

(178)

Analiza mutacji genów rodopsyny i peryferyny u chorych z postacią autosomalną dominującą zwyrodnienia barwnikowego siatkówki w rodzinach polskich

Genetic analysis of rhodopsin and peripherin genes in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa (adRP) in Polish families

Ewa Brzezińska^{1,3}, Małgorzata Zdzeszyńska², Roman Goś², Andrzej Lewiński³

¹Z Zakładu Tyreologii Instytutu Endokrynologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

P. o. kierownik: dr hab. n. med. Ewa Sewerynek

²Z Kliniki Okulistyki i Rehabilitacji Wzrokowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Roman Goś

³Z Kliniki Endokrynologii i Terapii Izotopowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Andrzej Lewiński

Summary:

Purpose: The aim of that study was to identify the mutations in rhodopsin and peripherin genes in Polish families with autosomal dominant form of retinitis pigmentosa and determine the population polymorphism in both genes in adRP families.

Material and methods: We performed ERG, visual acuity, Goldman visual fields, intraocular pressure measurements and funduscopy in all the patients included in the study. On the basis of disease history, the families pedigree was made and the mode of inheritance was analyzed. The molecular analysis of DNA for each family with adRP was conducted. Genomic DNA was obtained from leucocytes by phenol-chloroform procedure according to Maniatis protocol. DNA was amplified by the PCR reaction in a volume of 50 μ l containing 100 ng/ μ l of genomic DNA, water, Cetus buffer pH 8,4 (1n Tris, 1n MgCl, 1n KCl, 2% gelatin), 0,25 μ M of each primer, 200 μ M of each of dATP, dTTP, dCTP, and dGTP and 2,5 U Taq polymerase (Promega). For amplification of rhodopsin gene 30 cycles of PCR were carried out. Each cycle consisting of denaturation at 95°C for 5 min, annealing: at 58°C (exon 1), 63°C (exon 2 i 3), 68°C (exon 4) and 2 min extension at 72°C min. For amplification of peripherin gene 30 cycles of PCR were carried out with annealing at 60°C. The entire PCR product was in electrophoresis on 8% PAA. The PCR-RFLP PCR- HD PCR-SSCP and analysis of polymorphism (CA)_n dinucleotide repetition was performed.

Results: Molecular study demonstrated, that mutations in rhodopsin gene were cause of retinitis pigmentosa in case of two families. In any study families mutations in peripherin gene were not identified. Two kinds of bases polymorphism were identified: restriction fragments length polymorphism (RFLP) in rhodopsin gene in exon 1 and 3 and single strand conformation polymorphism (SSCP) in exon 1 and 3 in rhodopsin gene and in exon 3 in peripherin gene. The confirmed mutations in rhodopsin gene, cosegregation with adRP, whereas two kinds of population polymorphism did not correlate with clinical symptoms. Natural polymorphism appeared to be a frequent feature in rhodopsin gene while a less frequent feature in peripherin gene.

Conclusions: Genetic investigations in patients with adRP allow to confirm the diagnosis and evaluate the prognosis. The mutation in rhodopsin gene should be confirmed in directly sequencing reaction in next study.

Słowa kluczowe: gen rodopsyny, gen peryferyny, mutacje genowe, zwyrodnienie barwnikowe siatkówki.

Key words: rhodopsin gene, peripherin gene, genes mutations, retinitis pigmentosa.

Zwyrodnienie barwnikowe siatkówki (*retinitis pigmentosa* – RP) jako postać uwarunkowana genetycznie może wiązać się z nieprzewodzącą ekspresją wielu genów, czopki bowiem i pręciki, tworzące kompleksy białkowe, są komórkami wysoce wyspecjalizowanymi.

Funkcja aparatu czopkowo-pręcikowego wiąże się z licznymi interakcjami białek strukturalnych i katalitycznych. Ze względu na dużą heterogenność genetyczną i kliniczną *retinitis pigmentosa* mówi się o grupie chorób o różnej etiologii (11).

