

В.Н. ПАМПУХА¹, Г.И. ДРОЖЖИНА², Л.А. ЛИВШИЦ¹

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

² Институт глазных болезней и тканевой терапии

им. В.П. Филатова АМН Украины

Французский бульвар, 49/51, Одесса, 65061, Украина

E-mail: livshits@imbg.org.ua

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ H626R, A546T, T538R ГЕНА TGFB1 У БОЛЬНЫХ С РЕШЕТЧАТОЙ ДИСТРОФИЕЙ СТРОМЫ РОГОВИЦЫ ИЗ УКРАИНЫ



Проведен анализ мутаций H626R (экзон 14), A546T, T538R (экзон 12) гена TGFB1 с использованием метода полимеразной цепной реакции с последующей рестрикцией у 52 индивидов из 22 неродственных семей с клиническим диагнозом разных типов решетчатой дистрофии роговицы. Мутация H626R была выявлена у пациентов в 12 из 17 обследованных семей с клиническим диагнозом решетчатой дистрофии с поздней манифестацией и у 6 человек, у которых еще не было клинических проявлений заболевания. Интересно отметить, что мутации T538R и H626R, которые ассоциированы с решетчатой дистрофией с поздней манифестацией заболевания, были выявлены у двух пациентов с предварительным клиническим диагнозом решетчатой дистрофии (тип I), который характеризуется ранним проявлением заболевания. Мутация A546T не была выявлена ни у одного из наших пациентов. Обсуждаются также возможные особенности мутантного белка tgfb1 и его вовлеченность в патогенез заболевания. Полученные результаты свидетельствуют о том, что анализ мутаций в гене TGFB1 имеет важное значение в дифференциальной диагностике дистрофий роговицы с пронозическим и терапевтическим применением, а также для генетического консультирования в семьях высокого риска.

© В.Н. ПАМПУХА, Г.И. ДРОЖЖИНА, Л.А. ЛИВШИЦ, 2007

Введение. Наследственные дистрофии роговицы — гетерогенная группа прогрессирующих заболеваний, которые приводят к помутнению роговицы и существенному снижению зрения. Общим характерным признаком этих дистрофий является наличие в строме аномальных депозитов, которые локализуются в кератоцитах или среди фибрилл коллагена [1, 2]. Среди амилоидных дистрофий роговицы наиболее распространенной является решетчатая дистрофия.

Решетчатая дистрофия (тип I) — двустороннее прогрессирующее заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования. Первые клинические признаки проявляются в первом-втором десятилетии жизни. Полная клиническая картина наступает в третьем-четвертом десятилетии жизни, и для нее характерны прозрачные решетчатые структуры в передних и средних пластах стромы, точечные сероватые помутнения в поверхностных пластах и центральное диффузное субэпителиальное помутнение [3, 4]. Больные часто страдают от рецидивов эрозионных процессов [5, 6]. При световой микроскопии срезов роговицы больных с решетчатой дистрофией наблюдают фибриллярные депозиты амилоида, которые расположены под боуменовую мембраной, а также в поверхностных и средних пластах стромы. В эндотелии и десцеметовой мембране амилоидные отложения отсутствуют. Депозиты имеют вид тонких (диаметр 8–10 нм) неразветвленных фибрилл, которые расположены параллельно волокнам коллагена. Количество кератоцитов уменьшено, и большинство из них имеют дегенеративные изменения [6, 7]. Кроме решетчатой дистрофии I типа, различают по меньшей мере еще пять клинических типов решетчатой дистрофии. Решетчатая дистрофия (тип II) имеет аутосомно-рецессивный тип наследования и является одним из проявлений системного амилоидоза (синдрома Меретойя), при котором поражаются также кожа и нервы. Депозиты амилоида выявляют в роговице, а также в нервах и коже. Фибриллярные депозиты в роговице немногочисленны, точечные образования, как правило, отсутствуют. Зрение остается довольно высоким до самой старости. Поражение нервной системы при упомянутом синдроме проявляется в виде полинейропатии, дефекты кожи — в виде ее сухости, блефарохолзиса, что предопределяет

