



Genomika a oko

VAL C. SHEFFIELD, MD, PhD, EDWIN M. STONE, MD, PhD



Oko odegrało kluczową rolę w rozwoju genomiki człowieka. Przynajmniej 90% genów ludzkiego genomu ulega w pewnym momencie życia osobniczego ekspresji w jednej lub kilku spośród licznych typów tkanek i komórek oka.

W zgodzie z tymi robiącymi wrażenie danymi genomowymi pozostaje stwierdzenie, że w około jednej trzeciej jednostek chorobowych w bazie danych Online Mendelian Inheritance in Man, dla których przygotowano podsumowanie kliniczne, znajduje się termin odnoszący się do struktury lub czynności oka [1]. Co więcej, skutki fenotypowe nawet niewielkich zmian genetycznych stają się dobrze widoczne w wyniku wielowarstwowego wzmocnienia sygnału w ramach układu wzrokowego człowieka. Na przykład zmiana pojedynczego nukleotydu w obrębie genu *PAX6* może powodować anatomiczne nieprawidłowości plamki o średnicy mniejszej niż milimetr, co jednak ostatecznie powoduje znaczące osłabienie ostrości wzroku i oczopląs [2].

Dziedziczna niezdolność do prawidłowego odbioru barwy zielonej, znana jako daltonizm (od nazwiska angielskiego chemika Johna Daltona, który opisał własny przypadek), była pierwszą ludzką cechą zmapowaną na chromosomie X [3]. (Na rycinie 1 przedstawiono diagram czasowy ważnych odkryć historycznych w tej dziedzinie.) Zaćma Coppocka była z kolei pierwszą ludzką cechą zmapowaną na autosomie [4], zaś dziedziczna neuropatia nerwów wzrokowych Lebera pierwszą chorobą występującą u ludzi, spowodowaną, jak wykazano, mutacją mitochondrialnego DNA [5]. Ostatnio stwierdzono również, że dwie powszechne przyczyny ślepoty – zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (age-related macular degeneration, AMD) oraz jaskra pierwotna otwartego kąta [6,7] – są w znacznej mierze uwarunkowane genetycznie, podobnie jak dystrofia śródbłonkowa rogówki Fuchsa [8], będąca najczęstszym wskazaniem do przeszczepiania rogówek w krajach rozwiniętych. Autorzy niniejszego arty-

kułu przedstawiają przegląd odkryć dotyczących jednogenowych i wieloczynnikowych chorób oczu oraz ich wpływ na diagnostykę genetyczną i interwencje terapeutyczne.

Diagnostyka genetyczna

Współczesna era okulistyki molekularnej rozpoczęła się w 1985 r. wraz z odkryciem genu RB1, którego mutacje odpowiadają za rozwój siatkówczaka (retinoblastoma) [9]. Od tego czasu odkryto setki innych genów odpowiedzialnych za szeroką gamę ważnych chorób, takich jak AMD, jaskra, zaćma wrodzona, zespołowe i niezespołowe postacie zwyrodnień fotoreceptorów, a także różnorodne dystrofie plamki, dystrofie rogówki, witreoretinopatie i neuropatie nerwów wzrokowych. Każde odkrycie nowej genetycznej przyczyny choroby zwiększa możliwości wykorzystania badań molekularnych próbek DNA pobranych od pojedynczego chorego jako dopełnienia rozpoznania klinicznego, rokowania i poradnictwa. Ponadto osoby, u których wykryto obecność znanych mutacji chorobotwórczych, mogą zostać włączone do badań klinicznych nad nowymi metodami leczenia, a także dokładnie przebadane klinicznie, by szczegółowo określić naturalny przebieg ich choroby w czasie [10,11]. Pobrane od chorych próbki, w których nie wykryto mutacji w obrębie znanych genów przyczynowych, również są cennym materiałem dla naukowców poszukujących nowych genów przyczynowych dla danej choroby.

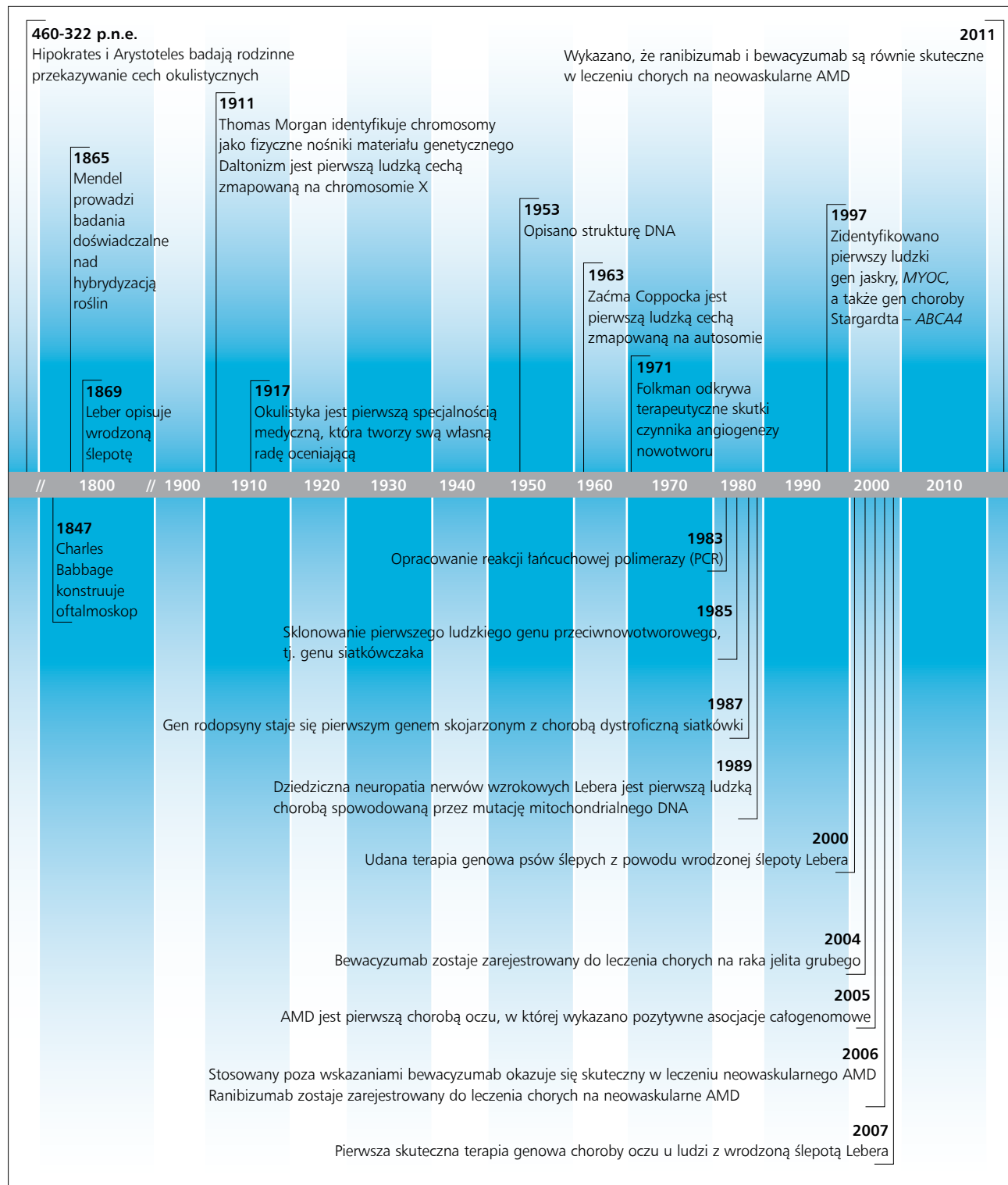
Głównym utrudnieniem w wykorzystaniu pojawiających się informacji genetycznych w praktyce klinicznej jest luka między liczbą informacji niezbędną do

Departments of Pediatrics (V.C.S.) i Ophthalmology and Visual Sciences (V.S.C. i E.M.S.), Howard Hughes Medical Institute, University of Iowa Carver College of Medicine, Iowa City, IA, Stany Zjednoczone

Adres do korespondencji: Dr Stone, University of Iowa Institute for Vision Research, 375 Newton Rd., Iowa City, IA 52242, USA; e-mail: edwin-stone@uiowa.edu

N Engl J Med 2011; 364:1932-43

Interaktywna grafika przedstawiająca mutację ABCA4 jest dostępna na stronie NEJM.org



Rycina 1. Historyczne etapy rozwoju genetyki okulistycznej

AMD – zwyrodnienie plamki związane z wiekiem.

Słowniczek

Allel: jeden z dwóch lub więcej wariantów genetycznej sekwencji o konkretnej lokalizacji w genomie.