Przyjmuje się, że zwyrodnienie barwnikowe siatkówki może występować w postaci izolowanej (bez innych objawów towarzyszących) lub jako składowa zespołów takich jak: zespół Ushera typ I i II, Alstroma, Refsuma, Bardeta-Biedla, Laurence'a-Moona, Cockayne'a i Seniora-Lokena, dystrofii miotonicznej czy ataksji Friedreicha. Wykazano, że postaci izolowane i zespołowe mogą dziedziczyć się w sposób autosomalny recesywny (arRP), autosomalny dominujący (adRP), sprzężony z chromosomem X (XRP) jako cechy dwugeniczne lub na zasadzie dziedziczenia mitochondrialnego (zespół Kearnsa-Sayre'a). Formy sprzężone z chromosomem X mogą być recesywne, pośrednie lub dominujące. Obecnie występuje tendencja do wyodrębniania przypadków sporadycznych, bez określania występowania RP w wywiadzie rodzinnym. Postacie o jednakowym typie dziedziczenia są wewnątrznie heterogenne, co wiąże się z tym, że zwyrodnienie barwnikowe siatkówki może być wywołane przez mutacje kilku genów (11). Udział poszczególnych form dziedziczenia różni się w poszczególnych populacjach, ale przyjmuje się, że adRP występuje w blisko 15-26% przypadków. Obraz kliniczny RP jest zależny od typu dziedziczenia oraz rodzaju mutacji. Wiadomo jest, że postać autosomalna dominująca *retinitis pigmentosa* (adRP), występująca u heterozygot obojga płci, jest klinicznie i genetycznie heterogenna (9,11). Tak znaczna heterogenność tej postaci była powodem najlepszego jej poznania i wyodrębnienia licznych genotypów. Mimo że w blisko 1/3 przypadków adRP wiąże się z mutacjami genu RHO (*locus* 3q21-24) dla białka rodopsyny czy genu RDS (*locus* 6p) dla peryferyny – strukturalnego białka fotoreceptorów, znane są inne geny związane z tą postacią. Zmapowano je w określonych regionach chromosomów 1., 3., 6., 7., 8., 9., 17. czy 19. (5,6,7,8,9,15). Należą do nich geny białek kaskady wzrokowej (PDE6A, CNGA1, arrestyna), geny białek cyklu wzrokowego rodopsyny (RPE65, RPLB1, ABCA4, RBP4, RGR i inne), geny białek strukturalnych fotoreceptorów (ROM1, APIL) czy geny mitochondrialne. Ostatnie badania ujawniły także występowanie mutacji w czynnikach uczestniczących w procesie dojrzewania pre-m-RNA (gen PRPF31, PRPC8, HPRP3) (3,4,13,16,17) czy czynnikach transkrypcyjnych (gen CRX, NRL), których produkty odgrywają ważną rolę we wczesnym rozwoju fotoreceptorów (12,15).

Celem podjętych badań była identyfikacja w polskich rodzinach ze zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki o autosomalnym dominującym sposobie dziedziczenia mutacji w genie rodopsyny i peryferyny, identyfikacja w wyselekcjonowanych polskich rodzinach z RP o różnym sposobie dziedziczenia polimorfizmu populacyjnego genu rodopsyny i peryferyny oraz analiza kosegregacji stwierdzonych mutacji lub polimorfizmu genów z fenotypem.

Materiał

W latach 1993-1995 dzięki współpracy z Kliniką Chorób Oczu WAM w Łodzi wyselekcjonowano 36 pacjentów pochodzących z 9 rodzin. Chorym wykonano badanie ERG, ostrość wzroku do dali i do bliży, pole widzenia na perymetrze Goldmanna, mierzono ciśnienie wewnątrzgałkowe, oznaczono próg adaptacji do ciemności oraz badano dno oka. Stwierdzono różnice kliniczne pomiędzy rodzinami. Na podstawie historii choroby sporządzono rodowody badanych rodzin i dokonano analizy sposobu dziedziczenia. Materiałem do badań było DNA wyizolowane z limfocytów krwi obwodowej.

Ogółem wyizolowano DNA od 36 pacjentów pochodzących z 9 rodzin.

Grupę kontrolną stanowiło 10 próbek krwi od osób zdrowych, niespokrewnionych z badanymi rodzinami.

Metody

DNA z limfocytów krwi obwodowej pacjentów izolowano metodą fenolową (14). Ocenę jakościową i ilościową preparatów przeprowadzono metodą spektrofotometryczną przy długości fali 260 i 280 nm. Wydajność próbek wynosiła 0,9-1,2 µg/µl. Wyizolowane DNA, doprowadzone do stężenia 0,5 µg/µl w buforze TE, przechowywano w temp. 4°C. DNA pacjentów z adRP poddano amplifikacji, przeprowadzając łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) dla poszczególnych eksonów genów rodopsyny i peryferyny. Typowa mieszanina reakcyjna zawierała 100 ng genomowego DNA, wodę, bufor Cetus pH 8,4 (o składzie: 1n Tris, 1n MgCl₂, 1n KCl, 2% żelatyna), 0,25 µM każdego startera, 200 µM każdego trifosforanu (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) oraz 2,5 U polimerazy Taq (firmy Promega). Amplifikację genu rodopsyny przeprowadzano w 30 cyklach, stosując następujące temperatury przyłączenia: 58°C dla eksonu 1., 63°C dla eksonów 2. i 3., 68°C dla eksonu 4. (tab. I). Amplifikację genu peryferyny przeprowadzono w 30 cyklach, stosując temperaturę przyłączenia 60°C (sekwencje starterów umieszczono w tab. II).