маскоподобное лицо [8]. В 1987 г. Хида и соавт. [9] описали третий клинический тип дистрофии стромы роговицы, для которой характерен аутосомно-рецессивный тип наследования. Для этого типа характерны решетчатые структуры, образованные толстыми радиально расположенными фибриллами. Рецидивы эрозий роговицы для этого типа не характерны. Решетчатая дистрофия (тип III) начинает проявляться в четвертой-пятой декаде жизни, и зрение существенно снижается после 60 лет. В 1991 г. Сток и соавт. [10] описали тип дистрофии, для которой характерными являются позднее клиническое проявление и толстые решетчатые образования, но которая наследуется аутосомно-доминантно. Эрозии роговицы являются непостоянным признаком. Этот тип дистрофии определяют как решетчатая дистрофия (тип IIIA). В 1999 г. Стюарт и соавт. [11] описали асимметричную, с поздней манифестацией форму решетчатой дистрофии. В свою очередь Шмидт-Бернард и соавт. [12], проведя исследование клинических, гистопатологических и ультраструктурных особенностей заболевания, пришли к заключению, что указанный тип дистрофии является отдельной группой решетчатых дистрофий – промежуточным между типами I и IIIA. Для промежуточного типа характерно более раннее проявление заболевания (третья-четвертая декада жизни) и более тонкие решеткоподобные линии, чем при типе IIIA. Фуждики и соавт. [13] в 1998 г. описали так называемую глубокую форму решетчатой дистрофии, которую выделили в IV тип. Первые клинические признаки проявляются в пятой декаде жизни. Характерные депозиты звездчатой формы размещаются в глубоких пластах стромы. Радиальные решеткоподобные структуры в средних пластах стромы появляются позже, а в верхних пластах стромы и эпителии депозиты отсутствуют.

За последнее десятилетие был достигнут значительный прогресс в установлении причин, которые определяют развитие дистрофий роговицы. На сегодня идентифицировано 12 генов-кандидатов, мутации в которых могут являться причиной патогенеза разных видов и типов дистрофий (TGFBI, STS, CHTS6, GSN, KRT3, KRT12, M1S1, GLA, ARSC1, COL8A2, DCN, PIP5K3) [14–16]. Предполагается, что му-

тации в шести генах, а именно TGFBI, CHTS6, STS, GSN, M1S1, DCN, являются причиной дистрофий стромы роговицы.

В 1997 г. был открыт ген, который индуцируется трансформирующим фактором роста бета (TGFBI-ген или BIGH3-ген) и локализуется на длинном плече хромосомы 5 в области 5q31 [17]. Белковым продуктом гена TGFBI является кератоэпителин – экстрацеллюлярный матриксный белок, состоящий из 683 аминокислот [18]. Кератоэпителин в тканях выполняет адгезивную функцию. Он синтезируется в клетках эпителия роговицы, но также может синтезироваться и в клетках стромы при заживлении ран.

Установлено, что мутации в гене TGFBI определяют наследственные дистрофии с аутосомно-доминантным типом наследования, а именно узелковую дистрофию (тип I), решетчатую дистрофию (типы I, IIIA, IV), узелково-решетчатую (дистрофия Авеллино), дистрофии Рейс-Бюклера, Тиля-Бенке [17, 19–21]. У большинства пациентов с дистрофиями роговицы выявляют мутации, которые возникают в кодонах 124 и 555 гена TGFBI. Кроме того, наблюдается ассоциация определенных видов и типов дистрофий с определенными мутациями. В наших исследованиях и работах других авторов показано, что специфической для решетчатой дистрофии (тип I) является мутация R124C, для узелково-решетчатой – мутация R124H, для дистрофии Рейс-Бюклера – мутация R124L, для узелковой дистрофии (тип I) – мутация R555W, для дистрофии Тиля-Бенке – R555Q [17, 19–23].

На сегодняшний день в гене TGFBI идентифицировано около 30 мутаций. Поскольку большинство мутаций открыто в экзонах 4, 12, и 14, можно предположить, что они являются горячими точками мутаций.

