27). Sin embargo, esta variante por sí sola no es suficiente para generar el fenotipo albino ya que se ha encontrado en estado homocigoto en individuos que no presentan la condición albina (32,33). Por lo cual se cree que esta variante es importante solo cuando está acompañada de cierto antecedente genético en el individuo. Se ha visto que la variante p.R402Q es más común en individuos que presentan una sola mutación en uno de los genes relacionados con OCA comparado con aquellos que tienen dos mutaciones (34-36). Esto soporta la necesidad de hacer un tamizaje molecular del gen *OCA2* en aquellos individuos que tienen la variante p.402Q y no presentan una mutación en el gen *TYR*.

### AGRADECIMIENTOS

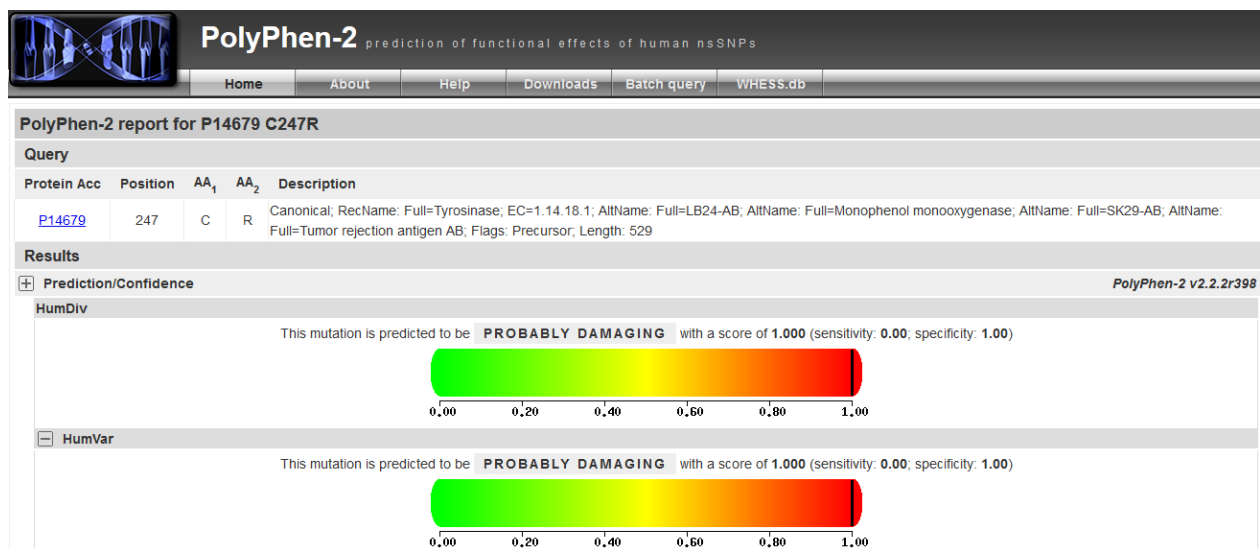
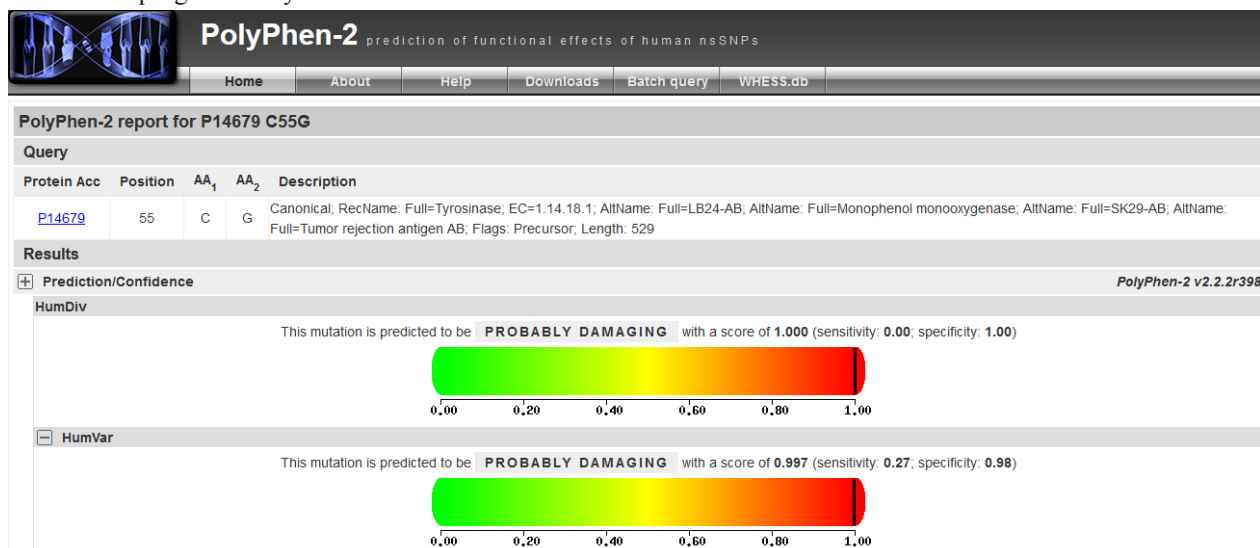
En primer lugar a la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes y al Comité de Investigaciones y Posgrados de la Facultad por su apoyo económico a través de la convocatoria 2013-1 para la financiación de proyectos de investigación.