Autosom: każdy chromosom (oznaczany 1-22), z wyjątkiem chromosomów płciowych X i Y oraz genomu mitochondrialnego.

Badania sprzężeń: metoda identyfikacji genetycznego podłoża choroby, oparta na korelowaniu schematu dziedziczenia choroby w rodzinie z dziedziczeniem swoistych alleli markerów genetycznych o znanej lokalizacji.

Całogenomowe badania asocjacji: metoda stosowana w badaniach genetycznych, mająca na celu poszukiwanie asocjacji między setkami lub tysiącami swoistych wariantów genowych (najczęściej polimorfizmów pojedynczych nukleotydów) a występowaniem konkretnej choroby.

Kodon: trójnukleotydowa sekwencja DNA lub RNA, kodująca swoisty aminokwas.

Kompleks chaperonowy: oligomeryczne białko, które asystuje przy zginaniu, prostowaniu, składaniu i rozkładaniu innych struktur makromolekularnych, nie włączając się trwale w owe struktury.

Locus: swoista lokalizacja chromosomowa genu lub innej sekwencji DNA.

Mutacja *de novo* (mutacja świeża): każda zmiana sekwencji DNA, która następuje w czasie replikacji, np. dziedziczna zmiana w obrębie genu, która pojawia się w rodzinie po raz pierwszy w wyniku zmiany sekwencji DNA w komórce rozrodczej lub w zygocie.

Mutacja nonsensowna: zmiana pojedynczego nukleotydu w łańcuchu DNA, po której nowo powstały kodon sygnalizuje zakończenie translacji, prowadząc w ten sposób do skrócenia białka kodowanego przez dany gen.

Mutacja promotorowa: zmiana sekwencji promotora w obrębie prawidłowego pod innym względem genu, która bardzo silnie zmniejsza ekspresję genu.

Mutacja splicingowa: zmiana sekwencji na granicy intron-ekson lub w jej pobliżu, która zakłóca prawidłowy przebieg procesu składania RNA w tym regionie.

Mutacja utraty funkcji: mutacja, która zmniejsza produkcję białka i/lub ogranicza jego funkcję.

Mutacja zmiany sensu: zmiana pojedynczego nukleotydu w łańcuchu DNA, po której nowo powstały kodon koduje inny aminokwas niż kodon oryginalny.

Penetracja: prawdopodobieństwo, że osoba przenosząca dany nieprawidłowy wariant genu będzie wykazywać wykrywalne zmiany fenotypu (będzie chorować).

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu: zmiana pojedynczego nukleotydu w sekwencji genetycznej, będąca popularną formą zróżnicowania ludzkiego genomu.

Ryzyko przypisane populacji: różnica między częstością występowania choroby w populacji narażonej na dany czynnik ryzyka i w populacji nienarażonej. Suma ryzyk przypisanych populacji odnoszących się do pojedynczych czynników ryzyka powodujących daną chorobę (np. AMD) często przekracza 100%, ponieważ u danej osoby choroba może być spowodowana przez kombinację czynników, które są liczone kilkakrotnie, gdy sumowane są indywidualne ryzyka przypisane populacji.

Zmiana liczby kopii: obserwowane między osobnikami różnice w liczbie kopii konkretnego genu lub innej sekwencji DNA. Pełne znaczenie zmian liczby kopii w patogenezie chorób człowieka nie zostało dotąd poznane.

przekonującego wykazania, że dany gen pełni w badanej grupie chorych rolę patogenną, a liczbą informacji niezbędnych do wiarygodnego dowiedzenia, że konkretny wariant genetyczny jest odpowiedzialny za rozwój choroby u konkretnego pacjenta. Niektóre z czynników odpowiedzialnych za tę lukę to: duża liczba neutralnych wariantów wielu genów niepowodujących zmian fenotypowych, znaczne zróżnicowanie rzeczywistych mutacji przyczynowych (np. mutacje zmiany sensu, nonsensowne, splicingowe, promotorowe lub

zmiany liczby kopii) (patrz słowniczek), genetyczne różnice między różnymi grupami etnicznymi, genetyczna heterogenność wielu fenotypów (np. zwyrodnienie barwnikowe siatkówki może być spowodowane przez mutację w jednym z ponad 40 genów) oraz zróżnicowanie kliniczne chorych z podobnymi genotypami.

Ponieważ nie wszystkie warianty genetyczne są równie prawdopodobnymi przyczynami choroby, niektórzy badacze zaproponowali metody uwzględniające standaryzowanie

tych wątpliwości podczas interpretacji wyników badań genetycznych [12]. Możliwość wykorzystania sekwencjonowania całego genomu jako narzędzia diagnostycznego podkreśla potrzebę takiej interpretacji uwzględniającej rachunek prawdopodobieństwa, ponieważ każda zdrowa osoba jest nosicielem kilku mutacji powodujących choroby recesywne, które są przypadkowe i nie mają żadnego związku z jakąkolwiek chorobą, na którą dana osoba może zachorować w takcie swojego życia. Na przykład u około 1 na 30 Europejczyków występuje heterozygotyczna delecja kodonu 508 w genie *CFTR* powodującym mukowiscydozę [13]. Zdolność do odróżnienia nowo odkrytych łagodnych wariantów od zmian mogących mieć znaczenie patogenetyczne jest kluczowa w interpretacji danych genetycznych, zwłaszcza generowanych masowo, np. w czasie sekwencjonowania całego genomu danego osobnika. Jak wszystko w medycynie, również wynik badania genetycznego nabierze większego znaczenia, jeśli będzie poprzedzony uzasadnioną hipotezą badawczą. Rozwój okulistyki molekularnej zwiększa zatem zapotrzebowanie na doświadczonych praktykujących lekarzy, którzy potrafią umieścić obserwowany wariant genetyczny w odpowiednim kontekście klinicznym.