Ekson i budowa primeru Exon and primer sequence	Wielkość produktu PCR (pz) Product of PCR
Ekson 1A 5' TTCGAGCATTCTGGGTGG 3' (240-260)* 5' GCTAGGTTGAGCAGGATGTA 3' (533-513)	293
Ekson 1B 5' CATGTTTCTGCTGATCGTGC 3' (423-442) 5' ACTCTCCAGACCCCTCCAT 3' (714-698)	295
Ekson 2. 5' CCGCTGCTGACTGCCTTGC 3' (2417-2438) 5' GCTTCTCCCTTCTGCTCAGTG 3' (2636-2615)	220
Ekson 3. 5' TTGGCTGTCCCAAGTCCCT 3' (3759-3778) 5' TCCAGACCATGGCTCCTCCA 3' (4073-4054)	315
Ekson 4. 5' TCACGGCTCTGAGGGTCCAG 3' (4003-4022) 5' GAGTAGCTTGTCTTGGCAG 3' (4365-4044)	402
Ekson 5. 5' AGTCCAAGCACACTGTGGG 3' (5112-5131) 5' GGATGGGAGACGCCTATAGT 3' (5322-5303)	211
*Pary zasad genu rodopsyny, do których przyłącza się primer. Dla każdego eksonu sekwencje primerów podano kolejno dla nici sensownej i antysensownej.	
*The pair bases of rhodopsine gene to which the primers are binded. The sequences of each primers are presented for sense and antisense strand, respectively.	

Tab. I. Primery PCR stosowane do amplifikacji eksonów genu rodopsyny.
Tab. I. The PCR primers used to amplification of rhodopsine gene exons.

Analiza produktów PCR genu rodopsyny i peryferyny

Produkty PCR genu rodopsyny badano metodą heterodupleksów (PCR-HD) oraz dokonano analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP) z wykorzystaniem odpowiednich restryktaz (tab. III).

Ekson i budowa primeru / Exon and primer sequence
Ekson 1.1. 5' AGCTGTGCTGTGGGAAGCAA 3' 5' TTCATCTGGCATACTTGGC 3'
Ekson 1.2. 5' TGCTATCCTGTCTTCAAC 3' 5' TCTGACCCAGGACTGGAAG 3'
Ekson 2. 5' AAGCCCATCTCCAGCTGTCT 3' 5' TTACCCTCTACCCAGCTG 3'
Ekson 3. 5' AGATTGCCTCTAAAATCTCTCT 3' 5' GGAGTGCCTCTTTCTCAGT 3'

Tab. II. Primery PCR używane do amplifikacji eksonów genu peryferyny.
Tab. II. The PCR primers used to amplification of rhodopsin and peripherin gene exons.

Dla genów rodopsyny i peryferyny przeprowadzono także analizę polimorfizmu konformacji pojedynczych nici (PCR-SSCP) oraz analizę polimorfizmu powtórzeń dinukleotydów (CA)_n.

Wyniki

U wszystkich badanych chorych zaobserwowano spadek ostrości wzroku do 5/25-5/50 i koncentryczne zawężenie pola widzenia.

U pacjentów w bardziej zaawansowanym stadium choroby obserwowano charakterystyczny dla RP obraz dna oka. Na całym średnim obwodzie od pola plamkowo-tarczowego do równika występowały skupiska barwnika o wyglądzie przypominającym kształt komórek kostnych. Tarcze nerwu wzrokowego były blade, zanikowe, a naczynia krwionośne siatkówki – znacznie zwężone.

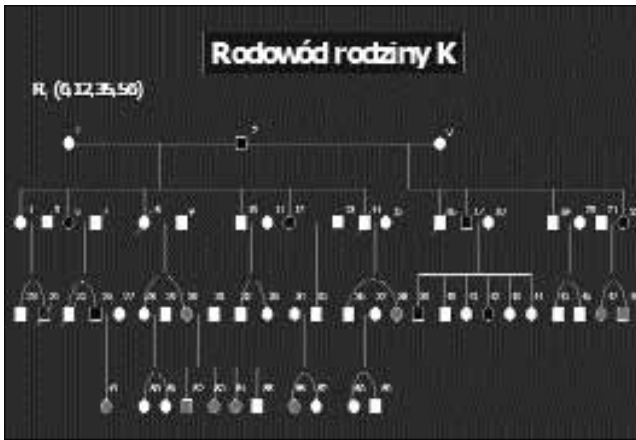
Analiza rodowodów 6 rodzin wskazywała na autosomalną dominującą formę dziedziczenia RP (ryc. 1), w której zmiany oftalmoskopowe pojawiały się najpóźniej, a dziedziczenie choroby występowało kolejno we wszystkich trzech pokoleniach. Pozostałe 2 rodowody wskazywały na postać sprzężoną z chromosomem X. W przypadku jednej rodziny z powodu braku dostatecznej ilości informacji nie było możliwe jednoznaczne określenie sposobu dziedziczenia.

