

# Дослідження мутацій гена *TGFBI* у хворих на дистрофію строми рогівки, які проживають в Україні

В. М. Пампуха, Г. І. Дрожжина<sup>1</sup>, Л. А. Лівшиць

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

<sup>1</sup>Інститут очних хвороб та тканинної терапії ім. В. П. Філатова АМН України  
Французький бульвар, 49/51, Одеса, 65061, Україна

livshits@imbg.org.ua

---

*Проаналізовано мутації Arg124Cys (екзон 4), Thr538Arg, Ala546Thr, Arg555Thr, Arg555Gln (екзон 12), His626Arg (екзон 14) гена TGFBI з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції з наступною рестрикцією у 91 пацієнта з різними формами дистрофії рогівки та 31 клінічно здорового індивіда з 49 неспоріднених родин. Отримані результати показують, що аналіз мутацій в гені TGFBI має важливе значення у диференційній діагностиці дистрофій рогівки з прогностичним і терапевтичним застосуванням, а також для генетичного консультування в родинах високого ризику.*

*Ключові слова: ген TGFBI, кератоепітелін, дистрофія рогівки.*

---

**Вступ.** Ген *TGFBI*, або *BIG-H3* (transforming growth factor-beta induced gene), відкрито у 1992 році Сконієром та співавт. при дослідженні впливу трансформуючого фактора росту бета на лінії клітин аденокарциноми людини [1]. Двома роками пізніше у двох лабораторіях незалежно встановлено, що білок *tgfb1* експресується також у рогівці ока [2, 3]. У тому ж році три види дистрофій строми рогівки, а саме – гратчаста дистрофія (тип I), вузликова дистрофія (тип I) та дистрофія Авеліно – картовано на хромосомі 5 [4]. Нарешті, у 1997 році Мунієр та співавт. чітко визначили, що чотири види дистрофій строми рогівки (на додаток до перелічених вище ще й дистрофія Рейс-Бюклерса) зумовлені різними мутаціями в гені *TGFBI* [5].

Встановлено, що зазначений ген локалізується на довгому плечі хромосоми 5 (5q31) і кодує екстрацелюлярний матриксний білок, який складається з 683 амінокислотних залишків. Мунієр та співавт. назвали цей білок кератоепітеліном, оскільки вважали, що він експресується винятково в рогівці. Однак білок *tgfb1* виявляють і в інших тканинах організму [1, 6], він містить на своєму карбоксильному кінці послідовність Arg-Gly-Asp (RGD-мотив), яка впізнається поверхневими рецепторними білками – інтегринами [7, 8]. У різних дослідженнях виявлено, що білок *tgfb1* ковалентно зв'язаний з колагеном VI у багатьох тканинах, у тому числі і в рогівці [9, 10]. До того ж він взаємодіє з фібронектином [11]. Третинна структура білка *tgfb1* подібна до такої фасцикліну I – білка, який виконує адгезивну функцію у нервових клітинах комах [12]. Зазначені білки належать до великої родини, характерною ознакою

якої є наявність тандемно повторюваних гомологічних послідовностей, так званих FAS1-доменів. Білок *tgfb1* складається з чотирьох таких доменів [13].

Спадкові дистрофії рогівки – це гетерогенна група прогресуючих хвороб, які призводять до помутніння рогівки і суттєвого зниження зору. Дистрофії строми рогівки, зумовлені мутаціями в гені *TGFBI*, – аутосомно-домінантні захворювання, спільною ознакою яких є наявність аномальних депозитів, локалізованих у кератоцитах або серед колагенових фібрил [14]. Для гратчастої дистрофії характерні амілоїдні депозити, для вузликової – гіалінової, а при дистрофії Авеліно виявляють як амілоїдні, так і гіалінової депозити [15].

У більшості пацієнтів з дистрофіями рогівки знаходять мутації, що виникли в 124 та 555 кодонах гена *TGFBI*. Окрім того, генетичними дослідженнями показано, що існує чітка кореляція між певними мутаціями гена *TGFBI* і клінічними формами дистрофії, які вони зумовлюють [5,16–18]. Наприклад, специфічною для гратчастої дистрофії (тип I) є мутація Arg124Cys, для дистрофії Авеліно – мутація Arg124His, для дистрофії Рейс-Бюклерса – мутація Arg124Leu, для вузликової дистрофії (тип I) – мутація Arg555Trp, для дистрофії Тіля-Бенке – Arg555Gln. У дослідженнях взаємозв'язку генотипу з фенотипом з'ясувалося, що гомозиготність по мутаціях у гені *TGFBI* зумовлює більш ранній прояв і тяжчий перебіг захворювання [19, 20].

Гратчаста дистрофія рогівки – найпоширеніша дистрофія, вона, зазвичай, є білатеральним амілоїдозом, якому притаманні рефрактильні гратчасті лінії. Мутації в гені *TGFBI* обумовлюють декілька типів гратчастої дистрофії. Гратчаста дистрофія (тип I) – це білатеральне симетричне захворювання рогівки, яке характеризується численними напівпрозорими тонкими гратчастими лініями, асоційованими з білими крапками в поверхневих та середніх шарах центральної строми. Встановлено, що симптоми проявляються в 1–2-й декаді життя. Хворі з даною формою захворювання часто страждають від рецидивів ерозійних процесів [21–23]. Показано, що у більшості хворих із зазначеним типом хвороби виявляють мутацію Arg124Cys. Проте в інших дослідженнях визначено, що такий фенотип може бути асоційований з іншими му-

таціями, серед яких Leu518Arg, Leu569Arg, Val539Asp [24–26].