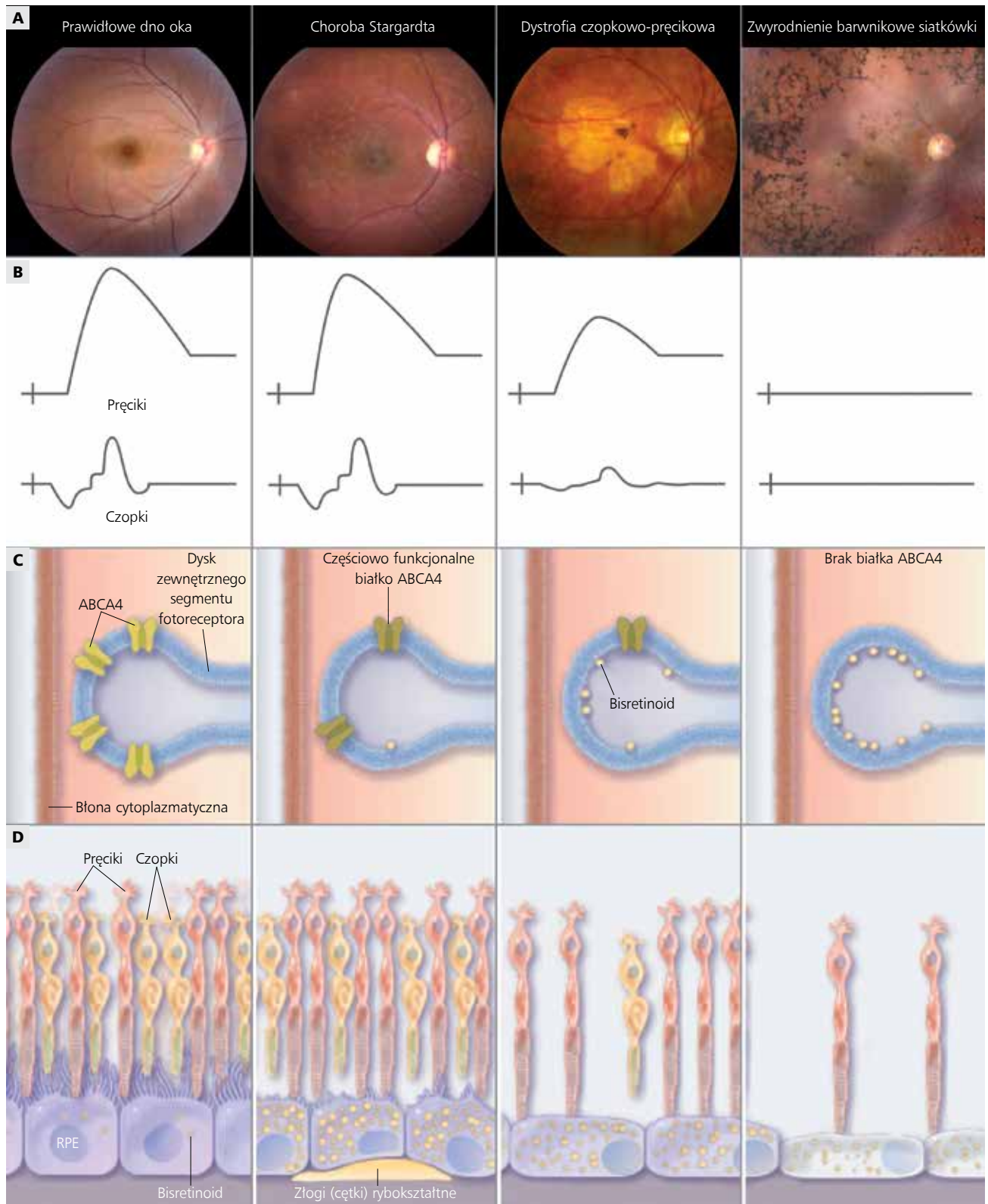
Choroby jednogenowe

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) najpowszechniejszymi przyczynami ślepoty na świecie są: zaćma, jaskra, AMD, zmętnienie rogówek, retinopatia cukrzycowa, zakażenia oraz choroby pasożytnicze [14]. Czynniki genetyczne odgrywają istotną rolę w rozwoju wielu z tych chorób, ujawniających się niekiedy w postaci względnie rzadkich chorób jednogenowych o wysokiej penetracji, a niekiedy w postaci powszechniejszych chorób, powodowanych przez złożone interakcje licznych genów i czynników środowiskowych. Z wielu znanych jednogenowych chorób oczu autorzy wybrali trzy, aby zilustrować szerokie spektrum różnorodnych mechanizmów patogenetycznych prowadzących do ślepoty u ludzi.

Jedną z najważniejszych przyczyn jednogenowych chorób siatkówki u ludzi jest mutacja genu *ABCA4*, zidentyfikowana przez Allikmetsa w 1997 r. jako przyczyna choroby Stargardta [15]. Gen *ABCA4* koduje białko enzymatyczne, które przenosi retinoidowy produkt pośredni cyklu wzrokowego, znany jako N-retinylideno-fosfatydyloetanolamina (N-retPE) z wewnętrznej na zewnętrzną powierzchnię błony dysków zewnętrznego segmentu fotoreceptorów [16] (ryc. 2 i interaktywna grafika dostępna wraz z pełnym tekstem artykułu na stronie NEJM.org). Mutacje genu

ABCA4 powodują odkładanie się N-retPE wewnątrz dysku, co z kolei prowadzi do powstawania toksycznego nierozpuszczalnego bisretinoidu, znanego jako A2E. Zmiany sekwencji genu *ABCA4* są odpowiedzialne za ponad 95% przypadków choroby Stargardta, 30% przypadków autosomalnych recesywnych dystrofii czopkowo-pręcikowych oraz 8% przypadków autosomalnego recesywnego zwyrodnienia barwnikowego siatkówki [17]. Tak szeroka gama fenotypów jest skutkiem interakcji co najmniej trzech czynników: stopnia resztkowej aktywności enzymatycznej skojarzonego z danym genotypem, większego uszkodzenia fotoreceptorów czopkowych niż fotoreceptorów pręcikowych przez odkładanie się A2E oraz wtórnego uszkodzenia zarówno pręcików, jak i czopków przez uszkodzenie nabłonka barwnikowego siatkówki [10]. Mutacje genu *ABCA4* o względnie małym wpływie powodują odkładanie się A2E w obrębie i poniżej nabłonka barwnikowego siatkówki, mutacje o działaniu pośrednim przyczyniają się do bezpośredniego uszkodzenia fotoreceptorów, w pewnym stopniu wybiórczego dla czopków, zaś mutacje działające najsilniej uszkadzają zarówno fotoreceptory czopkowe, jak i pręcikowe [17].

Drugim przykładem jest mutacja genu *MYOC* w przebiegu autosomalnej dominującej młodzieńczej jaskry pierwotnej otwartego kąta, która prowadzi do niepożądanego przemieszczania prawidłowo wydzielanego białka siateczki beleczkowania do peroksysomów. Badania sprzężeń wykonane w kilku dużych rodzinach pozwoliły zmapować mutację przyczynową na długim ramieniu chromosomu 1 [18], a dalsze badania tego regionu doprowadziły do okrycia mutacji genu *MYOC* jako przyczyny choroby [19]. Niektóre mutacje typu zmiany sensu są skojarzone z występowaniem bardzo wysokiego ciśnienia wewnątrzgałkowego i wczesną utratą wzroku, podczas gdy mutacja nonsensowna w obrębie kodonu 368 jest skojarzona z łagodną postacią choroby, rozpoczynającą się w późniejszym wieku [20]. Jest to dość nieoczekiwane spostrzeżenie, ponieważ mutacje nonsensowne powodują zwykle cięższe zaburzenia integralności białka niż mutacje typu zmiany sensu. Później odkryto, że mutacja typu zmiany sensu w genie *MYOC* powoduje nieprawidłowe fałdowanie białka miocyliny, co prowadzi do ujawnienia ukrytego zwykle sygnału kierującego miocylinę do peroksysomów [21]. Obserwowane w wyniku tego działania wewnątrzkomórkowe nagromadzenie miocyliny powoduje uszkodzenie komórek budujących siateczkę beleczkowania, co z kolei zmniejsza odpływ cieczy wodnistej. Zwiększone ciśnienie wewnątrzgałkowe jest następstwem ograniczonego odpływu cieczy wodnistej i powoduje uszkodzenie nerwu wzrokowego. Wykazano, że mutacje



Rycina 2. (na sąsiedniej stronie)

Choroby siatkówki skojarzone z mutacjami genu ABCA4

W części A przedstawiono zestaw fotografii siatkówek chorych z postępującym zmniejszeniem ilości funkcjonalnego białka ABCA4 (od lewej do prawej), poczynawszy od prawidłowej siatkówki, przez chorobę Stargarda, dystrofię czopkowo-pręcikową, do zwyrodnienia barwnikowego siatkówki.

W części B przedstawiono wpływ zmniejszonej czynności białka ABCA4 na kształt pełnopolowego elektroretinogramu. Względnie łagodne osłabienie funkcji białka ABCA4 u osób dotkniętych chorobą Stargarda ma niewielki wpływ na ogólną czynność fotoreceptorów. Umiarkowana utrata funkcji białka ABCA4 u chorych z dystrofią czopkowo-pręcikową wywiera większy wpływ na fotoreceptory czopkowe niż na fotoreceptory pręcikowe. Całkowita utrata funkcji białka ABCA4 obserwowana u niektórych chorych ze zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki jest skojarzona z rozległą utratą zarówno czopków, jak i pręcików i wygaszonym elektroretinogramem. W części C przedstawiono wpływ osłabionej funkcji białka ABCA4 na odkładanie się bisretinoidu (żółte symbole) na wewnętrznej powierzchni błon dysku zewnętrznego segmentu fotoreceptorów. Łagodne zmniejszenie aktywności białka ABCA4 w przebiegu choroby Stargarda jest skojarzone z niewielkim odkładaniem bisretinoidu, umiarkowana utrata funkcji obserwowana w dystrofii czopkowo-pręcikowej jest skojarzona z pośrednim nasileniem akumulacji, zaś całkowita utrata funkcji u chorych ze zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki wiąże się z maksymalnym odkładaniem bisretinoidu. W części D przedstawiono histopatologiczne skutki zmniejszonej aktywności białka ABCA4. U osób z chorobą Stargarda nasilenie odkładania bisretinoidu w zewnętrznych segmentach fotoreceptorów jest stosunkowo niewielkie, a fotoreceptory nie są bezpośrednio uszkodzane. Bisretinoidy są dostarczane do lizosomów wtórnych komórek nabłonka barwnikowego siatkówki (retinal pigment epithelium, RPE) w czasie prawidłowej fagocytozy zewnętrznych segmentów fotoreceptorów. Część tego materiału odkłada się pod RPE jako tzw. złogi (cętki) ryboształtne, które są widoczne w badaniu oftalmoskopowym. U chorych z dystrofią czopkowo-pręcikową umiarkowane osłabienie funkcji białka ABCA4 powoduje na tyle duże odkładanie się bisretinoidów w zewnętrznych segmentach fotoreceptorów, by spowodować apoptozę fotoreceptorów (bardziej nasiloną wśród czopków niż wśród pręcików).