Badania molekularne wykazały, że w przypadku dwu rodzin przyczyną zwyródnienia barwnikowego siatkówki są mutacje genu rodopsyny. W genie peryferyny nie zidentyfikowano mutacji w żadnej z badanych rodzin. Zidentyfikowano natomiast dwa rodzaje polimorfizmu zmienności par zasad: polimorfizm długości odcinków restrykcyjnych (ang. restriction fragments length polymorphism – RFLP) genu rodopsyny w jego eksonie 1. (ryc. 2) oraz 3. (ryc. 3) oraz populacyjny polimorfizm konformacji pojedynczych nici DNA (ang. single strand conformation polymorphism – SSCP) eksonu 1. i 3. genu rodopsyny (ryc. 4a, 4b) oraz eksonu 3. genu peryferyny (ryc. 5). Stwierdzone mutacje genu rodopsyny korelowały z występowaniem choroby, podczas gdy oba rodzaje polimorfizmu populacyjne-

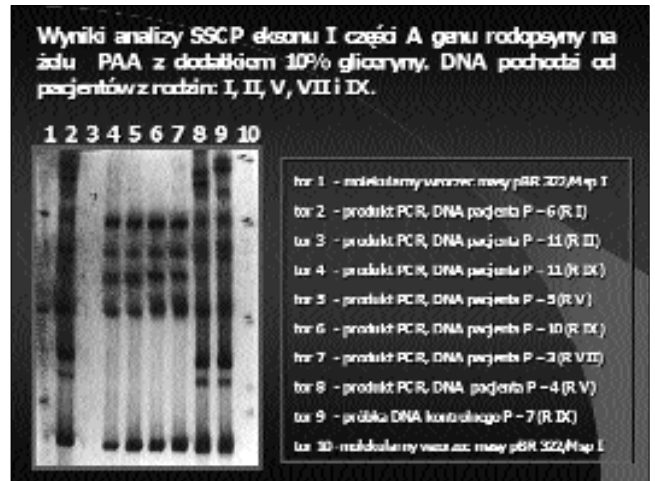
Enzym Enzyme	Rozpoznawana sekwencja Recognizable sequence	Ekson Exon	Badana mutacja Tested mutation	Haplotyp miejsca cięcia Obecność mutacji Haplotype of incision place. Presence of mutation	Haplotyp miejsca cięcia Brak mutacji Haplotype of incision place. Lack of mutation
Dde I	C↓TNA	Ekson 1. (część A)	Thr-58-Arg	Dodatkowe miejsce docelowe, fragmenty o dł.: 149 74 i 70 pz	Fragmenty o dł. 149 i 144 pz
Apa I	GGGCC↓C	Ekson 1. (część B)	Gly-106-Trp	Utracenie miejsca docelowego, fragment 295 pz	Fragmenty o dł. 192 i 103 pz
Rsa I	GT↓AC	Ekson 2.	Arg-135-Leu	Utracenie miejsca docelowego, pojedynczy fragment 220 pz	Obecne miejsca docelowe, fragmenty 153 i 67 pz
Tag I	T↓CGA	Ekson 3.	Asp-190-Asn/Gly	Utracenie miejsca docelowego, pojedynczy fragment 315 pz	Obecne miejsca docelowe, fragmenty 225 i 90 pz
Rsa I	GT↓AC	Ekson 3.	Tyr-178-Cys lub mutacja w sekwencji GTA części intronowej 3'	Utracenie jednego miejsca docelowego, fragmenty o dł. 222 pz i 93 pz	Obecne miejsca docelowe, fragmenty o dł. 166, 93 i 56 pz
Msp I	C↓CGG	Ekson 3.	Mutacja w kodonie 198. lub w sekwencji CCG części intronowej 3' (w tych regionach nie opisano dotąd zmian nukleotydowych)	Utracenie jednego miejsca docelowego, fragmenty o dł. 228 pz i 87 pz	Obecne miejsca docelowe, fragmenty o dł. 110, 118 i 87 pz
Msp I	C↓CGG	Ekson 4.	Ewentualne wystąpienie mutacji w sekwencji CCG części intronowej 5'	Utracenie jednego miejsca docelowego, fragment o dł. 402 pz	Obecne miejsca docelowe, fragmenty o dł. 329 i 73 pz
MspI	C↓CGG	Ekson 5.	Ewentualne wystąpienie mutacji w kodonie 313.	Utracenie miejsc docelowych, fragment o dł. 211 pz	Obecne miejsca docelowe, fragmenty o dł. 97 pz, 62 i 52 pz

Tab. III. Endonukleazy stosowane w pracy.