У 1991 році Стоком і співавт. описано тип дистрофії, якому властиві пізній клінічний прояв і товсті гратчасті утворення [27]. Ерозії рогівки у цьому разі є непостійною ознакою. Даний тип дистрофії визначають як гратчасту дистрофію (тип IIIA), з якою асоційовані мутації Pro501Thr (зустрічається серед японців), Ala546Thr (знайдена серед французів), Asn622Lys, ASN622His (виявлені серед населення британських островів) [28–30]. У 1999 році авторами роботи [31] ідентифіковано мутацію His626Arg гена *TGFBI*, виявлену у пацієнтів з пізньою маніфестацією клінічних проявів гратчастої дистрофії. При цьому динаміка клінічних проявів в обох очах була асинхронною, тобто асиметричною. Шмідт-Бернард і співавт., дослідивши клінічні, гістопатологічні та ультраструктурні особливості дистрофії, зумовленої даною мутацією, дійшли висновку, що цей тип дистрофії є окремою групою гратчастих дистрофій – проміжною між типами I та IIIA. Для проміжного типу характерний більш ранній прояв (3–4 декада життя) захворювання і тонші граткоподібні лінії, ніж при типові IIIA [32].

Фуджукі та співавт. описали так звану глибоку форму гратчастої дистрофії, яку виділили в 4-й тип. Перші її клінічні ознаки проявляються в п'ятій декаді життя, характерними є депозити зірчастої форми, які розміщуються в глибоких шарах строми. Радіальні граткоподібні структури в середніх шарах строми з'являються пізніше, а у верхніх шарах строми та епітелії депозити відсутні. В дослідженнях різних авторів показано, що з цим типом асоційовані мутації Leu527Arg (характерна для японців), Val631Asp (виявлена серед італійців), Gly594Val (знайдена в Індії) [26, 30, 33].

Іншими аутосомно-домінантними захворюваннями, зумовленими мутаціями в гені *TGFBI*, є вузликові дистрофії рогівки [23, 34]. Клінічній картини класичної вузликової дистрофії (тип I, або Грену I) притаманна наявність сірувато-білих непрозорих вузликів, що нагадують крихти хліба, у стромі рогівки. Перші ознаки захворювання проявляються в 1–2-му десятилітті життя. З віком їхня кількість і розмір збільшуються, місцями вони зливаються і поширюються в середні і глибокі шари строми [35,

36]. У частини пацієнтів розвиваються ерозійні процеси в рогівці і больовий синдром [37]. У більшості хворих з вузликовою дистрофією (тип I) виявляють мутацію Arg555Trp [5]. Мутацію Arg124Ser знайдено лише в двох родинах з даним типом дистрофії [38]. Маніфестація клінічних проявів при дистрофії Авеліно починається в 1–3-й декаді життя. У дитячому віці аномальні утворення в рогівці хворих на дистрофію Авеліно мають вигляд кілець, дисків, сніжинок, зірочок і розташовуються в передніх і середніх шарах строми. Граткоподібні утворення з'являються пізніше і локалізуються в середніх і глибоких шарах строми [39, 40]. В усіх хворих з даним типом дистрофії виявлено лише одну мутацію Arg124His [5].

Дистрофія Рейс-Бюклера відома також під назвою дистрофія боуменової мембрани I типу. Симптоми захворювання починають проявлятися в першій декаді життя, характерними є рецидивні ерозії та виражений больовий синдром. При світловій мікроскопії спостерігають дегенерацію базального епітелію і боуменової мембрани, які повністю або частково заміщені сполучною тканиною. Депозити гіаліну розміщуються під епітелієм і руйнують боуменову мембрану. При електронній мікроскопії виявляють щільні паличкоподібні гранули, ультраструктурні характеристики яких відповідають вузликовій дистрофії строми рогівки [41, 42].

На сьогодні відомо, що три мутації, а саме – Arg124Leu, deltaF540, Gly623Asp, асоційовані з дистрофією Рейс-Бюклера [43–45]. При світловій мікроскопії рогівки хворих на дистрофію Тіля-Бенке спостерігають клінічну картину, дуже схожу на дистрофію Рейс-Бюклера. Важливо зазначити, що обидва види дистрофії вражають один і той самий шар рогівки і відрізняються лише морфологічно. При дистрофії Тіля-Бенке субепітеліальні депозити входять в епітелій у вигляді численних клинів, нагадуючи зуби пилки. При електронній мікроскопії філаменти мають вигляд завитків, так званих curly filaments [46, 47]. Лише одна мутація Arg555Gln гена *TGFBI* асоційована з дистрофією Тіля-Бенке, проте цей тип дистрофії може бути зумовлений мутаціями в іншому гені, картованому на хромосомі 10 (10q23-q24) [5, 48].

В гені *TGFBI* ідентифіковано більше 30 мутацій. Більшість із них знаходиться в 4, 12 і 14-му екзонах даного гена. Дослідження асоціації певних мутантних варіантів з клінічними проявами дистрофії рогівки має важливе значення як для встановлення функції білка *tgfb1*, так і для аналізу механізмів патогенезу захворювання. В свою чергу результати таких досліджень дозволяють поліпшити диференційну діагностику і прогноз перебігу хвороби.

Мета нашої роботи полягала в дослідженні мутацій Arg124Cys (екзон 4), Thr538Arg, Ala546Thr, Arg555Thr, Arg555Gln (екзон 12) і His626Arg (екзон 14) гена *TGFBI* у хворих з різними клінічними формами дистрофії рогівки.