U chorych ze zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki całkowita utrata funkcji białka ABCA4 powoduje rozległe odkładanie się bisretinoidów w zewnętrznych segmentach fotoreceptorów, apoptozę zarówno fotoreceptorów pręcikowych, jak i czopkowych, a także współistniejące ścięczenie RPE.

genu *MYOC* odpowiadają za około 4% wszystkich przypadków pierwotnej jaskry otwartego kąta, również tych, które ujawniają się w późniejszym wieku [19].

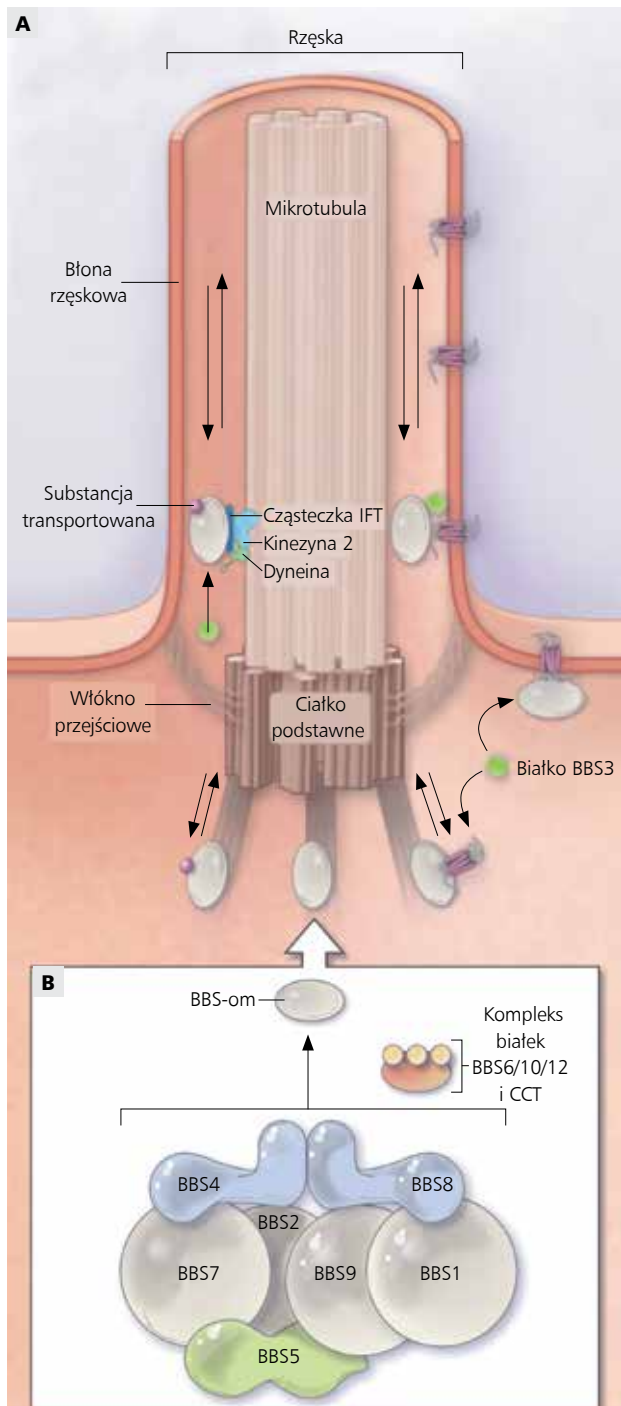
Trzeci przykład ilustruje zjawisko heterogenności genetycznej. Mutacje w jednym z przynajmniej 14 genów mogą powodować jednostkę chorobową znaną jako zespół Bardeta i Biedla (Bardet-Biedl syndrome, BBS). Zespół

ten jest wieloukładową chorobą autosomalną recesywną, która charakteryzuje się współwystępowaniem: zwyrodnienia barwnikowego siatkówki, otyłości, polidaktylii, wrodzonych wad serca, chorób nerek, hipogonadyzmu, zaburzeń poznawczych oraz zwiększonego ryzyka rozwoju nadciśnienia tętniczego i cukrzycy [22]. U chorych z BBS dochodzi do postępującego zwyrodnienia fotoreceptorów i zwykle całkowicie tracą oni wzrok pod koniec trzeciej dekady życia. Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych wykazały, że białka uszkodzone przez mutacje powodujące BBS są składnikami rzęsek lub uczestniczą w transporcie wewnątrzrzęskowym i wewnątrzkomórkowym [23]. Fakt, że mutacje wielu różnych genów mogą być skojarzone z podobnym, wieloukładowym fenotypem został obecnie wyjaśniony dzięki odkryciu dwóch kompleksów białek BBS: tzw. BBS-omu (składającego się z siedmiu białek BBS), odgrywającego kluczową rolę w transporcie wewnątrzrzęskowym, oraz tzw. kompleksu chaperonowego (składającego się z trzech białek BBS), który jest niezbędny do mocowania BBS-omu (ryc. 3).

Choroby wieloczynnikowe

Choroby dziedziczone wieloczynnikowo są następstwem interakcji wielu genów i czynników środowiskowych, co powoduje, że nie obserwuje się mendlowskich schematów dziedziczenia. W rezultacie wariant genu (tzw. allele) uczestniczący w patogenezie choroby wieloczynnikowej wykazuje znacznie słabszą penetrację niż allele powodujące choroby jednogenowe. Wpływa to zarówno na metody wykorzystywane do identyfikacji takich genów, jak i na sposób, w jaki występowanie lub brak konkretnego wariantu genu wpływają na opiekę i poradnictwo dla chorego i jego rodziny. Ogólnie można stwierdzić, że analiza sprzężeń prowadzona w rodzinach dotkniętych chorobą okazuje się skuteczniejsza w identyfikacji genów przyczynowych dla chorób jednogenowych (np. opisanych w poprzedniej części artykułu), podczas gdy badania całogenomowe lub badania asocjacji genów-kandydatów okazały się skuteczniejsze w identyfikacji czynników patogenetycznych chorób wieloczynnikowych, takich jak AMD, jaskra lub dystrofia śródbłonkowa rogówki Fuchsa. Z punktu widzenia poradnictwa często jest uzasadnione uznanie alleli chorób jednogenowych za przyczynę choroby, podczas gdy allele uczestniczące w patogenezie chorób wieloczynnikowych raczej zwiększają jedynie ryzyko rozwoju choroby.

Trzy najpowszechniejsze przyczyny ślepoty – AMD, jaskra i dystrofia śródbłonkowa rogówki Fuchsa – wykazują



Rycina 3. Zespół Bardeta-Biedla

W części A przedstawiono rolę siedmiu białek uczestniczących w etiopatogenezie zespołu Bardeta-Biedla (BBS1, 2, 4, 5, 7, 8, i 9), które razem z białkiem BBIP10 tworzą kompleks białkowy znany jako BBS-om. BBS-om odgrywa rolę w transporcie substancji do i z rzęski, a potencjalnie również do innych przedziałów błonowych. Białko BBS3, które nie jest częścią BBS-omu, jest niezbędne do transportu BBS-omu do rzęski. W części B przedstawiono znane interakcje fizyczne między składnikami kompleksu białkowego BBS-omu, poznane dzięki doświadczeniom poświęconym koimmunoprecypitacji. Do powstania BBS-omu jest niezbędny drugi kompleks białkowy, zawierający białka BBS6, 10 i 12. CCT – polipeptyd kompleksu T zawierający chaperoninę, IFT – transport intraflagellarny.

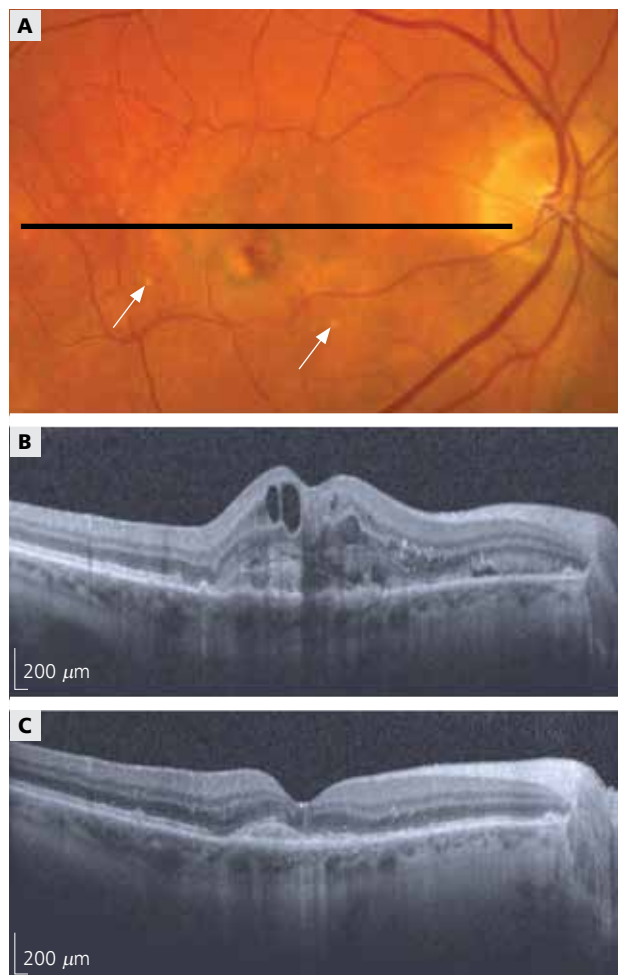
zarówno genetyczną heterogenność, jak i genetyczną wieloczynnikowość, a prowadzone ostatnio całogenomowe badania asocjacji we wszystkich trzech pozwoliły wykryć istotne czynniki patogenetyczne.