En segunda medida a la Fundación Contraste –Albinos por Colombia por el apoyo y contacto de las familias e individuos participantes en el proyecto. Gracias a cada uno de los participantes por su paciencia y solidaridad en el proyecto.

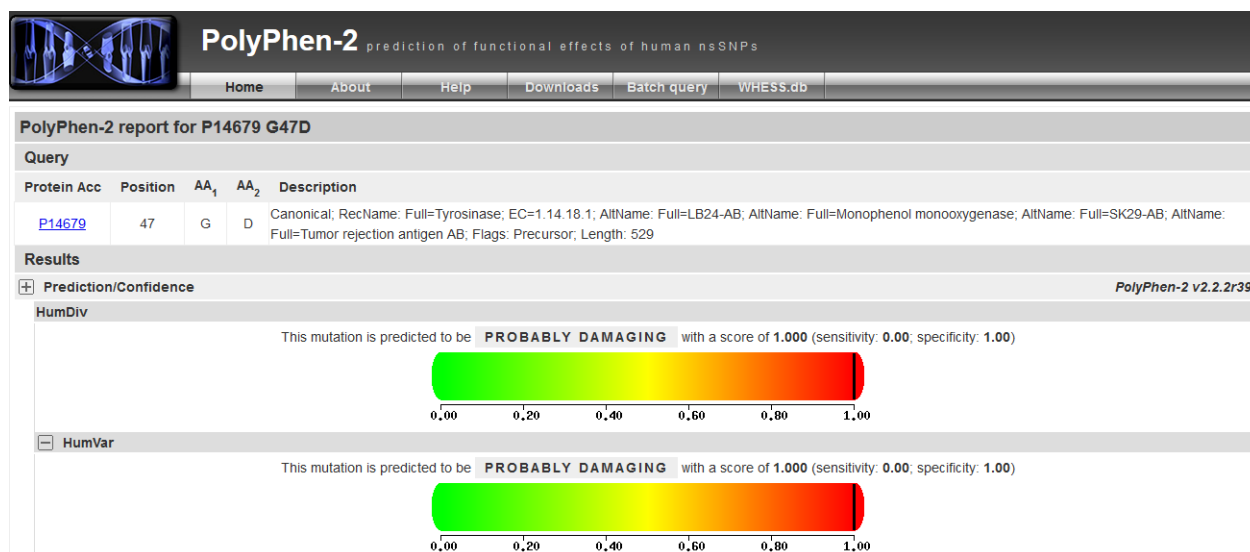
A los Doctores Ángela Fernández y Natalio Izquierdo por su asesoría en la parte clínica y en la evaluación oftalmológica de los participantes del proyecto.

## MATERIAL SUPLEMENTARIO

**Suplemento 1.** Análisis Bioinformático del posible impacto en la proteína de las mutaciones de-novo C55G y C247R mediante el programa PolyPhen-2 versión 2.2.2.



**Suplemento 2.** Reporte de la mutación G47D mediante PolyPhen-2.



**Suplemento 3.** Análisis de Haplotipo para la mutación G47D

Para identificar si la mutación G47D en nuestra población presenta el mismo haplotipo encontrado en población judío sefardita (29) y en población puertorriqueña (30) utilizaremos los tres sitios polimórficos reportados en estas poblaciones y que están cerca al gen tirosinasa.

**Tabla 2.** Polimorfismos en el gen TYR que conforman el haplotipo referencia.

Población	Polimorfismo		
	192Y/S	-199C/A	(GA) <sub>n</sub>
Judío Sefardita	+ / +	+ / +	298/298
Puerto Rico	+ / +	+ / +	298/298

El signo (+) denota la presencia del polimorfismo en uno de los alelos.