**Матеріали і методи.** Клінічні та молекулярно-генетичні дослідження проведено у 91 особи зі спадковими дистрофіями строми рогівки з 49 родин та у 31 клінічно здорового члена родин хворих. Серед обстежених були 45 пацієнтів і 11 здорових осіб із 20 родин з гратчастою дистрофією (тип I), 16 пацієнтів та 1 здорова особа з 10 родин з вузликовою дистрофією рогівки (тип I), 4 пацієнти з двох родин з клінічним діагнозом дистрофії Рейс-Бюклера, 26 пацієнтів та 18 здорових осіб із 17 родин з гратчастою дистрофією та пізньою маніфестацією захворювання.

Матеріалом для молекулярно-генетичного дослідження слугували зразки периферичної крові, відібрані за умов інформованої згоди, індивідів з групи обстеження. Матеріалом для морфологічного та гістохімічного дослідження були диски рогівки, отримані після проведеної кератопластики. Гістохімічний та ультраструктурний аналіз проводили за методиками, описаними раніше [49].

Препарати ДНК виділяли з лейкоцитів периферичної крові і очищували стандартним методом фенольно-хлороформної екстракції [50].

Для аналізу мутантних варіантів гена *TGFBI* здійснювали специфічну ампліфікацію *in vitro* ДНК-последовностей 4, 12 та 14-го екзонів методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [51] в автоматичному режимі на термоциклері Perkin Elmer («Cetus», США) за такою схемою: денатурація ДНК – 45 с, 94 °С; відпалювання праймерів – 45 с, 55 °С; елонгація – 1 хв, 72 °С. Як праймери використано специфічні олігонуклеотиди, синтезовані

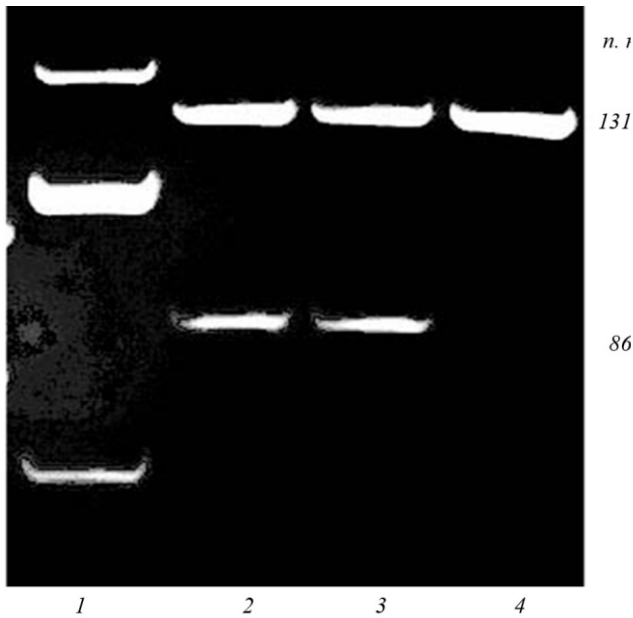


Рис. 1. Аналіз мутації R555W в екзоні 12 гена *TGFBI* у хворих на вузликову дистрофію рогівки (ПЛР + *BstXI*; 10 %-й ПААГ): 1 – маркер молекулярної маси *pUC19DNA/MspI*; 2, 3 – хворі особи; 4 – здоровий індивід

згідно з відповідними екзонними послідовностями гена *TGFBI*:

для мутації Arg124Cys –  
 forward (5'-CAGAGGCCATCCCTCCTTCT-3'),  
 reverse (5'-CAGGCCTCAGTTTCTCCCTG-3');  
 для мутацій Thr538Arg, Ala546Thr, Arg555Thr –  
 forward (5'-GGACTGACGGAGACCCTCAA-3'),  
 reverse  
 (5'-GGAGACGTGTACTTAAGTTGGTC-3');  
 для мутації Arg555Gln –  
 forward (5'-GGACTGACGGAGACCCTCAA-3'),  
 reverse (5'-CTTTACCCAAGAGTCAGATC-3');  
 для мутації Hys626Arg –  
 forward (5'-GAAAAACAATGTGGTGAGTGTC-3'),  
 reverse (5'-CATGGAGAAAAGGACTGGCTG-3').

Для диференційного аналізу певних типів мутацій ампліфіковані послідовності 4, 12 та 14-го екзонів гідролізували ендонуклеазами рестрикції *PstI*, *HinfI*, *MwoI*, *BstXI*, *BglII*, *NlaIII* для мутацій Arg124Cys, Thr538Arg, Ala546Thr, Arg555Thr, Arg555Gln, Hys626Arg відповідно.

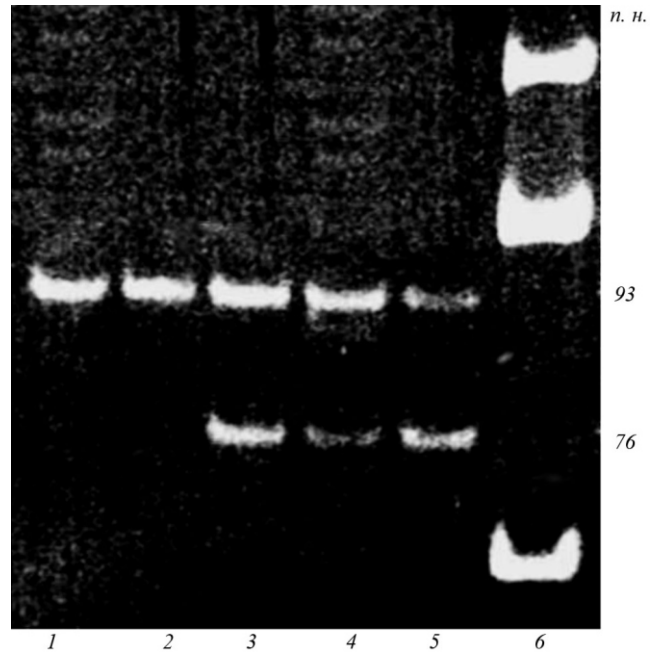


Рис. 2. Аналіз мутації R124C в екзоні 4 гена *TGFBI* у хворих на гратчасту дистрофію рогівки (ПЛР + *PstI*; 10 %-й ПААГ): 1, 2 – здорові індивіди; 3, 4, 5 – хворі; 6 – маркер молекулярної маси *pUC19DNA/MspI*