Zwyrodnienie plamki związane z wiekiem jest wiodącą przyczyną ślepoty w krajach rozwiniętych. Jak sama nazwa wskazuje, choroba ta dotyka zwykle osób po 60 r.ż. i powoduje utratę widzenia plamkowego (centralnego) (ryc. 4). Częstość występowania AMD narasta z wiekiem i pewne jej objawy pojawiają się u ponad 30% osób, które ukończyły 75 lat [6]. Początkowe próby zidentyfikowania genów przyczynowych AMD polegały na badaniu roli genów znanych w powodowaniu jednogennych chorób plamki. Prowadzono je wśród chorych na AMD oraz w dobranych pod względem etnicznym grupach kontrolnych [24]. Później rozwój wysokowydajnych i stosunkowo tanich metod genotypowania pozwolił na prowadzenie całogenomowych badań asocjacji. Wśród wszystkich chorób przeanalizowanych w ten sposób w AMD odniesiono duży sukces, identyfikując geny uczestniczące w warunkowaniu dużego ryzyka rozwoju choroby. Na przykład osoby będące nosicielami pewnego wariantu genu kodującego składnik H układu dopełniacza (*CFH*) [25-28] są obciążone ponad 2,7 razy większym ryzykiem rozwoju AMD niż osoby, u których ta odmiana genu nie występuje [25,26]. Warianty trzech genów położonych w regionie chromosomowym 10q26 (*ARMS2*, *HTRA1* i *PLEKHA1*) są również silnie związane z występowaniem AMD [29-31]. Ogółem poznano ponad tuzin genów związanych z predyspozycją do AMD [6]. Choć badania te są ważne dla dalszego zrozumienia mechanizmów patofizjologicznych AMD i mogą pomóc w rozwoju nowych metod leczenia, badania chorych w kierunku polimorfizmów genów predysponujących do AMD odgrywają obecnie niewielką rolę w postępowaniu z chorym na AMD. Zaburzenia te rozwiną się w wieku 70 lat tylko u około jednej trzeciej osób z obciążającym genotypem *CFH*. Dopóki nie zostanie opracowana metoda skutecznego i bezpiecznego leczenia chorych na AMD skojarzonym

ze swoistymi genotypami genu *CFH*, wykonywanie testów genetycznych przyniesie zaledwie niewielką korzyść, są one bowiem mniej czułe i swoiste w wykrywaniu AMD niż rutynowe badanie okulistyczne.

Jaskra jest drugą wśród najczęstszych przyczyn ślepoty w Stanach Zjednoczonych i wiodącą przyczyną ślepoty wśród osób rasy czarnej. Ocenia się, że obecnie na światę chortuje na jaskrę około 60 milionów osób [32]. Najpowszechniejszą postacią jaskry jest w Stanach Zjednoczonych jaskra pierwotna otwartego kąta, która charakteryzuje się uszkodzeniem nerwu wzrokowego i utratą obwodowego pola widzenia. Badania nad jednogennymi (mendelowskim) postaciami jaskry pozwoliły na odkrycie dwóch genów (*MYOC* i *OPTN*) i zmapowanie loci chromosomowych kolejnych 13 genów [33]. Niemniej jednak mniej niż 5% przypadków jaskry pierwotnej otwartego kąta jest przypisywanych mutacjom powyższych genów, co sugeruje, że większość pozostałych przypadków jest powodowanych przez interakcję wielu wariantów genowych i czynników środowiskowych. Każdy z wariantów genów prawdopodobnie samodzielnie odpowiada za względnie małe ryzyko rozwoju jaskry pierwotnej otwartego kąta, jednak w przypadku niekorzystnych kombinacji może przeważyć szalę w kierunku rozwoju choroby. Ostatnio, w ramach całogenomowych badań asocjacji, pierwszy z takich czynników ryzyka został zmapowany w regionie chromosomowym 7q31, w którym znajdują się geny kaweoliny 1 i kaweoliny 2. Mutacja przyczynowa zlokalizowana w tym regionie nie została jeszcze odkryta, ale związana jest powyżej z 12% populacyjnego ryzyka rozwoju jaskry [34]. Ten stosunkowo niewielki wpływ sugeruje, że podłoże genetyczne jaskry pierwotnej otwartego kąta obejmuje udział większej liczby genów o mniejszym udziale w ryzyku populacyjnym niż stwierdzono to w badaniach nad AMD.

Dystrofia śródbłonkowa rogówki Fuchsa jest zależną od wieku chorobą rogówki, która dotyka około 5% populacji w wieku powyżej 40 lat i jest wiodącą przyczyną przeszczepień rogówki. Choroba ta charakteryzuje się stopniową utratą komórek śródbłonka rogówki, rozwojem małych narośli, znanych jako tzw. krople w obrębie leżącej głębiej warstwy podstawnej oraz późniejszym pogrubieniem i zmętnieniem zrębu rogówki. Ostatnio całogenomowe badania asocjacji wykazały, że allele genu czynnika transkrypcyjnego 4 (*TCF4*), które kodują białko należące do rodziny białek E (E2-2), są mocno powiązane z rozwojem typowej, zależnej od wieku dystrofii rogówki Fuchsa [6]. Prawdopodobieństwo rozwoju choroby u osób homozygotycznych dla allelu zwiększonego ryzyka jest 30-krotnie większe niż u osób nieposiadających takiego wariantu genu. W przeciwieństwie jednak do roli genu *CFH*



Rycina 4. Leczenie zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD) bewacyzumabem

Zdjęcie siatkówki 67-letniego chorego z podsiatkówkową błoną neowaskularną (część A) ukazuje żółte złoży (tzw. druzy) pod nabłonkiem barwnikowym siatkówki (strzałki), które są klinicznymi oznakami AMD. Mętny płyn podsiatkówkowy i drobne krwotoki w centralnej części plamki sugerują neowaskularyzację podsiatkówkową. Pozioma czarna linia wskazuje lokalizację tomogramu przez środek plamki. Optyczna koherentna tomografia z domeną spektralną (spectral-domain optical coherence tomogram, SDOCT) wykonana przez środek plamki ukazuje podsiatkówkową tkankę neowaskularną i przestrzenie płynowe w obrębie siatkówki (część B). Powtórne badanie SDOCT wykonane po trzech wstrzyknięciach bewacyzumabu w ciągu 3 miesięcy ukazuje bardzo wyraźne zmniejszenie tkanki neowaskularnej i płynu śródsiatkówkowego (część C). Ostrość wzroku uległa poprawie do 20/50.

w etiologii AMD, w przypadku którego najważniejszy polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) zmienia białko CFH istotnie dla jego czynności, uzyskano znikome dowody biologiczne potwierdzające udział genu *TCF4* w rozwoju dystrofii rogówki Fuchsa. Na przykład polimorfizm sprzężony z tą chorobą jest zlokalizowany w obrębie intronu genu *TCF4* i jest mało prawdopodobne, by mógł zmieniać ekspresję białka TCF4. Ponadto osoby z powstającymi *de novo* mutacjami genu *TCF4*, powodującymi utratę jego funkcji, cierpią na ciężką chorobę neurologiczną, w przebiegu której nie obserwuje się zaburzeń czynności śródbłonna rogówki [8,35]. Tak więc, podobnie jak w przypadku wielu odkryć opartych na całogenomowych badaniach asocjacji, odkrycie mechanizmu, na drodze którego statystycznie istotne locus jest powiązane z fenotypem ze strony rogówki, wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

Leczenie chorób oczu uwarunkowanych genetycznie

Podjęmowano próby leczenia dziedzicznych chorób oczu na każdym poziomie procesu chorobowego – począwszy od bardzo swobodnego hamowania ekspresji pojedynczego zmutowanego allelu za pomocą małych cząsteczek RNA [36], a kończąc na rozległych zmianach środowiska metabolicznego z użyciem preparatów wielowitaminowych, których mechanizm działania nadal pozostaje niepewny [37]. Odkrycia genów przyczynowych wsparły te wysiłki dzięki lepszemu zrozumieniu swobodnych szlaków biologicznych, których zakłócenie prowadzi bezpośrednio do rozwoju choroby lub podatności na nią. Szlaki te mogą się stać ważnymi punktami uchwytu działania czynników leczniczych, a naukowcy są bardzo twórczy w wynajdywaniu metod leczenia ukierunkowanych na takie cele.