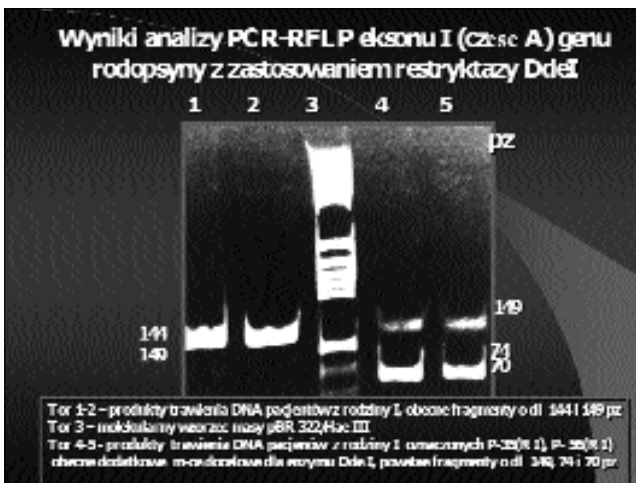
Tab. III. Endonuclease used in this study.



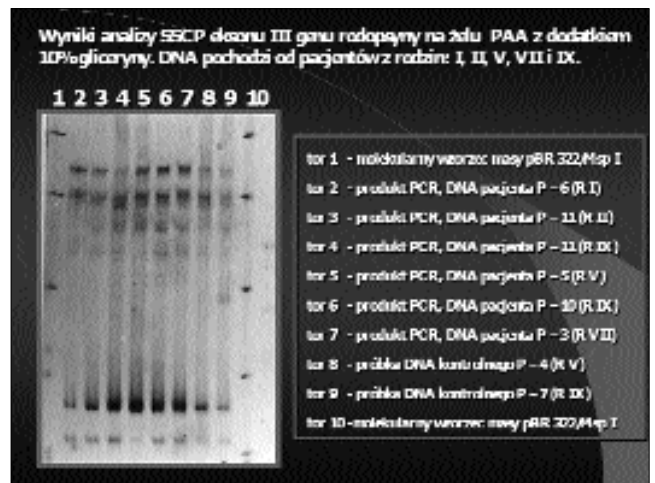
Ryc. 1. Rodowód rodziny z adRP.
Fig. 1. Family pedigree with adRP.



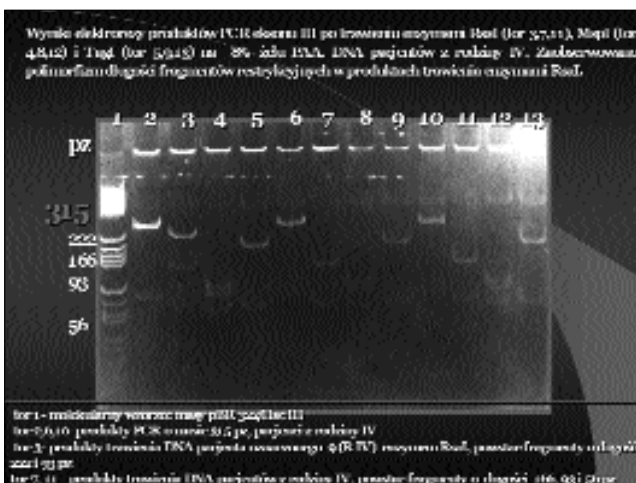
Ryc. 4a. Polimorfizm SSCP eksonu 1. (cz. A) genu rodopsyny.
Fig. 4 a. Polymorphism SSCP in rhodopsine gene exon I, part A.



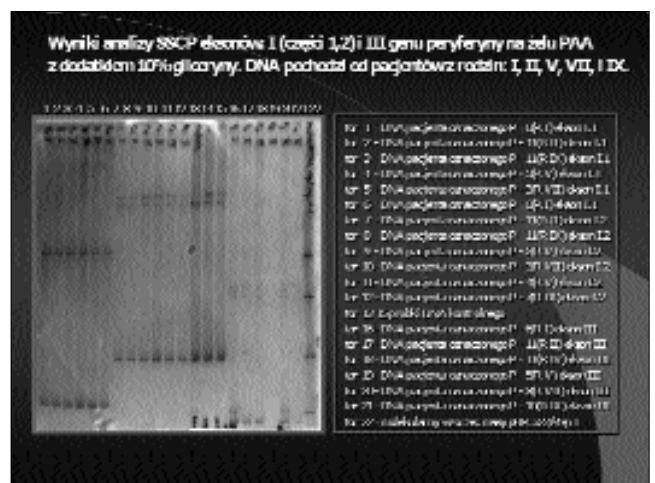
Ryc. 2. Polimorfizm RFLP eksonu 1. (cz. A) genu rodopsyny z zastosowaniem restryktazy DdeI.
Fig. 2. Polymorphism RFLP of exon I (art A) from rhodopsine gene with use of restriction DdeI.