**Результати і обговорення.** Молекулярно-генетичним аналізом 12-го ексона гена *TGFBI* мутацію Arg555Thr виявлено в п'яти родинях з клінічним діагнозом вузликової дистрофії рогівки, в тому числі у дев'ятирічної дитини (рис. 1). В інших п'яти родинях з клінічним діагнозом вузликової дистрофії специфічну для цього виду дистрофії мутацію R555W не визначено. Після детальнішого вивчення клінічної картини в чотирьох родинях знайдено клінічні ознаки, характерні для плямистої дистрофії строми рогівки. Окрім того, в даних родинях можна прогнозувати аутосомно-рецесивний тип успадкування. Таким чином, аналіз родоводу, фенотипічних проявів захворювання з урахуванням даних молекулярно-генетичного аналізу дозволили переглянути початковий діагноз.

При клініко-генеалогічному аналізі в усіх пацієнтів з гратчастою дистрофією встановлено аутосомно-домінантний тип успадкування. Гістохімічні дослідження здійснено на матеріалі рогівки тих хворих, у яких проведено кератопластику. У хворих з клінічним діагнозом гратчастої дистрофії рогівки виявлено характерні для даного

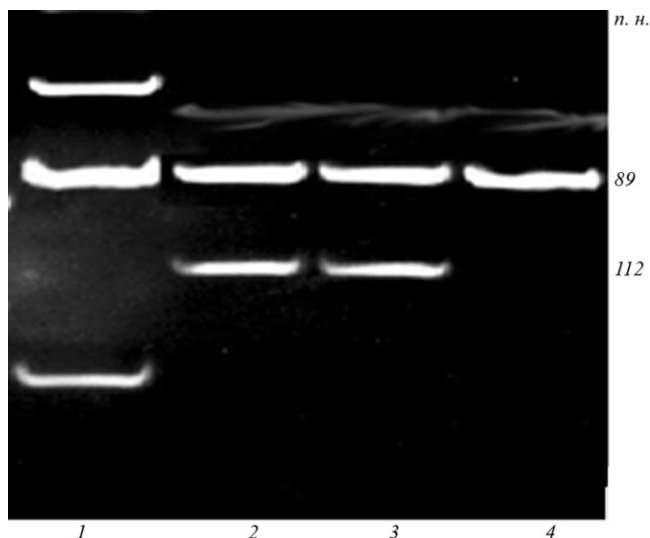


Рис. 3. Аналіз мутації *R555Q* в екзоні 4 гена *TGFBI* (ПЛР + *BglIII*; 10 %-й ПААГ): 1 – маркер молекулярної маси *pUC19DNA/MspI*; 2, 3 – гетерозиготні носії мутації; 4 – здоровий індивід

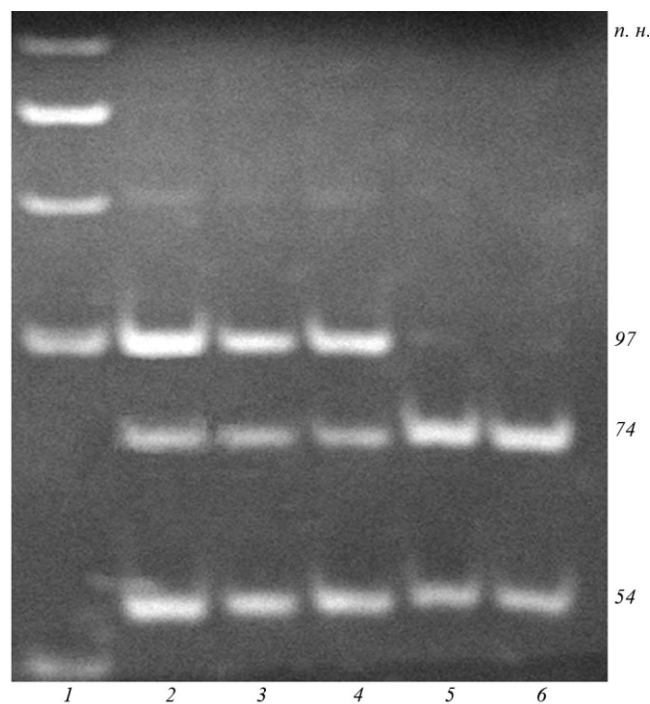


Рис. 4. Аналіз мутації *H626R* в екзоні 14 гена *TGFBI* у хворих на гратчасту дистрофію рогівки (ПЛР + *NlaIII*; 10 %-й ПААГ): 1 – маркер молекулярної маси GeneRuler 50bp DNA Ladder; 2, 3, 4, – хворі особи; 5, 6 – здорові індивіди

виду дистрофії морфологічні та ультраструктурні ознаки [49].