El primer sitio polimórfico denominado Y/S192, consiste en una sustitución de citosina por adenina en el nucleótido 575 del primer exón del gen *TYR*. Este polimorfismo (TAT) genera un cambio no-sinónimo de serina por tirosina en el aminoácido 192 sin alterar la viabilidad de la proteína (37). El segundo polimorfismo denominado -199C/A, se encuentra localizado en la región promotora del gen tirosinasa específicamente en el nucleótido -199, consiste de un cambio de citosina por adenina. Para la detección de este polimorfismo (CCAATTC) se usara la enzima de restricción TaqI con sitio de corte TCGA permitiendo determinar los individuos que presenten este polimorfismo (38). El tercer sitio polimórfico (-259/GAGA) que hace parte del haplotipo es un STR (Short Tandem Repeat) conformado por repeticiones de GA en la región promotora del gen *TYR* [39]. La genotipación de este polimorfismo se hará usando una pareja de primers diseñada por nosotros y marcada con fluoresceína (FAM). Luego de su amplificación por PCR cada fragmento será identificado y separado por la maquina ABI PRISM del laboratorio de secuenciación de la Universidad de los Andes. Los resultados de los polimorfismos encontrados en nuestra población serán comparados con el haplotipo referencia (Tabla 2) presente en individuos con OCA1 en población judío sefardita y de Puerto Rico que también presentan la mutación G47D.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Mohamed AF, El-Sayed NS, Seifeldin NS. Clinico-epidemiologic features of oculocutaneous albinism in northeast section of Cairo – Egypt. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 2010; 11(2), 167-172.
2. King R, Pietsch J, Fryer J, et al. Tyrosinase gene mutations in oculocutaneous albinism 1 (OCA1): definition of the phenotype. *Hum Genet*. 2003; 113:502-13
3. Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrest BA. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009; 66:1493–506
4. Meyer CH, Lapolice DJ, Freedman SF. Foveal hypoplasia in oculocutaneous albinism demonstrated by optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol*. 2002; 133:409-10.
5. Creel D. Problems of ocular miswiring in albinism, Duane’s syndrome, and Marcus Gunn phenomenon. *Int Ophthalmol Clin*. 1984; 24:165-76.
6. Creel D, Summers C, King R. Visual anomalies associated with albinism. *Ophthalmic Paediatr Genet*. 1990; 11:193-200.
7. Abadi RV. Mechanisms underlying nystagmus. *J R Soc Med*. 2002; 95:231-4.
8. Gronskov K, Ek J, Brondum-Nielsen K. (2007). Oculocutaneous albinism. *Orphanet J Rare Dis*, 2, 43.
9. Hutton SM, Spritz RA. Comprehensive analysis of oculocutaneous albinism among non-Hispanic caucasians shows that OCA1 is the most prevalent OCA type. *J Invest Dermatol*, 2008; 128(10), 2442-2450.
10. Rinchik EM, Spritz RA, Avidano KM, Nicholls RD. A gene for the mouse pink-eyed dilution locus and for human type II oculocutaneous albinism. *Nature*. 1993; 361: 72-76.
11. Sturm RA, Teasdale RD, Box NF. Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene*, 2001; 277(1-2), 49-62.
12. Roorick C. et al. High resolution mapping of OCA2 intragenic rearrangements and identification of a founder effect associated with a deletion in Polish albino patients. *Human genetics*, 2001; 129:199–208.
13. Barton D, Kwon B, Francke U. Human tyrosinase gene, mapped to chromosome 11 (q14-q21), defines second region of homology with mouse chromosome 7. *Genomics*. 1988; 3: 17-24
14. Cooksey CJ, Garratt PJ, Land EJ, et al. Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *J Biol Chem*. 1997; 272: 26226-35.
15. Adams DR, et al. DNA Variations in Oculocutaneous Albinism: An Updated Mutation List and Current Outstanding Issues in Molecular Diagnostics. *Human mutation* 2013; 34 (6) 827–835.
16. Lee S, Nicholls R, Jong M, Fukai K, Spritz R. Organization and sequence of the human P gene and identification of a new family of transport proteins. *Genomics* 1995, 26:354-363.
17. Orlow SJ, Brilliant MH. The pink-eyed dilution locus controls the biogenesis of melanosomes and levels of melanosomal proteins in the eye. *Exp Eye Res*. 1999, 68:147-154
18. Manga P, Boissy RE, Pifko-Hirst S, Orlow S.J. Mislocalization of melanosomal proteins in melanocytes from mice with oculocutaneous albinism type 2. *Exp Eye Res*. 2001; 72:695-710.
19. Toyofuku K, et. al. The etiology of oculocutaneous albinism (OCA) type II: the pink protein modulates the processing and transport of tyrosinase. *Pigment Cell Res*. 2002; 15:217-224.
20. Sanabria D, Groot H, Guzmán J, Lattig MC. (2012) Una mirada al albinismo oculocutáneo: reporte de mutaciones en el gen TYR en cinco individuos colombianos. *Biomédica*, 2012; 32(2).
21. Chaki M, Mukhopadhyay A, Ray K. Determination of variants in the 3’-region of the tyrosinase gene requires locus specific amplification. *Hum Mutat*. 2005; 26:53-8.
22. Chaki M, Sengupta M, Mukhopadhyay A, et al. (2006) OCA1 in different ethnic groups of india is primarily due to founder mutations in the tyrosinase gene. *Ann Hum Genet*. 2006; 70:623-30.
23. Takeda A, Tomita Y, Matsunaga J, Tagami H, Shibahara S. Molecular basis of tyrosinase-negative oculocutaneous albinism. A single base mutation in the tyrosinase gene causing arginine to glutamine substitution at position 59. *J Biol Chem*; 1990; 265:17792-7
24. Tripathi RK, Giebel LB, Strunk KM, Spritz RA. (1991) A polymorphism of the human tyrosinase gene is associated with temperature-sensitive enzymatic activity. *Gene Expr* 1991; 1:103-10.