Ryc. 4b. polimorfizm SSCP eksonu 3. genu rodopsyny.
Fig. 4 b. Polymorphism SSCP in rhodopsine gene exon III.



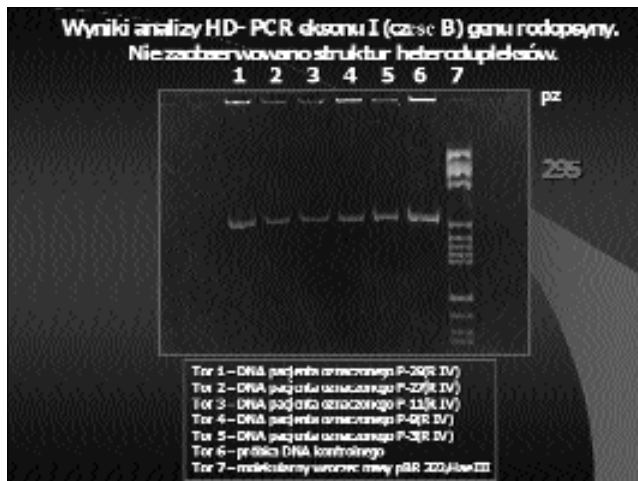
Ryc. 3. Polimorfizm RFLP eksonu 3. genu rodopsyny w rodzinie IV.
Fig. 3. Polymorphism RFLP of rhodopsine gene exon III in family IV.



Ryc. 5. Polimorfizm SSCP eksonu 3. genu peryferyny.
Fig. 5. Polymorphism SSCP in peripherin gene exon III.

go nie korelowały z objawami klinicznymi adRP. Polimorfizm naturalnej zmienności par zasad wydaje się częstą cechą genu rodopsyny, a mniej częstą cechą genu peryferyny.

Dyskusja
Autosomalna dominująca forma zwyrodnienia barwnikowego siatkówki jest najlepiej poznaną postacią tej choroby, z tego też



Ryc. 6. Analiza heterodupleksów genu rodopsyny.

Fig. 6. Results of analysis HD-PCR rhodopsine gene exon I (art B). Structures of heteroduplex was not observed.

względem dokładną analizą objęto pacjentów z adRP. Amplifikacja sekwencji kodujących genu rodopsyny i niektórych nukleotydów flankujących genu pozwoliła na przeprowadzenie analizy występowania ewentualnych mutacji genu rodopsyny i ich możliwą korelację z chorobą. Analiza eksonów 1. -5. genu rodopsyny z wykorzystaniem metody wyszukiwania heterodupleksów nie wykazała istnienia tych struktur u żadnego z badanych pacjentów, ujawniając pełną komplementarność DNA z matrycą (ryc. 6). Wynik ten może być jednak związany ze zbyt małą rozdzielczością stosowanych w pracy żeli poliakrylamidowych. Wiadomo jest, że mutacja pojedynczej pary zasad może spowodować zanik lub powstanie nowego miejsca rozpoznawanego przez dany enzym, czego wynikiem jest polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP). Z drugiej strony mutacja w obrębie genu nie dotycząca miejsc docelowych dla enzymu nie wpływa na zmianę długości fragmentów, w których jest odnajdywany dany gen. Dopiero analiza fragmentów restrykcyjnych DNA, uzyskanych z użyciem różnych restryktaz, lub zastosowanie dodatkowych metod badawczych, pozwalają na ustalenie sprzężenia zmutowanego odcinka DNA z określonym układem miejsc restrykcyjnych i wykrycie mutacji.

W pracy, stosując metodę RFLP, dokonano analizy fragmentów restrykcyjnych genu rodopsyny i podjęto próbę ustalenia ewentualnego sprzężenia skorelowanej z RP mutacji w genie z określonym haplotypem miejsc restrykcyjnych. Do badań wytypowano regiony, zgodnie z doniesieniami z literatury, w których często spotykane są mutacje punktowe w rodzinach anglosaskich. Wybrane restryktazy i ich miejsca docelowe podano w tabeli III.