Исследование ассоциации определенных мутантных вариантов с клиническими проявлениями решетчатой дистрофии имеет важное значение как для выяснения функций самого кератоэпителина, так и для анализа механизмов патогенеза заболевания. В свою очередь результаты таких исследований позволят улучшить дифференциальную диагностику и прогноз заболевания.

Целью настоящей работы было исследование мутаций H626R (экзон 14), A546T (экзон

12), T538R (экзон 12) гена TGFBI у больных с разными клиническими формами решетчатой дистрофии стромы роговицы.

Материалы и методы. Клинические и молекулярно-генетические исследования были проведены после информированного согласия у 31 индивида с наследственными дистрофиями стромы роговицы из 22 семей и среди 21 клинически здоровых членов семей больных. Среди обследованных были 26 пациентов и 19 здоровых индивидов из 17 семей с решетчатой дистрофией с поздней манифестацией заболевания, 5 пациентов и 2 здоровых индивида из 5 семей с типичной клинической картиной решетчатой дистрофии (тип I), у которых не была выявлена в наших предыдущих исследованиях специфическая для данного типа мутация R124C [22, 23].

Материалом для молекулярно-генетического исследования служили образцы периферической крови индивидов из группы обследования, для морфологического и гистохимического исследования – диски роговицы, полученные после проведенной кератопластики. Гистохимические и ультраструктурные исследования проводили по методикам, описанным ранее [24]. Выделение и очистку препаратов ДНК из лейкоцитов периферической крови осуществляли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции [25]. Для анализа мутантных вариантов гена TGFBI проводили специфическую амплификацию *in vitro* ДНК последовательностей 12-го и 14-го экзонов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [26]. Полимеразную цепную реакцию проводили в автоматическом режиме на термоциклере Perkin Elmer (фирма «Cetus», США) по схеме: денатурация ДНК – 45 с при 94 °С, отжиг праймеров – 45 с при 55 °С, элонгация – 1 мин при 72 °С. Были использованы следующие последовательности олигонуклеотидных праймеров: для мутаций A546T, T538R, forward (5'-GGACTGACGGAGACCCTCAA-3'), reverse (5'-GGAGACGTGTACTTAAAGTTGGTC-3'); для мутации H626R, forward (5'-GAAAAA CAATGTGGTGAGTGTC-3'), reverse (5'-CATG GAGAAAAGGACTGGCTG-3').

Для дифференциального анализа определенных типов мутаций проводили гидролиз амплифицированных последовательностей 12-го

и 14-го экзонов эндонуклеазами рестрикции Hinf.I, MwoI, NlaIII для мутаций T538R, A546T, H626R соответственно.

Результаты исследований и их обсуждение. При клинико-генеалогическом анализе у всех пациентов с решетчатой дистрофией установлен аутосомно-доминантный тип наследования. Гистохимические исследования осуществляли на материале роговицы тех больных, у которых была проведена кератопластика. У больных с клиническими диагнозами решетчатая дистрофия роговицы (типы I, IIIA, IV) были выявлены характерные для упомянутых типов морфологические и ультраструктурные признаки, описанные нами ранее [24].

В результате молекулярно-генетического анализа мутация A546T гена TGFBI не выявлена ни у одного из пациентов с поздним клиническим проявлением решетчатой дистрофии. Следует отметить, что указанная мутация была выявлена у пациентов с решетчатой дистрофией (тип IIIA) из Франции [27].

