

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

mgr inż. Justyna Anna Karolak

**Złożoność aspektów genetycznych w wieloczynnikowych
chorobach narządu wzroku - stożku rogówki
oraz wysokiej krótkowzroczności**

Rozprawa doktorska

wykonana pod kierunkiem dr hab. Marzeny Gajęckiej, prof. UMP
w Zakładzie Mutagenezy Środowiskowej
Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
oraz w Katedrze i Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań 2014

FINANSOWANIE

Granty

Grant NN 402 591740, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, 2011-2013, kierownik: Justyna A. Karolak

Grant NN 402 097837, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, 2009-2012, kierownik: Dorota M. Nowak

Mini Grant (G-31), Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN (oligo.pl), 2011, kierownik: Justyna A. Karolak

Stypendia

Autorka uzyskała środki finansowe na przygotowanie rozprawy doktorskiej z Narodowego Centrum Nauki w ramach finansowania stypendium doktorskiego na podstawie decyzji numer **2013/08/T/NZ5/00754**.

W trakcie realizacji pracy doktorskiej, autorka była stypendystką w ramach projektu pt.: „**Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski**”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

*Mojej Mentorce,
Pani Promotor, dr hab. Marzenie Gajęckiej, prof. UMP,
Kierownikowi Katedry i Zakładu Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
dziękuję za inspirację, przekazaną wiedzę, poświęcony czas, ogromną
życzliwość, słowa otuchy oraz nieocenioną pomoc w trakcie realizacji pracy*

*Prof. dr hab. Krzysztofowi Szyfterowi,
Kierownikowi Zakładu Mutagenezy Środowiskowej
Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
oraz pracownikom Zakładu
dziękuję za stworzenie milej atmosfery, niezliczone dyskusje i pomoc w pracy*

*Pracownikom Katedry i Zakładu Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
dziękuję za życzliwość i koleżeńską pomoc*

*Marcie Czugała, Dorocie Nowak i Małgosi Rydzanicz
dziękuję za godziny rozmów i wsparcie
wykraczające poza granice pracy naukowej*

*Kochanym Rodzicom, Siostrze i bliskim
dziękuję za miłość, cierpliwość, wyrozumiałość
oraz wsparcie okazywane na każdym etapie mojego życia*

STRESZCZENIE

ABSTRACT

OPIS ZAGADNIEŃ BADAWCZYCH ORAZ STRESZCZENIE PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

PIŚMIENNICTWO

PUBLIKACJE STANOWIĄCE PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- **Karolak JA**, Kulinska K, Nowak DM, Pitarque JA, Molinari A, Rydzanicz M, Bejjani BA, Gajecka M. *Sequence variants in COL4A1 and COL4A2 genes in Ecuadorian families with keratoconus*. Mol Vis. 2011; 17:827-843.
IF=2.511 w roku publikacji; MNiSW=25
- Rosenfeld JA, Drautz JM, Clericuzio CL, Cushing T, Raskin S, Martin J, Tervo RC, Pitarque JA, Nowak DM, **Karolak JA**, Lamb AN, Schultz RA, Ballif BC, Bejjani BA, Gajecka M, Shaffer LG. *Deletions and duplications of developmental pathway genes in 5q31 contribute to abnormal phenotypes*. Am J Med Genet A. 2011; 155A(8):1906-1916.
IF=2.505 w roku publikacji; MNiSW=20
- Rydzanicz M, Nowak DM, **Karolak JA**, Frajdenberg A, Podfigurna-Musiela M, Mrugacz M, Gajecka M. *IGF-1 gene polymorphisms in Polish families with high-grade myopia*. Mol Vis. 2011; 17:2428-2439.
IF=2.511 w roku publikacji; MNiSW=25
- Czugała M*, **Karolak JA***, Nowak DM, Polakowski P, Pitarque J, Molinari A, Rydzanicz M, Bejjani BA, Yue BY, Szaflik JP, Gajecka M. *Novel mutation and three other sequence variants segregating with phenotype at keratoconus 13q32 susceptibility locus*. Eur J Hum Genet. 2012; 20(4):389-397.
***Autorzy równorzędni;**
IF=4.400 w roku publikacji; MNiSW=35
- Nowak DM*, **Karolak JA***, Kubiak J, Gut M, Pitarque JA, Molinari A, Bejjani BA, Gajecka M. *Substitution at IL1RN and deletion at SLC4A11 segregating with phenotype in familial keratoconus*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013; 54(3):2207-2215.
***Autorzy równorzędni;**
IF=3.411 w roku publikacji; MNiSW=40
- **Karolak JA**, Szaflik JP, Gajecka M. *Etiologia stożka rogówki i molekularne aspekty choroby – aktualny stan wiedzy*. Okulistyka. 2012; 3:9-13.
MNiSW=4
- **Karolak JA**, Nowak DM, Gajecka M. *Complexity of genetics in keratoconus*. Annual Report Polish Academy of Sciences. 2012; 89-91.

OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW OKREŚLAJĄCE ICH UDZIAŁ W TWORZENIU PUBLIKACJI ZAWARTYCH W NINIEJSZEJ ROZPRAWIE DOKTORSKIEJ

Złożoność aspektów genetycznych w wieloczynnikowych chorobach narządu wzroku - stożku rogówki oraz wysokiej krótkowzroczności

Czynność narządu wzroku polega na rejestrowaniu bodźców świetlnych, co ma znaczenie dla powstawania wrażeń wzrokowych. Jakikolwiek zmiany w budowie gałki ocznej prowadzą do upośledzenia widzenia. Z uwagi na złożoność i wieloczynnikowość podłoża zarówno stożka rogówki, jak i wysokiej krótkowzroczności, przedmiotem badań niniejszej rozprawy doktorskiej były oba wymienione zaburzenia funkcji narządu wzroku. W przebiegu stożka rogówki dochodzi do ścieńczenia i uwypuklenia rogówki, z kolei wysoka krótkowzroczność objawia się niezdolnością oka do tworzenia prawidłowego obrazu, w której wielkość wady przekracza $-6,0$ dioptrii. Choroby te powiązane są z występowaniem patologicznych zmian w oku, które znacząco obniżają jakość widzenia.