Zmiany nukleotydowe w eksonie 1. i 3. genu rodopsyny wykryto w przypadku dwu rodzin z adRP (rodzina I i IV). W eksonie 1., części A genu rodopsyny u dwóch pacjentów z rodziny I, wykazujących pełne objawy zwyrodnienia barwnikowego siatkówki, wystąpiło dodatkowe miejsce docelowe dla enzymu Dde (ryc. 2). W wyniku trawienia produktów PCR genu otrzymano fragmenty 149, 74 i 70 pz. Taki układ miejsc restrykcyjnych świadczy o wystąpieniu u tych chorych mutacji w kodonie 58. eksonu 1., części A. W przypadku pacjenta z rodziny I z klinicznie stwierdzonymi objawami RP zaobserwowano polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych w produktach trawienia eksonu 3. genu rodopsyny enzymem Rsa (ryc. 3). W wyniku trawienia powstały fragmenty o długości

Ryc. 7. Analiza sprzężeń z markerem $(CA)_n$ genu peryferyny.

Fig. 7. Results of analysis of conjugation with pripherine gene marker $(CA)_n$.

n.

222 i 93 pz zamiast 166, 93 i 56 pz. Dodatkowe miejsce docelowe dla tego enzymu może świadczyć o występowaniu mutacji w kodonie 178. lub sekwencji GTA części intronowej 3'. Zastosowanie do analizy DNA pozostałych enzymów (tab. III) nie ujawniło wystąpienia polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych w przypadku pozostałych badanych pacjentów.

Pomimo niewielkiej liczby badanych zdecydowano się na przeprowadzenie analizy sprzężeń z markerami $(CA)_n$. Badaniu poddano próbki DNA pacjentów z rodzin o autosomalnym, dominującym sposobie dziedziczenia RP oraz ich zdrowych krewnych. Sprzężenie z markerem D6S 105 wykryto w przypadku genu peryferyny w rodzinie VII. Chore dzieci oznaczone (P-4) i (P-6) mają te same allele pochodzące od chorego ojca (P-3) (ryc. 7). Analiza DNA pozostałych osób nie wykazała sprzężenia z markerami $(CA)_n$ zarówno w genie rodopsyny, jak i peryferyny, gdzie otrzymano taki sam układ alleli u osób zdrowych i chorych.

W przypadku wyselekcjonowanych pacjentów dokonano analizy polimorfizmu konformacji pojedynczych nici (SSCP) dla wszystkich eksonów genu rodopsyny i peryferyny. Liczny polimorfizm naturalnej zmienności par zasad zaobserwowano u pacjentów pochodzących z rodzin: I, II, V, VII, IX, w eksonie 1, części A genu rodopsyny, w którym wystąpił inny niż w kontroli układ konformacji pojedynczych nici (ryc. 4a). Podobnie w eksonie 3. genu inny niż w kontroli wzór konformacji prążków u osób z rodziny V i IX świadczy o występowaniu polimorfizmu naturalnej zmienności par zasad w tym regionie genu (ryc. 4b). Analiza eksonu 2. genu rodopsyny ujawniła zmieniony wzór prążków u jednego pacjenta z rodziny VII. Wykazano także, że ekson 4. i 5. genu rodopsyny nie ujawnił cech występowania polimorfizmu SSCP. Wzory konformacji prążków są takie same u wszystkich badanych pacjentów.

Analiza SSCP eksonu 1. i 2. genu peryferyny nie wykazała polimorfizmu konformacji pojedynczych nici u żadnego z badanych pacjentów. Zmieniony układ prążków zaobserwowano natomiast w produktach amplifikacji eksonu 3. pacjentów z rodziny I i VII (ryc. 5). We wszystkich badanych przypadkach zmieniony układ konformacji pojedynczych nici nie korelował z chorobą.

Podsumowując, należy podkreślić, że pomimo zastosowania w pracy wielu technik badawczych, otrzymane wyniki, ujawniające mutacje w genie rodopsyny u pacjentów z adRP, nie mogą być uzna-

ne za jednoznacznie pewne. Analizowane rodziny są małe, z niewystarczającą liczbą pacjentów oraz spokrewnionych z nimi osób. Z powodu niedostępności warsztatu nie przeprowadzono także reakcji bezpośredniego sekwencjonowania produktów PCR dla poszczególnych fragmentów genu rodopsyny. Badanie to pozwoliłoby na określenie rodzaju zmian nukleotydowych w poszczególnych fragmentach genu. Należałoby więc przeprowadzić dalsze badania w celu identyfikacji zamian par zasad zmutowanych eksónów genu rodopsyny.