В результате проведенных нами исследований мутация H626R была выявлена у пациентов из 12 семей, и лишь в одной семье с предварительным клиническим диагнозом решетчатой дистрофии (тип IIIA) данная мутация не выявлена (рис. 1). Кроме того, упомянутая мутация была выявлена у 6 лиц, у которых еще не наблюдались клинические признаки заболевания. Интересно отметить, что мутация H626R была также выявлена у одного пациента с клиническим диагнозом решетчатая дистрофия (тип I), что заставляет задуматься о недостаточности данных клинического исследования для постановки точного диагноза и идентификации формы заболевания. В пользу такого заключения свидетельствуют результаты анализа мутации T538R гена TGFBI в обследуемой группе пациентов. Мутация T538R не была выявлена ни у одного из пациентов с предварительным клиническим диагнозом (тип IIIA), тем не менее была обнаружена у одного пациента, которому был поставлен клинический диагноз решетчатой дистрофии I типа (рис. 2). В работе Муньер и соавт. [28] было высказано предположение, что указанная мутация, впервые идентифицированная Отенин-Жирардом и соавт. [29], как и мутация H626R, могут быть ассоциированы с промежуточным типом I/IIIA.

Важно отметить, что мутация H626R выявлена в исследованиях других авторов у пациентов с решетчатой дистрофией, основными клиническими признаками которой являются начало заболевания в третьей-пятой декаде жизни, решеткоподобные линии определенной толщины, ярко выраженная асимметричность клинической картины, наблюдаемой в разных глазах, широкая вариабельность заболевания даже в границах одной семьи [12].

Среди семей с поздним клиническим проявлением решетчатой дистрофии стромы роговицы было четыре семьи, которые имели характерные симптомы решетчатой дистрофии (тип IV). Ни в одной из этих семей исследуемые нами мутации не выявлены.

Исходя из результатов моделирования третичной структуры домена 4 белка кератоэпителина, было высказано предположение, что мутация T538R, приводящая к замене треонина на аргинин, обуславливает нарушение фолдинга белкового продукта, что в свою очередь делает невозможным секрецию белка [30]. Авторы исследования прогнозируют, что у пациентов с упомянутой мутацией амилоидные депозиты должны возникать в первой декаде жизни. Однако в нашем исследовании мутация T538R была выявлена у пациента, у которого первые признаки заболевания были отмечены лишь в третьей декаде жизни. Исходя из результатов моделирования, при мутации A546T секреция белка становится невозможной или же мутация приводит к существенной дестабилизации самого белка. Мутация H626R приводит к дестабилизации водородных связей. Кроме того, консервативность гистидина в данном положении, наблюдаемая в доменах всех белков fas1-суперсемейства, свидетельствует о ее важности для процесса фолдинга, и поэтому маловероятно, что белок с мутацией H626R будет подвергаться фолдингу и секретироваться. Исходя из предполагаемых функций мутантных белков, спрогнозированных по результатам моделирования третичной структуры, можно было предположить, что у всех пациентов с обнаруженными нами мутациями, должно наблюдаться раннее проявление заболевания. Однако полученные нами результаты не позволяют подтвердить данное предположение. Так, у пациента, у которого выявлена мутация T538R,

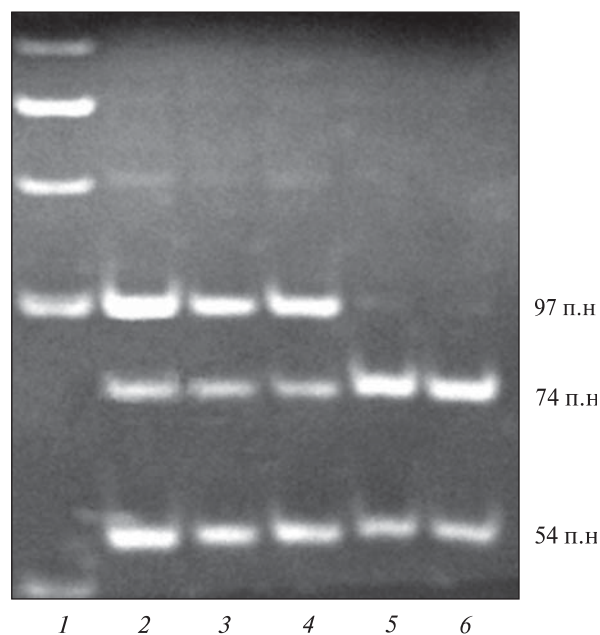


Рис. 1. Анализ мутации H626R в экзоне 14 гена TGFB1 у больных с решетчатой дистрофией роговицы (ПЦР + NlaIII; 10 % ПААГ): 1 – маркер молекулярной массы Gene Ruler 50bp DNA Ladder; 2–4 – больные индивиды; 5, 6 – здоровые