Na przykład odkrycie, że gen *ABCA4* jest zaangażowany w transport pochodnych witaminy A z dysków zewnętrznych segmentów fotoreceptorów [16], doprowadziło do stwierdzenia, że inhibitory witaminy A, takie jak fenretynid, hamują odkładanie się lipofuscyny u zwierząt będących organizmami modelowymi dla choroby Stargarda [38]. Identyfikacja znaczenia naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonnów (VEGF) w rozwoju neowaskularyzacji naczyniówkowej doprowadziła zaś do opracowania leczniczych przeciwciał anti-VEGF (np. ranibizumab i bewacyzumab), zwalczających główne powikłanie AMD prowadzące do ślepoty (ryc. 4) [39]. Stosowano również czynniki wzrostu [40] i środki neuroprotektoryjne [41] w celu osłabienia reakcji apoptotycznej na dziedziczne zaburzenia komórkowe. W ostatnich latach doświadczalne metody leczenia, takie jak

terapia genowa, terapeutyczne komórki macierzyste oraz elektroniczne protezy siatkówkowe, również przekroczyły próg zastosowania klinicznego w leczeniu genetycznie uwarunkowanych chorób oczu. Potencjalną zaletą dwóch ostatnich metod leczenia jest fakt, że ich skuteczne wykorzystanie nie musi wymagać szczegółowej znajomości swobodnego podłoża molekularnego zaburzeń występujących u danego chorego.

Terapia genowa

Większość chorób ludzkich fotoreceptorów dziedziczny się w sposób autosomalny recesywny, a mechanizm choroby polega wówczas zwykle na dogłębnej utracie czynności białkowego produktu genu. Ponad tuzin recesywnych chorób siatkówki skutecznie leczono dotąd u zwierząt modelowych na drodze transferu genów z użyciem wektorów wirusowych lub nanocząsteczkowych [42]. Na przykład jedna z postaci wrodzonej ślepoty Lebera (Leber's congenital amaurosis, LCA) jest powodowana brakiem białka o aktywności izomeryzy retinoidowej kodowanego przez gen *RPE65*. Przed dekadą Acland i wsp. [43] z powodzeniem przywrócili wzrok u psów, stanowiących naturalnie występujący zwierzęcy model choroby. Wykorzystali oni wektor adenowirusowy (adeno-associated viral vector, wirus AAV) do przeniesienia prawidłowej wersji genu *RPE65* do komórek nabłonka barwnikowego siatkówki. W ostatnich latach trzy różne grupy badaczy zastosowały tę metodę leczenia u ludzi [44-46]. Na przykład przed trzema laty Maguire i wsp. [44] opisali wyniki zastosowania tej terapii genowej u 12 chorych. Zaobserwowali oni poprawę czynności narządu wzroku u wszystkich 12 leczonych, przy czym największą korzyść odnotowano wśród najmłodszych spośród nich.

Przeszczepienie komórek macierzystych

Wiele ważnych typów komórek w obrębie oka ma niewielkie, jeśli jakiegokolwiek zdolności do endogennej regeneracji, w wyniku czego jedyną skuteczną opcją leczenia osób z chorobami dziedzicznymi, które prowadzą do utraty takich komórek, jest jakiś typ zastępczej terapii komórkowej. Chociaż zastąpienie wysoko zróżnicowanych komórek, takich jak fotoreceptory, stanowi duże wyzwanie, wiele przeprowadzonych ostatnio doświadczeń wskazuje, że obecnie jest możliwe wykorzystanie w tym celu komórek macierzystych.

W 2004 r. Klassen i wsp. [47] stwierdzili, że przeszczepione komórki progenitorowe siatkówki mogą rozwinąć się w funkcjonalne fotoreceptory i poprawić czynności wzrokowe u myszy ze zwyrodnieniem siatkówki. Od czasu tych pierwszych doniesień szeroka gama różnych typów komórek, począwszy od prekursorów fotoreceptorów o ograniczonym przeznaczeniu, a kończąc na pluripotentjalnych, zarodkowych komórkach macierzystych [48-51], została wykorzystana do zastępowania fotoreceptorów u zwierząt dotkniętych różnymi dziedzicznymi chorobami siatkówki. Zarodkowe komórki macierzyste cieszą się szczególnym zainteresowaniem ze względu na ich zdolność do nieograniczonej samoodnowy i tkankowo-swoistego wytwarzania komórek. Na przykład Eiraku i wsp. [52] stwierdzili ostatnio, że dzięki zastosowaniu trójwymiarowego systemu hodowli komórkowych mogli odtworzyć rozwój i w wiarygodny sposób wytwarzać *in vitro* funkcjonalne komórki fotoreceptorowe. Takie właściwości pozwalają na wytworzenie dostatecznej liczby komórek, by przeprowadzić przeszczepienie w warunkach klinicznych, nawet podczas pojedynczego zabiegu, nie zaś na drodze licznych przeszczepień, niezbędnych przy stosowaniu komórek bardziej ograniczonych rozwojowo.

Niezależnie od teoretycznej przydatności takich komórek u ludzi, ich izolacja z ludzkich zarodków wywołuje liczne zastrzeżenia etyczne i powoduje ograniczenia immunologiczne. Wydaje się zatem mało prawdopodobne, by świeżo wyizolowane zarodkowe komórki macierzyste znalazły szerokie stosowanie w leczeniu zwyrodnieniowych chorób oczu. Typ komórek, który pokonuje większość powyższych ograniczeń, to tzw. indukowane pluripotentjalne komórki macierzyste (induced pluripotent stem cell, iPSC). Po raz pierwszy uzyskali je przed 5 laty Takahashi i Yamanaka [53] dzięki genetycznemu przeprogramowaniu fibroblastów skóry w komórki pluripotentjalne z użyciem retrowirusowej transdukcji tylko czterech czynników transkrypcyjnych [53]. Wielu grupom badaczy udało się wykazać, że komórki iPSC mają zdolność do różnicowania w wiele rozmaitych typów komórek siatkówki, w tym również w fotoreceptory [54,55]. Udowodniono też, że uzyskane w ten sposób fotoreceptory po przeszczepieniu będą ulegały integracji z architekturą dystroficznej siatkówki [56,57], co spowoduje częściowe odtworzenie odpowiedzi elektroretinograficznych [57]. Chociaż bariery metodologiczne, takie jak stosowanie retrowirusów, uniemożliwiają natychmiastowe wykorzystanie tej technologii w praktyce klinicznej, wyniki ostatnich badań sugerują, że proces przeprogramowywania komórek somatycznych może doprowadzić do powstania swoistych defektów genetycznych [58-60]. Nasza wiedza na temat tych zagad-

nień podlega jednak gwałtownym zmianom i możliwe, że komórki takie ostatecznie znajdą drogę do zastosowania w praktyce klinicznej.

Elektroniczne protezy siatkówki

W trakcie prawidłowego procesu widzenia zmniejszone stężenie glutaminianu w zakończeniach aksonów fotoreceptorów stymuluje komórki dwubiegunowe i amakrynowe, co z kolei prowadzi do uwalniania glutaminianu i stymulacji komórek zwojowych siatkówki, które komunikują się z mózgiem. Usiłując ominąć fotoreceptory i inne elementy neuronalne, zniszczone w przebiegu zwyrodnieniowej choroby siatkówki, naukowcy przebadali możliwość stymulowania komórek zwojowych bezpośrednio przez impulsy elektryczne dostarczane przez płytke z zestawem mikroelektrod. Kilka różnych projektów protez siatkówkowych dostarczyło obiecujących rezultatów u ludzi i zwierząt [61], a jeden z nich zarejestrowano ostatnio w Europie do wprowadzenia do praktyki klinicznej.