PIŚMIENICTWO:

1. Brzeziańska E., Zdieszzyńska Z., Goś R., Lewiński A.: *Zmiany molekularne w zwyrodnieniu barwnikowym siatkówki, mutacje genu peryferyny*. Okulistyka, 2003; 1: 31-46.
2. Chakarova C. F., Hims M. M., Bolz H., Abu-Safieh L., Patel R. J., Papaioannou M. G., Inglehearn C. F., Keen T. J., Willis C., Moore A. T., Rosenberg T., Webster A. R., Brid A. C., Gal A., Hunt D., Vithana E. N., Bhattacharya S. S.: *Mutations in HPRP3, a third member of pre-mRNA splicing factor genes, implicated in autosomal dominant retinitis pigmentosa*. Hum. Molec. Genet., 2002; 11: 87-92.
3. Deery E. C., Vithana E. N., Newbold R. J., Gallon V. A., Bhattacharya S. S., Warren M. J., Hunt D. M., Wilkie S. E.: *Disease mechanism for retinitis pigmentosa (RP11) caused by mutations in the splicing factor gene PRPF31*. Hum. Mol. Genet., 2002; 11 (25): 3209-3219.
4. Den Hollander A. I., van der Velde-Visser S. D., Pinckers A. J. L., Hoyng C. B., Brunner H. G., Cremers F. P.: *Refined mapping of the gene for autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP17) on chromosome 17q22*. Hum. Genet., 1999; 104: 73-76.
5. Farrar G. J., Findlay J. B. C., Kumar-Singh R., Kenna P., Humphries M. M., Sharpe E., Humphries P.: *Autosomal dominant retinitis pigmentosa: a novel mutation in the rhodopsin gene in the original 3q linked family*. Hum. Molec. Genet., 1992; 1: 769-771.
6. Inglehearn C. F., Carter S. A., Keen T. J., Lindsey J., Stephenson A. M., Bashir R., Maghth M., Moore A. T., Jay M., Bird A. C.: *A new locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 7p*. Nature Genetics, 1993; 4: 51-53.
7. Inglehearn C. F., Tarttelin E. E., Keen T. J., Bhattacharya S., Moore A. T., Taylor R., Brid A. C.: *A new dominant retinitis pigmentosa family mapping to the RP18 locus on chromosome 1q11-21*. Med. Genet., 1998; 35: 788-789.
8. Inglehearn C. F., McHale J. C., Skirton H., Lunt P. W.: *A new family linked to the RP1 dominant retinitis pigmentosa locus on chromosome 8q*. J. Med. Genet., 1999; 36: 646-648.
9. Krawczyński M. R., Pecold K.: *Genetyczna heterogenność retinitis pigmentosa*. Klin. Oczna, 1994; 96: 24-29.
10. Martinez-Gimeno M., Maseras M.: *Mutations P51U and G122E in retinal transcription factor NRL associated with autosomal dominant and sporadic retinitis pigmentosa*. Hum. Mutat., 2001; 17 (6): 520.
11. Mc Kie A. B., McHale J. C., Keen T. J., Tarttelin E. E., Goliath R., van Lith-Verhoeven J. J. C., Greenberg J., Ramesar R. S., Hoyng C. B., Cremers F. P. M., Mackey D. A., Bhattacharya S. S., Bird A. C., Markham A. F., Inglehearn C. F.: *Mutations in the pre-mRNA splicing factor gene PRPC8 in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP13)*. Hum. Molec. Genet., 2001; 10: 1555-1562.
12. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: *Molecular cloning: A laboratory manual*. Wyd. 2., Nolan C., 1989; 6.22-6.34.
13. Sohocki M. M., Daiger S. P., Bowne S. J., Rodriguez J. A., Northrup H., Heckenlively J. R., Birch D. G., Mintz-Hittner H., Ruiz R. S., Lewis R. A., Saperstein D. A., Sullivan L. S.: *Prevalence of mutations causing retinitis pigmentosa and other inherited retinopathies*. Hum. Mutat., 2001; 17 (1): 42-51.
14. Van Lith-Verhoeven J. J., van der Velde-Visser S. D., Sohocki M. M., Deutman A. F., Brin H. M., Cremers F. P., Hoyng C. B.: *Clinical characterization, linkage analysis, and PRPC8 mutation analysis of a family with autosomal dominant retinitis pigmentosa type 13 (RP13)*. Ophthalmic. Genet., 2002; 23 (1): 1-12.
15. Vithana E. N., Abu-Safieh L., Allen M. J., Carey A., Papaioannou M., Chakarova C., Al. -Maghth M., Ebenezer N. D., Willis C., Moore A. T., Bird A. C., Hunt D. M., Bhattacharya S. S.: *A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11)*. Molec. Cell., 2001; 8: 375-381.

Praca wpłynęła do Redakcji 05.01.2004 r. (370).

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
 dr n. przyr. Ewa Brzeziańska
 ul. Rodakowskiego 3/5 m. 19
 93-277 Łódź