В результаті молекулярно-генетичного аналізу 4-го екзона гена *TGFBI* мутацію Arg124Cys визначено у пацієнтів з 15 родин та в однієї дитини 11 років, в якій не знайдено клінічних ознак гратчастої дистрофії I типу (рис. 2). Окрім того, дану мутацію виявлено у пацієнта з клінічним діагнозом дистрофії Рейс-Бюклерса. Оскільки мутація Arg124Cys зумовлює розвиток гратчастої дистрофії (тип I), у цього пацієнта переглянуто попередній клінічний діагноз. У п'яти родинах з клінічним діагнозом гратчастої дистрофії (тип I) мутацію Arg124Cys не виявлено. В іншій родині з попереднім клінічним діагнозом дистрофії Рейс-Бюклерса знайдено мутацію Arg555Gln, асоційовану з дистрофією Тіля-Бенке (рис. 3). І в цій родині попередній клінічний діагноз було змінено. Подібність клінічної картини для дистрофій Тіля-Бенке і Рейс-Бюклерса, а також однакові прояви захворювання на ранніх стадіях даних дистрофій і гратчастої дистрофії стали причиною невірно поставленого діагнозу.

Мутацію Ala546Thr не ідентифіковано молекулярно-генетичним аналізом у жодного із обстежених нами пацієнтів з пізнім проявом дистрофії рогівки. Її виявлено лише у пацієнтів із Франції [29].

На підставі проведених нами досліджень мутацію Hys626Arg зафіксовано у пацієнтів з 12 родин, і лише в одній родині з попереднім клінічним діагнозом гратчастої дистрофії (тип IIIA) цю мутацію не виявлено (рис. 4). Окрім того, дану мутацію визначено у шести осіб, у яких ще не спостерігалось клінічних ознак захворювання. Цікаво відзначити, що мутацію Hys626Arg також знайдено в одного пацієнта з клінічним діагнозом гратчастої дистрофії (тип I), що дало підставу сумніватися у достатності даних клінічного обстеження для встановлення правильного діагнозу та ідентифікації форми захворювання. На користь подібного висновку свідчать результати аналізу мутації Thr538Arg у досліджуваній групі пацієнтів. Цю мутацію не виявлено в жодного з пацієнтів із пізнім клінічним проявом гратчастої дистрофії. Проте мутацію Thr538Arg знайдено у пацієнта з клінічним діагнозом гратчастої дистрофії I типу (рис. 5). У роботі Муньєр та співавт. висловлено припущення,

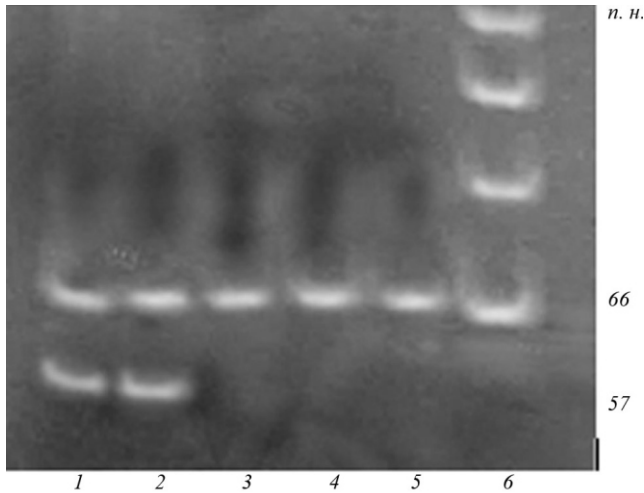


Рис. 5. Аналіз мутації *T538R* в екзоні 12 гена *TGFBI* у хворих на гратчасту дистрофію рогівки (ПЛР + *HinfI*; 10 %-й ПААГ): 1, 2 – хворі індивіди; 3, 4, 5 – здорові індивіди; 6 – маркер молекулярної маси *pUC19DNA/MspI*

що зазначена мутація, вперше виявлена Отенін-Жирардом та співавт., як і мутація *Hys626Arg*, можуть бути асоційовані з проміжним типом І/ІА [30, 52]. Особливо цікавим є той факт, що у пацієнтів з чотирьох родин, де визначено мутацію *Hys626Arg*, відмічено так звану асиметрію прояву клінічних ознак. Це було видно з того, що патологічні депозити спостерігаються спочатку в одному оці і лише через декілька років слабкі прояви гратчастої дистрофії можна виявити в іншому оці. На даний момент ще ніхто з дослідників не запропонував вірогідного механізму подібних процесів і, можливо, детальніше вивчення структури і властивостей мутантного білка і його взаємодії з білками-партнерами проллють світло на природу феномену асиметрії.

Серед досліджуваних нами родин чотири були з характерними симптомами гратчастої дистрофії (тип ІV). У жодній з них мутацій не виявлено.

На думку Клоут і Хохенестера, гарячі точки для мутацій в положеннях *Arg124* та *Arg555* розташовані в послідовності, яка кодує ділянку поєднання альфа-спіралей в 1-му та 4-му доменах білка і заміни цих амінокислотних залишків скоріше порушують стабільність і розчинність білка, аніж його структуру [13]. Мутації *Arg124His* та *Arg124Cys* зумовлюють утворення амілоїдних депозитів, проте

інші мутації в положеннях *Arg124* та *Arg555* роблять білок гідрофобнішим і тому спричиняють формування гіалінових депозитів. З іншого боку, існує думка, що більшість мутацій, які знаходяться 4-му *Fas1*-домени, істотніше впливають на структуру білка, оскільки розміщені в консервативних положеннях. Однак це не пояснює, чому мутації в інших трьох гомологічних доменах *tgfb1* суттєво не порушують структуру білка.

Виходячи з результатів моделювання третинної структури домену 4 білка *tgfb1* зроблено припущення, що мутація *Thr538Arg*, яка призводить до заміни треоніну на аргінін, зумовлює порушення фолдингу білкового продукту, що в свою чергу унеможливує секрецію білка [13]. Автори роботи прогнозують, що у пацієнтів з даною мутацією амілоїдні депозити мають виникати в першій декаді життя. Проте в нашому дослідженні мутацію *Thr538Arg* виявлено у пацієнта, у якого перші прояви захворювання почали з'являтися в третій декаді життя.