Podsumowanie

Okło odegrało szczególną rolę w rozwoju genetycznych i genomycznych aspektów chorób występujących u ludzi. Widzenie ma krytyczne znaczenie dla codziennej aktywności człowieka, zatem leczenie ślepoty pozostanie ważnym celem medycyny przez wiele najbliższych lat. Lekarze i naukowcy mają w swych działaniach na tym polu ułatwione zadanie dzięki optycznej i anatomicznej dostępności narządu, a także dzięki stosunkowo dużej wielkości kory wzrokowej, służącej do interpretacji neuronalnych informacji pochodzących z siatkówki. Dlatego osoba dotknięta chorobą uszkadzającą tylko kilka tysięcy neuronów w obrębie dołka może bardzo szczegółowo opisać to uszkodzenie lekarzowi, który z kolei może uwidocznić te neurony u żyjącego chorego z mikroskopową rozdzielczością, wykorzystując (w badaniu OCT, tj. optycznej koherentnej tomografii – przyp. tłum.) niemal doskonałą optykę przedniego odcinka oka. Ta naturalna optyka oka ma również znaczenie dla chirurgicznej dostępności, która nie ma sobie równych w jakiegokolwiek innej części ośrodkowego układu nerwowego. Ta ostatnia zaleta będzie niezwykle korzystna dla naukowców klinicznych, poszukujących możliwości wykorzystania wszystkich ostatnich postępów w terapii genowej i biologii komórek macierzystych w skutecznym leczeniu osób dotkniętych genetycznie uwarunkowanymi chorobami oczu.

Formularze dotyczące konfliktu interesów dostarczone przez autorów są dostępne wraz z pełnym tekstem artykułu na stronie NEJM.org.

From The New England Journal of Medicine 2011;364:1932-1942. Translated and reprinted in its entirety with permission of the Massachusetts Medical Society. Copyright © 2011, Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

Piśmiennictwo

- 1 Senju S, Haruta M, Matsunaga Y, et al. Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009;27:1021-31.
- 2 Azuma N, Nishina S, Yanagisawa H, Okuyama T, Yamada M. PAX6 missense mutation in isolated foveal hypoplasia. *Nat Genet* 1996;13:141-2.
- 3 Wilson EB. The sex chromosomes. *Arch Mikrosk Anat Entwicklunsmech* 1911;77:249-71.
- 4 Renwick JH, Lawler SD. Probable linkage between a congenital cataract locus and the Duffy blood group locus. *Ann Hum Genet* 1963;27:67-84.
- 5 Newman NJ, Lott MT, Wallace DC. The clinical characteristics of pedigrees of Leber's hereditary optic neuropathy with the 11778 mutation. *Am J Ophthalmol* 1991;111:750-62.
- 6 Swaroop A, Chew EY, Rickman CB, Abecasis GR. Unraveling a multifactorial late-onset disease: from genetic susceptibility to disease mechanisms for age-related macular degeneration. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2009; 10:19-43.
- 7 Kwon YH, Fingert JH, Kuehn MH, Alward WL. Primary open-angle glaucoma. *N Engl J Med* 2009;360:1113-24.
- 8 Baratz KH, Tosakulwong N, Ryu E, et al. E2-2 protein and Fuchs's corneal dystrophy. *N Engl J Med* 2010;363:1016-24.
- 9 Cavenee WK, Hansen MF, Nordenskjold M, et al. Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma. *Science* 1985;228:501-3.
- 10 Schindler EI, Nylén EL, Ko AC, et al. Deducing the pathogenic contribution of recessive ABCA4 alleles in an outbred population. *Hum Mol Genet* 2010;19:3693-701.
- 11 Cideciyan AV, Swider M, Aleman TS, et al. ABCA4 disease progression and a proposed strategy for gene therapy. *Hum Mol Genet* 2009;18:931-41.
- 12 Stone EM. Finding and interpreting genetic variations that are important to ophthalmologists. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2003;101:437-84.
- 13 Hamosh A, FitzSimmons SC, Macek M Jr, Knowles MR, Rosenstein BJ, Cutting GR. Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J Pediatr* 1998;132:255-9.
- 14 Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ* 2004;82:844-51.
- 15 Allikmets R. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* 1997;17:122.
- 16 Weng J, Mata NL, Azarian SM, Tzekov RT, Birch DG, Travis GH. Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. *Cell* 1999;98:13-23.
- 17 Maugeri A, Klevering BJ, Rohrschneider K, et al. Mutations in the ABCA4 (ABCR) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy. *Am J Hum Genet* 2000;67:960-6.
- 18 Sunden SL, Alward WL, Nichols BE, et al. Fine mapping of the autosomal dominant juvenile open angle glaucoma (GLC1A) region and evaluation of candidate genes. *Genome Res* 1996;6:862-9.
- 19 Stone EM, Fingert JH, Alward WLM, et al. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 1997;275:668-70.
- 20 Alward WL, Fingert JH, Coote MA, et al. Clinical features associated with mutations in the chromosome 1 open-angle glaucoma gene (GLC1A). *N Engl J Med* 1998;338:1022-7.
- 21 Shepard AR, Jacobson N, Millar JC, et al. Glaucoma-causing myocilin mutants require the peroxisomal targeting signal-1 receptor (PTS1R) to elevate intraocular pressure. *Hum Mol Genet* 2007;16:609-17.
- 22 Sheffield VC. The blind leading the obese: the molecular pathophysiology of a human obesity syndrome. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2010; 121:172-81.
- 23 Shah AS, Farnen SL, Moninger TO, et al. Loss of Bardet-Biedl syndrome proteins alters the morphology and function of motile cilia in airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:3380-5.
- 24 Stone EM, Webster AR, Vandenburgh K, et al. Allelic variation in ABCR associated with Stargardt disease but not age-related macular degeneration. *Nat Genet* 1998;20:328-9.
- 25 Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 2005; 308:419-21.
- 26 Edwards AO, Ritter R III, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 2005;308:421-4.
- 27 Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:7227-32.
- 28 Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 2005;308:385-9.
- 29 Jakobsdottir J, Conley YP, Weeks DE, Mah TS, Ferrell RE, Gorin MB. Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26. *Am J Hum Genet* 2005;77:389-407.
- 30 Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG, et al. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum Mol Genet* 2005;14:3227-36.
- 31 Dewan A, Liu M, Hartman S, et al. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science* 2006;314:989-92.
- 32 Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 2006;90:262-7.
- 33 Fan BJ, Wiggs JL. Glaucoma: genes, phenotypes, and new directions for therapy. *J Clin Invest* 2010;120:3064-72.
- 34 Thorleifsson G, Walters GB, Hewitt AW, et al. Common variants near CAV1 and CAV2 are associated with primary open-angle glaucoma. *Nat Genet* 2010;42:906-9.
- 35 Zweier C, Peippo MM, Hoyer J, et al. Haploinsufficiency of TCF4 causes syndromal mental retardation with intermittent hyperventilation (Pitt-Hopkins syndrome). *Am J Hum Genet* 2007;80:994-1001.
- 36 Gorbatyuk M, Justilien V, Liu J, Hauswirth WW, Lewin AS. Preservation of photoreceptor morphology and function in P23H rats using an allele independent ribozyme. *Exp Eye Res* 2007;84:44-52.
- 37 Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E and beta carotene for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 9. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1439-52.
- 38 Radu RA, Han Y, Bui TV, et al. Reductions in serum vitamin A arrest accumulation of toxic retinal fluorophores: a potential therapy for treatment of lipofuscin-based retinal diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:4393-401. [Erratum, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3735.]
- 39 The CATT Research Group. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2011; 364:1897-908.
- 40 Sieving PA, Caruso RC, Tao W, et al. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:3896-901.
- 41 Boatright JH, Moring AG, McElroy C, et al. Tool from ancient pharmacopoeia prevents vision loss. *Mol Vis* 2006;12:1706-14.

42. den Hollander AI, Black A, Bennett J, Cremers FP. Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. *J Clin Invest* 2010;120:3042-53. [Erratum, *J Clin Invest* 2011; 121:456-7.]
43. Acland GM, Aguirre GD, Ray J, et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 2001;28:92-5.
44. Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008;358:2240-8.
45. Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008;358:2231-9.
46. Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, et al. Treatment of Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther* 2008;19:979-90.
47. Klassen HJ, Ng TF, Kurimoto Y, et al. Multipotent retinal progenitors express developmental markers, differentiate into retinal neurons, and preserve light-mediated behavior. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:4167-73.
48. Osakada F, Ikeda H, Mandai M, et al. Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2008;26:215-24.
49. MacLaren RE, Pearson RA, MacNeil A, et al. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* 2006;444:203-7.
50. Lamba DA, Karl MO, Ware CB, Reh TA. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:12769-74.
51. Ikeda H, Osakada F, Watanabe K, et al. Generation of Rx+/Pax6+ neural retinal precursors from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:11331-6.
52. Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 2011;472:51-6.
53. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
54. Meyer JS, Shearer RL, Capowski EE, et al. Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:16698-703.
55. Osakada F, Jin ZB, Hiram Y, et al. *In vitro* differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by smallmolecule induction. *J Cell Sci* 2009;122:3169-79.
56. Lamba DA, McUsic A, Hirata RK, Wang PR, Russell D, Reh TA. Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2010;5(1): e8763.
57. Tucker B, Park I-H, Qi SD, et al. Transplantation of adult mouse iPS cell-derived photoreceptor precursors restores retinal structure and function in retinal degenerative mice. *PLoS One* (in press).
58. Gore A, Li Z, Fung HL, et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011;471:63-7.
59. Hussein SM, Batada NN, Vuorio S, et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 2011; 471:58-62.
60. Lister R, Pelizzola M, Kida YS, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011;471:68-73.
61. Dowling J. Current and future prospects for optoelectronic retinal prostheses. *Eye (Lond)* 2009;23:1999-2005.