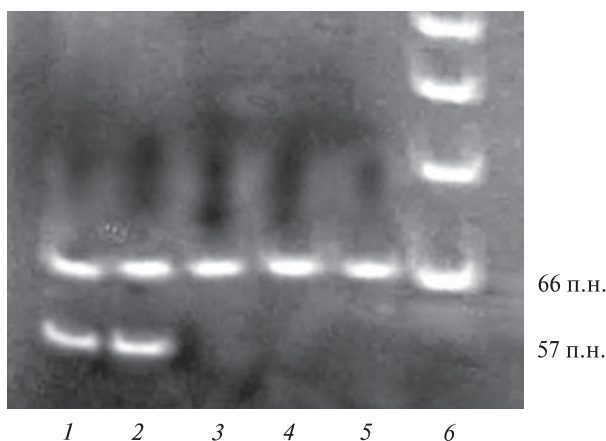


Рис. 2. Анализ мутации T538R в экзоне 12 гена TGFB1 у больных с решетчатой дистрофией роговицы (ПЦР + Hinf.I; 10 % ПААГ): 1, 2 – больные индивиды; 3–5 – здоровые индивиды; 6 – маркер молекулярной массы pUC19DNA/MspI

начало манифестации заболевания было в третьей декаде жизни. В свою очередь у подавляющего числа пациентов (за исключением одного пациента с предполагаемым клиническим типом I решетчатой дистрофии и ранней

манифестацией заболевания), у которых была выявлена мутация H626R, первые признаки заболевания проявились в позднем возрасте. Особый интерес представляет тот факт, что у пациентов, исследованных другими авторами, и у одного из пациентов в наших исследованиях наблюдалась так называемая асимметрия проявления клинических признаков. Это проявлялось в том, что патологические депозиты наблюдались в одном глазу, и лишь спустя продолжительное время слабое проявление решетчатой дистрофии можно было обнаружить во втором глазу.

На сегодняшний день мы не можем предположить возможный механизм таких процессов, и, возможно, дальнейшие более детальные исследования структуры и свойств мутантного белка и его взаимодействия с белками-партнерами прольют свет на природу феномена асимметрии.

Выводы. Результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что для постановки правильного диагноза дистрофии роговицы клинических и морфологических данных может быть недостаточно. Анализ мутантных вариантов гена TGFBI у больных с наследственными дистрофиями стромы роговицы является высокоинформативным для точной дифференциальной диагностики разных видов дистрофий роговицы, что в свою очередь дает возможность подобрать соответствующую тактику лечения. Молекулярно-генетическое обследование всех членов семей больных уже на ранних этапах заболевания позволяет прогнозировать развитие болезни.

SUMMARY. In our study H626R (exon 14), A546T, T538R (exon 12) mutations of the TGFBI gene were analyzed using polymerase chain reaction followed by restriction digestion in 52 individuals from 22 unrelated families with different forms of lattice corneal dystrophy. H626R mutation was detected in patients from 12/17 families with late onset lattice corneal dystrophies and in 6 unaffected individuals. Interestingly, T538R and H626R mutations, associated with late onset of lattice corneal dystrophy, were found in two patients with preliminary clinical diagnosis of lattice corneal dystrophy (type I) with early onset of disease. A546T mutation was not detected in our patients. The possible properties of mutant tgfb1 protein and its involvement in pathogenesis are discussed. The results show that TGFBI gene mutation analysis is important for differential

diagnosis of corneal dystrophies with prognostic and therapeutic implications and for genetic consulting in high risk families.