Грунтуючись на результатах моделювання, при мутації *Ala546Thr* секреція білка стає неможливою, оскільки ця мутація призводить до його суттєвої дестабілізації. Мутація *His626Arg* порушує водневі зв'язки. Окрім того, консервативність гістидину в даному положенні, яка спостерігається в доменах усіх білків *fas1*-суперродини, свідчить про його важливість для процесу фолдингу, і тому малоімовірно, що білок з мутацією *His626Arg* буде зазнавати фолдингу і секретуватися. За прогнозованими функціями мутантних білків, визначеними по результатах моделювання третинної структури, можна припустити, що в пацієнтів, у яких виявлено мутації *Thr538Arg* і *His626Arg*, буде спостерігатися ранній прояв захворювання. Однак отримані нами дані не дозволяють підтвердити таке припущення. В усіх наших пацієнтів із зазначеними мутаціями, за винятком одного з попереднім клінічним діагнозом гратчастої дистрофії І типу і раннім проявом захворювання, початок маніфестації хвороби був у 3–4-й декаді життя.

Накопичення мутантного білка *tgfb1* у вигляді нерозчинних депозитів відбувається лише в рогівці, хоча цей білок експресується і в інших тканинах, тому можна стверджувати, що до патогенезу залучені тканиноспецифічні фактори. Досі ще не зро-

зуміло, чому мутації в одному гені або навіть мутації в одному кодоні здатні зумовлювати такі різні фенотипічні прояви. Наприклад, при заміні аргініну в кодоні 124 на цистеїн, лейцин, серин, гістидин у роگیці утворюються депозити амліоїду, гіаліну або змішані.

Донедавна діагноз різних форм спадкових дистрофій строми роگیки встановлювали на основі характерної клінічної картини, а також типових морфологічних і гістохімічних ознак. Зважаючи на те, що морфологічні і гістохімічні дослідження на матеріалі роگیки можливі лише після проведення кератопластики, основну роль у постановці діагнозу в дохірургічний період відіграє клінічна картина захворювання.

Молекулярно-генетичний аналіз мутацій у гені *TGFBI* є високоінформативним для точної диференційної діагностики спадкових дистрофій строми роگیки, суттєвим також є можливість проведення досимптоматичної діагностики у членів родин хворих і прогнозування перебігу захворювання з терапевтичним застосуванням.

Грунтуючись на отриманих нами та іншими дослідниками даних щодо асоціації мутантних варіантів гена *TGFBI* з клінічними проявами дистрофії строми роگیки можна зробити висновок про те, що для розуміння патогенезу цього захворювання подальші зусилля мають бути спрямовані на встановлення природи взаємодії тканинспецифічних факторів і мутантного білка *tgfb1* у роگیці, а також на з'ясування факторів, які впливають на його структуру і стабільність.

V. M. Pampukha, G. I. Drozhyna, L. A. Livshits

Study of *TGFBI* gene mutations in Ukrainian patients with corneal dystrophies

#### Summary

In our study *Arg124Cys* (exon 4), *Thr538Arg*, *Ala546Thr*, *Arg555Thr*, *Arg555Gln* (exon 12), *His626Arg* (exon 14) mutations of the *TGFBI* gene were analyzed using polymerase chain reaction followed by restriction digestion in 91 patients with different forms of corneal dystrophy and 31 clinically healthy individuals from 49 unrelated families. Our results show that *TGFBI* gene mutations analysis is important for differential diagnostics of corneal dystrophies with prognostic and therapeutic implications as well as for genetic consulting in high risk families.

Keywords: *TGFBI* gene, keratoepithelin, corneal dystrophy.

В. Н. Пампуха, Г. И. Дрожжина, Л. А. Лившиц

Исследование мутаций гена *TGFBI* у больных с дистрофиями строми роговицы, проживающих в Украине

#### Резюме

Проанализированы мутации *Arg124Cys* (экзон 4), *Thr538Arg*, *Ala546Thr*, *Arg555Thr*, *Arg555Gln* (экзон 12), *His626Arg* (экзон 14) гена *TGFBI* с использованием метода полимеразной цепной реакции с последующей рестрикцией у 91 пациента с разными формами дистрофии роговицы и среди 31 клинически здорового индивида из 49 неродственных семей. Полученные результаты свидетельствуют о том, что анализ мутаций в гене *TGFBI* имеет важное значение в дифференциальной диагностике дистрофий роговицы с прогностическим и терапевтическим применением, а также для генетического консультирования в семьях высокого риска.