25. Berson JF, Frank DW, Calvo PA, Bieler BM, Marks MS. A common temperaturesensitive allelic form of human tyrosinase is retained in the endoplasmic reticulum at the nonpermissive temperature. *J Biol Chem.* 2000; 275:12281-9.
26. Tripathi RK, Hearing VJ, Urabe K, Aroca P, Spritz RA. Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase. *J Biol Chem.* 1992; 267:23707-12.
27. Toyofuku K, Wada I, Valencia JC, Kushimoto T, Ferrans VJ, Hearing VJ. Oculocutaneous albinism types 1 and 3 are ER retention diseases: mutation of tyrosinase or Tyrp1 can affect the processing of both mutant and wild-type proteins. *Faseb J.* 2001; 15:2149-61.
28. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010; 7(4):248-249
29. Gershoni-Baruch R., et al. Mutations of the tyrosinase gene in patients with oculocutaneous albinism from various ethnic groups in Israel. *Am J Hum Gen.* 1994; 54: 586-94.
30. Oetting, W. S., Witkop, C. J., Jr., Brown, S. A., Colomer, R., Fryer, J. P., Bloom, K. E., & King, R. A. A frequent tyrosinase gene mutation associated with type I-A (tyrosinase-negative) oculocutaneous albinism in Puerto Rico. *Am J Hum Genet,* 1993; 52(1), 17-23.
31. Ladero-Quesada M.A. V-BJ, Alcalá-Galve J. Judíos Sefarditas Conversos: La expulsión de 1492 y sus consecuencias. . Valladolid: Ambito Editores S.A. 1995.
32. Oetting WS, Pietsch J, Brott MJ, Savage S, Fryer JP, Summers CG, King RA. The R402Q tyrosinase variant does not cause autosomal recessive ocular albinism. *Am J Med Genet* 2009; 149A:466-9
33. Preising MN, Forster H, Gonser M, Lorenz B. Screening of TYR, OCA2, GPR143 and MC1R in patients with congenital nystagmus, macular hypoplasia, and fundus hypopigmentation indicating albinism. *Mol Vis.* 2011; 17:939-48.
34. Chiang PW, Drautz JM, Tsai AC, Spector E, Clericuzio CL. A new hypothesis of OCA1B. *Am J Med Genet A.* 2008; 146A:2968-70
35. Chiang PW, Spector E, Tsai AC. Oculocutaneous albinism spectrum. *Am J Med Genet A.* 2009; 149A:1590-1.
36. Hutton SM, Spritz RA. A comprehensive genetic study of autosomal recessive ocular albinism in Caucasian patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49:868-72.
37. Giebel LB, Spritz RA. RFLP for Mbol in the human tyrosinase (TYR) gene detected by PCR. *Nucleic Acids Research.* 1990; 18(10): 3103.
38. Oetting WS, Roed CM, Mentink MM, Handoko HY, King RA. PCR detection of a TaqI polymorphism at the CCAATT box of the human tyrosinase (TYR) gene. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:5800
39. Morris SW, Muir W, St. Clair D. Dinucleotide repeat polymorphism at the human tyrosinase gene. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19:6968