KOMENTARZ



Dr hab. n. med., prof. UM

Maciej R. Krawczyński

Pracownia Poradnictwa Genetycznego w Chorobach Narządu Wzroku, Katedra i Zakład Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz Centrum Genetyki Medycznej GENESIS NZOZ w Poznaniu

W 2003 r. w NAJWAŻNIEJSZYCH BIOMEDYCZNYCH czasopismach naukowych świata, *Science* i *Nature*, opublikowano wyniki zakończonego wówczas Projektu Poznania Genomu Ludzkiego (Human Genome Project). Od tego czasu możemy mówić, że żyjemy w erze znajomości genomu ludzkiego i jesteśmy pierwszym pokoleniem lekarzy, które powinno wykorzystać tę znajomość w praktyce.

Najistotniejszy, widoczny już w praktyce klinicznej postęp dotyczy możliwości diagnostyki molekularnej chorób uwarunkowanych genetycznie. Sprzyjają temu postępy technologiczne i dostępność coraz bardziej złożonych, a zarazem coraz tańszych metod diagnostycz-

nych, takich jak technologia mikromacierzy lub sekwencjonowanie nowej generacji. Coraz szersza gama takich badań jest dostępna także dla polskiego pacjenta, w dużej mierze również w ramach usług medycznych finansowanych przez NFZ. Olbrzymią zaletą takich badań jest możliwość szybkiego i stosunkowo taniego rozstrzygnięcia ciągnących się często latami wątpliwości diagnostycznych. Wykrycie typowego dla danej jednostki chorobowej defektu genetycznego pozwala na jednoznaczne i ostateczne potwierdzenie klinicznego rozpoznania lub podejrzenia choroby, identyfikuje typ dziedziczenia choroby i ryzyko jej powtarzalności w rodzinie (często kluczowe dla planowania rodziny przez pacjenta) oraz umożliwia określenie rokowania wzrokowego, a tym samym pozwala pacjentowi na odpowiedni wybór szkoły, zawodu lub innych planów życiowych.

Musimy jednak pamiętać, że badanie molekularne może spełniać wszystkie powyższe cele jedynie wówczas, gdy poprzedzone jest staranną analizą kliniczną pacjenta (zwłaszcza w przypadkach zespołów wieloukładowych), wykreśleniem i analizą rodowodu oraz indywidualnym dobraniem odpowiedniego testu

diagnostycznego do konkretnego pacjenta i jego rodziny. Najlepiej więc wykonywać badania molekularne po konsultacji ze specjalistą genetyki klinicznej, bowiem nie istnieją żadne tzw. ogólne badania genetyczne, które można zlecić w celu wykluczenia lub potwierdzenia genetycznego podłoża choroby. Nie mniej ważne jest uwzględnienie obowiązujących zasad etycznych prowadzenia badań molekularnych.

Kolejnym warunkiem udanej diagnostyki genetycznej jest odpowiednia interpretacja uzyskanych wyników, uwzględniająca stan kliniczny pacjenta. Tylko w niektórych przypadkach defekt genetyczny ma charakter krytyczny i z góry determinuje rozpoznanie kliniczne. W okulistyce jednak powszechnie są zjawiska heterogenności genetycznej – allelicznej i loci. W przypadku wielu genów, np. opisanego w artykule genu *ABCA4*, wykrycie defektu jest jedynie wstępem do ustalenia rozpoznania, bowiem mutacje jednego genu mogą prowadzić do różnych stanów klinicznych (tzw. heterogenność alleliczna). Skrajnym przykładem takiej sytuacji może być gen *RDS*, którego mutacje mogą odpowiadać aż za siedem różnych chorób siatkówki. Takie dane zmuszają okulistów do nowego podejścia do klasyfikacji chorób i np. dystrofie rogówkowe są już klasyfikowane nie tylko na podstawie obrazu klinicznego, ale przede wszystkim wyniku badań molekularnych. W innych chorobach (np. wrodzona ślepotę Lebera lub zwyrodnienie barwnikowe siatkówki) mutacje w jednym z aż kilkunastu lub nawet kilkudziesięciu różnych genów mogą prowadzić do podobnych następstw klinicznych i identycznych rozpoznań (tzw. heterogenność loci). Jeszcze trudniejsza sytuacja dotyczy chorób wieloczynnikowych (np. jaskry pierwotnej otwartego kąta lub zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem), w których wykrycie nawet typowego defektu genetycznego nie ma wartości diagnostycznej (ponieważ może on występować u osób zdrowych), ale może mieć wartość rokowniczą i np. sugerować wybór bardziej agresywnej metody leczenia. Konieczne trzeba też pamiętać, że zdecydowana większość badań genetycznych nie pozwala na jednoznaczne wykluczenie podejrzanego rozpoznania, bowiem nawet całkowicie prawidłowy wynik badania wyklucza jedynie obecność części (czasem większości), ale nie wszystkich możliwych (bo często nieznanych) mutacji przyczynowych.

Zatem tylko odpowiednio i indywidualnie dobrze oraz właściwie zinterpretowane badanie genetyczne może mieć wiarygodne znaczenie dla lekarza i jego pacjenta. Tymczasem proponowane na rynku badania, wy-

konywane przez tzw. dzikie, nieposiadające certyfikatów laboratoria, których wyników nie interpretuje genetyk kliniczny, nie są one też odnoszone do obserwowanych objawów, przynoszą często jedynie szkodę i narażają pacjenta na znaczne, a nieuzasadnione koszty, łamiąc przy tym zasady etyczne powszechnie przyjęte w diagnostyce molekularnej.

Poznanie podstaw etiopatogenetycznych wybranych chorób oczu w coraz większym stopniu umożliwia też podjęcie działań profilaktyczno-terapeutycznych. Na przykład poznanie opisanego w artykule patomechanizmu choroby Stargarda pozwala zalecić pacjentom z mutacjami genu *ABCA4* stosowanie preparatów witaminowo-mineralnych z luteiną, ale koniecznie unikania witaminy A i beta-karotenu. Ta sama witamina A może jednak działać korzystnie w niektórych postaciach zwyrodnienia barwnikowego siatkówki, powodowych mutacjami innych genów. W wybranych przypadkach dziedzicznych neuropatii nerwów wzrokowych, związanych z zaburzeniami metabolizmu mitochondrialnego, można zalecać z kolei preparaty koenzymu Q i witaminy z grupy B.

Również najbardziej ekscytujące możliwości postępowania z wykorzystaniem terapii genowej bazują zwykle na znajomości mutacji przyczynowej. Prowadzona u ludzi od 2007 r. eksperymentalna terapia genowa wrodzonej ślepoty Lebera (LCA) warunkowana jest identyfikacją mutacji przyczynowej genu *RPE65*, prowadzącej do utraty funkcji białka. Podstawowa patologia dotyczy bowiem w tym przypadku komórek nabłonka barwnikowego siatkówki (RPE), a nie samych fotoreceptorów. Zatem wprowadzenie prawidłowego genu do komórek RPE odtwarza jego funkcję i daje szansę na poprawę widzenia.

Podsumowując należy stwierdzić, że podczas sprawowania opieki nad pacjentem z genetycznie uwarunkowaną chorobą oczu musimy pamiętać o jej dziedzicznym charakterze (pacjenta często bardziej interesuje informacja na temat ryzyka rodzinnej powtarzalności choroby niż rokowania wzrokowego w często postępującej i ciągle nieuleczalnej chorobie) i zawsze proponować mu poradnictwo genetyczne oraz rozważenie przeprowadzenia diagnostyki molekularnej. Korzystajmy jednak z tych możliwości rozsądnie, kierując się przede wszystkim dobrem pacjenta, a więc zasadnością (również etyczną) i wiarygodnością badań, a także możliwością interpretacji wyników i udzielenia pacjentowi porady genetycznej.