Ключевые слова: ген *TGFBI*, кератоэпителин, дистрофия роговицы

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Skonier J., Neubauer M., Madisen L., Bennett K., Plowman G. D., Purchio A. F. cDNA cloning and sequence analysis of beta ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor-beta // *DNA Cell Biol.*—1992.—**11**.—P. 511–522.
2. Escibano J., Hernando N., Ghosh S., Crabb J., Coca-Prados M. cDNA from human ocular ciliary epithelium homologous to beta ig-h3 is preferentially expressed as an extracellular protein in the corneal epithelium // *J. Cell Physiol.*—1994.—**160**.—P. 511–521.
3. Klintworth G. K., Enghild J. J., Valnickova Z. Discovery of a novel protein (beta ig-H3) in normal human cornea // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*—1994.—**35** (Suppl).—P. 1938.
4. Stone E. M., Mathers W. D., Rosenwasser G. O. D., Holland E. J., Folberg R., Krachmer J. H., Nichols B. E., Gorevic P. D., Taylor C. M., Streb L. M., Fishbaugh J. A., Daley T. E., Sucheski B. M., Sheffield V. C. Three autosomal dominant corneal dystrophies map to chromosome 5q // *Nat. Genet.*—1994.—**6**.—P. 47–51.
5. 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.
6. 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 growth factor-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.
7. Kim J. E., Kim S. J., Lee B. H., Park R. W., Kim K. S., Kim I. S. Identification of motifs for cell adhesion within the repeated domains of transforming growth factor-beta-induced gene, betaig-h3 // *J. Biol. Chem.*—2000.—**275**.—P. 30907–30915.
8. Arnaout M. A., Goodman S. L., Xiong J. P. Coming to grips with integrin binding to ligands // *Curr. Opin. Cell Biol.*—2002.—**14**.—P. 641–651.
9. Hashimoto K., Noshiro M., Ohno S., Kawamoto T., Satakeda H., Akagawa Y., Nakashima K., Okimura A., Ishida H., Okamoto T., Pan H., Shen M., Yan W., Kato Y.

- Characterization of a cartilage-derived 66-kDa protein (RGD-CAP/betaig-h3) that binds to collagen // *Biochim. et Biophys. Acta.*–1997.–**1355**.– P. 303–314.
10. Hanssen E., Reinboth B., Gibson M. A. Covalent and non-covalent interactions of betaig-h3 with collagen VI. Betaig-h3 is covalently attached to the amino-terminal region of collagen VI in tissue microfibrils // *J. Biol. Chem.*–2003.–**278**.–P. 24334–24341.
  11. Billings P. C., Whitbeck J. C., Adams C. S., Abrams W. R., Cohen A. J., Egelsberg B. N., Howard P. S., Rosenbloom J. The transforming growth factor-beta-inducible matrix protein (beta)ig-h3 interacts with fibronectin // *J. Biol. Chem.*–2002.–**277**.–P. 28003–28009.
  12. Zinn K., McAllister L., Goodman C. S. Sequence analysis and neuronal expression of fasciclin I in grasshopper an *Drosophila* // *Cell.*–1988.–**53**.–P. 577–587.
  13. Clout N., Hohenester E. A model of FAS1 domain 4 of the corneal protein big-h3 gives a clearer view on corneal dystrophies // *Mol. Vis.*–2003.–**9**.–P. 440–448.
  14. Waring G., Rodrigues M., Laibson R. Corneal dystrophy. Dystrophies of the epithelium, Bowman layer and stromas // *Surv. Ophthalmol.*–1978.–**23**.–P. 97–101.
  15. Jones M., Zimmerman L. Histopathologic differentiation of granular, Macular and lattice Dystrophies of the cornea // *Amer. J. Ophthalmol.*–1960.–**51**.–P. 102–116.
  16. 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 *TGFBI* gene // *Ophthalmology.*–2001.–**108**.–P. 818–823.
  17. 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.
  18. Pampukha V. M., Drozhyna G. I., Livshits L. A. *TGFBI* gene mutation analysis in families with hereditary corneal dystrophies from Ukraine // *Ophthalmologica.*–2004.–**218**.–P. 411–414.
  19. Okada M., Yamamoto S., Watanabe H., Inoue Y., Tsujikawa M., Maeda N., Shimomura Y., Nishida K., Kinoshita S., Tano Y. Granular corneal dystrophy with homozygous mutations in the kerato-epithelin gene // *Amer. J. Ophthalmol.*–1998.–**126**.–P. 169–176.
  20. Mashima Y., Konishi M., Nakamura Y., Imamura Y., Yamada M., Ogata T., Kudoh J., Shimizu N. Severe form of juvenile corneal stromal dystrophy with homozygous R124H mutation in the keratoepithelin gene in five Japanese patients // *Br. J. Ophthalmol.*–1998.–**82**.–P. 1280–1284.
  21. Kanai A., Tonaka M., Kaneno H., Niwa Y., Nakajima A. A clinical and histopathological studies of the lattice dystrophy of the cornea // *Acta Soc. Ophthalmol. Jap.*–1973.–**77**.–P. 357–367.
  22. Dubord P. I., Krachmer I. Diagnosis of the early lattice corneal dystrophy // *Arch. Ophthalmol.*–1982.–**100**.–P. 788–790.
  23. Майчук Ю. Ф., Орловская Л. Е. Стромальные дистрофии – клинические формы и лечение // *Офтальмолог. журн.*–1993.–**4**.–С. 224–232.
  24. Endo S., Nguyen T. H., Fujiki K., Hotta Y., Nakayasu K., Yamaguchi T., Ishida N., Kanai A. Leu518Pro mutation of the beta ig-h3 gene causes lattice corneal dystrophy type I // *Amer. J. Ophthalmol.*–1999.–**128**.– P. 104–106.
  25. Warren J. F., Abbott R. L., Yoon M. K., Crawford J. B., Spencer W. H., Margolis T. P. A new mutation (Leu569Arg) within exon 13 of the *TGFBI* (*BIGH3*) gene causes lattice corneal dystrophy type I // *Amer. J. Ophthalmol.*–2003.–**136**.–P. 872–878.
  26. Chakravarthi S., Kannabiran C., Sridhar M. S., Vemuganti G. K. *TGFBI* gene mutations causing lattice and granular corneal dystrophies in Indian patients // *Invest. Ophthalmol. Vis.*–2005.–**46**.–P. 121–125.
  27. 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.
  28. Yamamoto S., Okada M., Tsujikawa M., Shimomura Y., Nishida K., Inoue Y., Watanabe H., Maeda N., Kurahashi H., Kinoshita S., Nakamura Y., Tano Y. A kerato-epithelin (beta-ig-h3) mutation in lattice corneal dystrophy type IIIA // *Amer. J. Hum. Genet.*–1998.–**62**.–P. 719–722.
  29. 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.
  30. Munier F. L., Frueh B. E., Othenin-Girard P., Uffer S., Cousin P., Wang M. X., Heon E., Black G. C. M., Blasi M. A., Balestrazzi E., Lorenz B., Escoto R., Barraquer R., Hoeltzenbein M., Gloor B., Fossarello M., Singh A. D., Arsenijevic Y., Zografos L., Schorderet D. F. *BIGH3* mutation spectrum in corneal dystrophies // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*–2002.–**43**.–P. 949–954.
  31. 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 *TGFBI* (*BIGH3*) gene on chromosome 5q31 causes an asymmetric, late-onset form of lattice corneal dystrophy // *Ophthalmology.*–1999.–**106**.–P. 964–970.
  32. 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.
  33. Fujiki K., Hotta Y., Nakayasu H. A new L527R mutation of the beta-*IGH3* gene in patients with lattice corneal dystrophy with deep stromal opacities // *Hum. Genet.*–1998.–**103**.–P. 283–286.
  34. Groenouw A. Knotchenformige Hornhauttrübungen (noduli corneae) // *Arch. Augenheilk.*–1890.–**21**.–P. 281–289.
  35. Weidle E. Epitheliale und stromale Hornhautdystrophien // *Der Ophthalmologe.*–1996.–**93**.–P. 754–767.
  36. Witschel H. Hornhautdystrophien und Molekulargenetik // *Der Ophthalmologe.*–2002.–**99**.–P. 415–417.
  37. Smolin G., Thoft R. Corneal dystrophies and degeneration // *The cornea* / Third ed.–Boston etc., 1994.–P. 499–524.
  38. Stewart H. S., Ridgway A. E., Dixon M. J., Bonshek R., Parveen R., Black G. Heterogeneity in granular corneal dystrophy: identification of three causative mutations in the *TGFBI* (*BIGH3*) gene-lessons for corneal amyloidogenesis // *Hum. Mutat.*–1999.–**14**.–P. 126–132.
  39. Holland E., Daya S. M., Stone S. M. Avellino corneal dystrophy: clinical manifestation and natural history // *Ophthalmology.*–1992.–**99**.–P. 1564–1568.
  40. Akiya S., Takahashi H., Nakano N., Hirose N., Tokuda Y. Granular-lattice (Avellino) corneal dystrophy // *Ophthalmologica.*–1999.–**213**.–P. 58–62.
  41. Rodrigues M., Krachmer J. Recent advances in corneal stromal dystrophies // *Cornea.*–1988.–**7**.–P. 19–29.
  42. Ruusuvaara P., Setälä K., Tarkkainen A. Granular corneal dystrophy with early stromal manifestation. A clinical and electron microscopical study // *Acta Ophthalmologica.*–1990.–**68**.–P. 525–531.
  43. Okada M., Yamamoto S., Tsujikawa M., Watanabe H., Inoue Y., Maeda N., Shimomura Y., Nishida K., Quantock A. J., Kinoshita S., Tano Y. Two distinct kerato-epithelin mutations