РЕЗЮМЕ. Проведено аналіз мутацій H626R (екзон 14), A546T, T538R (екзон 12) гена TGFBI з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції з наступною рестрикцією у 52 осіб з 22 неспоріднених родин з клінічним діагнозом різних типів ґратчастої дистрофії. Мутація H626R була виявлена у пацієнтів в 12 із 17 обстежених родин з клінічним діагнозом ґратчастої дистрофії з пізньою манифестацією і в 6 осіб, у яких ще не було клінічних проявів захворювання. Цікаво зазначити, що мутації T538R та H626R, асоційовані з ґратчастою дистрофією з пізньою манифестацією захворювання, були виявлені у двох пацієнтів з попереднім клінічним діагнозом ґратчастої дистрофії (тип I), для якого характерним є ранній прояв захворювання. Мутація A546T не була виявлена в жодного з наших пацієнтів. Обговорюються також можливі особливості мутантного білка tgfb1 та його роль в патогенезі захворювання. Отримані результати показують, що аналіз мутацій в гені TGFBI має важливе значення в диференційній діагностиці дистрофій рогівки з прогностичним і терапевтичним застосуванням, а також для генетичного консультування в родинях високого ризику.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Waring G., Rodrigues M., Laibson R. Corneal dystrophy. Dystrophies of the epithelium, Bowman layer and stromas // *Surv. Ophthalmol.* – 1978. – **23**, № 2. – P. 97–101.
2. Weidle E. Epitheliale und stromale Hornhautdystrophien // *Ophthalmologie.* – 1996. – **93**. – P. 754–767.
3. Майчук Ю.Ф., Орловская Л.Э. Стромальные дистрофии: клинические формы и лечение // *Офтальмолог. журн.* – 1993. – № 4. – С. 224–232.
4. Witschel H. Hornhautdystrophien und Molekulargenetik // *Ophthalmologie.* – 2002. – **99**, № 6. – P. 415–417.
5. Luchs J.I., D'Adversia I., Udel I.J. Ulcerative keratitis associated with spontaneous corneal erosions // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (Suppl.)*. – 1995. – **36**. – P. 40.
6. Zechner E.M., Croxatto J.O., Malbran E.S. Superficial involvement in lattice corneal dystrophy // *Ophthalmologica.* – 1986. – **193**. – P. 193–199.
7. Thiel H. Dystrophien des Stromas in Augenheilkunde in Klinik und Praxis. Band 2.–Stuttgart; New York: Thieme Verlag, 1981. – P. 90–97.
8. Meretoja J. Comparative histopathological and clinical findings in eyes with lattice corneal dystrophy of two different types // *Ophthalmologica.* – 1972. – **165**. – P. 15–31.
9. Hida T., Tsubota K., Kigasawa F., Murata H., Ogata T., Akiya S. Clinical features of a newly recognized type of lattice corneal dystrophy // *Amer. J. Ophthalmol.* – 1987. – **104**. – P. 241–248.

10. Stock E., Feder R., O'Grady R., Sugar J., Roth S. Lattice corneal dystrophy type III-A: clinical and histopathologic correlations // Arch. Ophthalmol. – 1991. – **109**. – P. 354–358.
11. Stewart H., Black G.C., Donnai D., Bonshek R.E., McCarthy J., Morgan S., Dixon M.J., Ridgway A.A. A mutation within exon 14 of the TGFB1 (BIGH3) gene on chromosome 5q31 causes an asymmetric, late-onset form of lattice corneal dystrophy // Ophthalmology. – 1999. – **106**. – P. 964–970.
12. Schmitt-Bernard C., Guittard C., Arnaud B., Demaille J., Argiles A., Claustres M., Tuffery-Giraud S. BIGH3 exon 14 mutations lead to intermediate type I/IIIA of lattice corneal dystrophies // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2000. – **41**. – P. 1302–1308.
13. Fujiki K., Hotta Y., Nakayasu H., Yokoyama T., Takano T., Yamaguchi T., Kanai A. A new L527R mutation of the betaIGH3 gene in patients with lattice corneal dystrophy with deep stromal opacities // Hum. Genet. – 1998. – **103**. – P. 286–289.
14. Auw-Handrich H., Witschel Y. Hornhautdystrophien im Licht moderner molekular genetischer Forschung // Ophthalmologie. – 2002. – **99**. – P. 418–426.
15. Klinworth G. Advances in the molecular genetics of corneal dystrophies // Amer. J. Ophthalmol. – 1999. – **128**. – P. 747–754.
16. Bron A. Genetics of the corneal dystrophies what we have learned in the past twenty-five years // Cornea. – 2000. – **19**. – P. 699–711.
17. Munier L.F., Korvatska E., Djemai A., Palsier D.L., Zografos L., Pescia G., Schorderet D.F. Keratoepithelin mutation in four 5g31-linked corneal dystrophies // Nat. Genet. – 1997. – **15**. – P. 247–251.
18. Le Baron R.G., Bezverkov K.I., Zimmer M.P., Pavelec R., Skonier J., Purchio A.F. Beta IG-H3, a novel secretory protein inducible by transforming growthfactor-beta, is present in normal skin and promotes the adhesion and spreading of dermal fibroblasts in vitro // J. Invest Dermatol. – 1995. – **104**. – P. 844–849.
19. Dighiero P., Niel F., Ellies P., D'Hermies F., Savoldelli M., Renard G., Delpech M., Valleix S. Histologic phenotype-genotype correlation of corneal dystrophies associated with eight distinct mutations in the TGFB1 gene // Ophthalmology. – 2001. – **108**. – P. 818–823.
20. Korvatska E., Munier F.L., Djemai A., Wang M.X., Frueh B., Chiou A., Uffer S., Ballestrazzi E., Braunstein R.E., Forster R.K., Culbertson W.W., Boman H., Zografos L., Schorderet D.F. Mutation hot spots in 5q31-linked corneal dystrophies // Amer. J. Hum.Genet. – 1998. – **62**. – P. 320–324.
21. Maschima Y., Nakamura Y., Noda K., Konishi M., Yamada M., Kudoh J., Shimizu N. A novel mutation at codon 124 (R124L) in the BIGH3 gene associated with superficial variant of granular corneal dystrophy // Arch. Ophthalmol. – 1999. – **117**. – P. 90–93.
22. Pampukha V.M., Drozhyna G.I., Livshits L.A. TGFB1 gene mutation analysis in families with hereditary corneal dystrophies from Ukraine // Ophthalmologica. – 2004. – **218**. – P. 411–414.
23. Пампуха В.М., Дрожжина В.М., Лившиць Л.А. Дослідження мутацій в 4-му та 12-му екзонах гена TGFB1 у хворих із спадковими формами дистрофії рогівки з України // Доп. НАН України. – 2004. – № 3. – С. 186–190.
24. Дрожжина Г.И., Вут В.В., Думброва Н.Э. Молекулярно-генетический и клинико-морфологический анализ больных с решетчатой наследственной дистрофией роговицы // Офтальмол. журн. – 2002. – № 2. – С. 37–41.
25. Маниатис Т., Фрич Э.Э., Сэмбрук Ж. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 420 с.
26. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // Science. – 1988. – **239**, № 8580. – P. 487–491.
27. Dighiero P., Drunat S., Ellies P., D'Hermies F., Savoldelli M., Renard G., Delpech M., Valleix S. A new mutation (A546T) of the big-h3 gene responsible for French lattice corneal dystrophy type IIIA // Amer. J. Ophthalmol. – 2000. – **129**. – P. 248–251.
28. Munier F.L., Frueh B., Othenin-Girard P., Uffer S., Cousin P., Wang M.X., Hon E., Black G.C.M., Blasi M.A., Balestrazzi E., Lorenz B., Escoto R., Barraquer R. et al. BIGH3 Mutation spectrum in corneal dystrophies // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2002. – **43**. – P. 949–954.
29. Othenin-Girard P., Frueh-Epstein B., Gloer B. Identification of mutations in autosomal dominant corneal dystrophies // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1999. – **40** (Suppl). – P. 563.
30. Clout N.J., Hohenester E. A model of FAS1 domain 4 of the corneal protein beta (ig)-h3 gives a clearer view on corneal dystrophies // Mol. Vis. – 2003. – **11**. – P. 440–448.

Поступила 05.02.07