- in Reis-Bucklers corneal dystrophy // *Amer. J. Ophthalmol.*—1998.—**126**.—P. 535–542.
44. Rozzo C., Fossarello M., Galleri G., Sole G., Serru A., Orzalesi N., Serra A., Pirastu M. A common beta-ig-h3 gene mutation (delta-f540) in a large cohort of Sardinian Reis Bucklers' corneal dystrophy patients // *Hum. Mutat.*—1998.—**12**.—P. 215–216.
45. Afshari N. A., Mullally J. E., Afshari M. A., Steinert R. F., Adamis A. P., Azar D. T., Talamo J. H., Dohlman C. H., Dryja T. P. Survey of patients with granular, lattice, Avellino, and Reis-Bucklers corneal dystrophies for mutations in the *BIGH3* and *gelsolin* genes // *Arch. Ophthalmol.*—2001.—**119**.—P. 16–22.
46. Weidle E. Differential Diagnose der Hornhautdystrophien vom Groenouw Typ I, Reis-Bucklers und Thiel-Benke // *Fortschritt Ophthalmol.*—1989.—**106**.—P. 65–71.
47. Weidle E. Honeycomb-shaped corneal dystrophy of Thiel and Benke. Reclassification and distinction from Reis-Bucklers corneal dystrophy // *Klin. Monatsbl. Augenheilk.*—1999.—**214**.—P. 125–135.
48. Yee R. W., Sullivan L. S., Lai H. T., Stock E. L., Lu Y., Khan M. N., Blanton S. H., Daiger S. P. Linkage mapping of Thiel-Behnke corneal dystrophy (CDB2) to chromosome 10q23-q24 // *Genomics*.—1997.—**46**.—P. 152–154.
49. Дрожжина Г. І., Вит В. В., Думброва Н. Е. Молекулярно-генетический и клинико-морфологический анализ больных с решетчатой наследственной дистрофией роговицы // *Офтальмол. журн.*—2002.—**2**.—С. 37–41.
50. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—420 с.
51. 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**, N 8580.—P. 487–491.
52. Othenin-Girard P., Frueh-Epstein B., Gloor B. Identification of mutations in autosomal dominant corneal dystrophies // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*—1999.—**40** (Suppl).—P. 563.

УДК 575.11:577.21:576.31:617.713-007.17-02

Надійшла до редакції 04.06.07