Celem badań było poznanie czynników genetycznych zaangażowanych w etiologię stożka rogówki i wysokiej krótkowzroczności, a także próba ustalenia związku pomiędzy tymi czynnikami, a występowaniem fenotypu choroby. Założono, że w patogenezie tych zaburzeń biorą udział różne geny, w których równocześnie występuje wiele wariantów sekwencji. Badania z wykorzystaniem technik biologii molekularnej przeprowadzono w ekwadorskiej i polskiej grupie pacjentów ze stożkiem rogówki, a także wśród członków polskich rodzin z wysoką krótkowzrocznością.

W rodzinie obciążonej stożkiem rogówki, pochodzącej z Ekwadoru, wykryto nową mutację c.2262A>C (Gln754His) w genie *DOCK9* oraz trzy warianty sekwencji w genach *DOCK9*, *IPO5* i *STK24*, segregujące w pełni z fenotypem choroby. Ponadto w innej rodzinie ekwadorskiej zidentyfikowano substytucję c.214+242C>T w genie *IL1RN* oraz nową delecję c.2558+149_2558+203 w genie *SLC4A11*. Stwierdzono istotną statystycznie wyższą częstość występowania obu zmian u chorych, w porównaniu z osobami zdrowymi. Powyższe warianty sekwencji, warunkujące fenotyp stożka rogówki w populacji ekwadorskiej, nie są powiązane z występowaniem choroby w populacji ogólnej. Analiza genów *COL4A2*, *IL1A*, *IL1B*, *PITX1*, *TGFBI*, *IL9*, *MBNL1*, *FARP1*, *RNF113B*, *ZIC5* oraz *ZIC2* w ekwadorskich rodzinach ze stożkiem rogówki oraz genu *IGF-1* w polskich rodzinach z wysoką krótkowzrocznością, nie potwierdziła ich udziału w patogenezie chorób w badanych populacjach.

Uzyskane wyniki potwierdzają postawioną w projekcie hipotezę, zakładającą kompleksowość i udział wielu genów w powstawaniu stożka rogówki i wysokiej krótkowzroczności. Przeprowadzone badania dostarczyły informacji o nieopisywanych dotąd aspektach genetycznych wieloczynnikowych chorób narządu wzroku.

Complexity of genetics in multifactorial diseases of human eye – keratoconus and high-grade myopia

The human eye is the sense organ which gathers and focuses light to create an image. The aberrations in the structure of the eyeball result in altered refractive powers and loss of visual acuity. The object of conducted research were multifactorial diseases of the eye - keratoconus, characterized by progressive thinning and protrusion of the cornea, and high-grade myopia which may be diagnosed when the refractive error exceeds -6.0 D. In both diseases, presence of degenerative changes in the eye structure is observed.

The purpose of this study was to identify genetic factors responsible for keratoconus and high-grade myopia development, and to evaluate their role in the diseases phenotype. The hypothesis assumes the contribution of different genes and mutations in etiology of both keratoconus and high-grade myopia. The study was conducted using molecular biology techniques. Ecuadorian multigenerational families and Polish patients with keratoconus, and members of Polish high-grade myopia families were enrolled in the study.

The mutation screening of candidate genes identified one mutation c.2262A>C (p.Gln754His) in *DOCK9* and three sequence variants in *DOCK9*, *IPO5*, and *STK24* showing 100% segregation with keratoconus phenotype in one large Ecuadorian family. In other keratoconus family, the substitution c.214+242C>T in *IL1RN* and a novel deletion c.2558+149_2558+203 in *SLC4A11* were identified. These variants were observed more frequently in keratoconus patients comparing to healthy individuals and the observed differences were statistically significant. However, the obtained results are specific to the Ecuadorian families only, and further studies of these sequence variants are necessary to be performed in other populations. The molecular analysis of *COL4A2*, *IL1A*, *IL1B*, *PITX1*, *TGFBI*, *IL9*, *MBNL1*, *FARP1*, *RNF113B*, *ZIC5*, and *ZIC2* in keratoconus patients from Ecuador and analysis of *IGF-1* in members of Polish families with high-grade myopia revealed no significant sequence variants, indicating that these genes are not involved in particular disease pathogenesis in studied populations.

The obtained results support the hypothesis that keratoconus and high-grade myopia are complex diseases in which accumulation of sequence variants at several genes cause the phenotypic effect. The study provided information about previously unknown aspects of multifactorial genetic diseases of the eye.

OPIS ZAGADNIENÍ BADAWCZYCH
ORAZ STRESZCZENIE PUBLIKACJI
STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ
ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Wprowadzenie

Narząd wzroku jest organem biologiczno-optycznym, którego czynność polega na rejestrowaniu bodźców świetlnych docierających z otoczenia, przekształcanych następnie we wrażenie wzrokowe. Ogniskowanie wpadających do oka promieni świetlnych dokładnie w płaszczyźnie siatkówki, a tym samym powstanie właściwego obrazu, warunkowane jest przez prawidłowo zbudowany układ optyczny oka, którego częściami składowymi są rogówka, ciecz wodnista, soczewka oraz ciało szkliste. W związku z powyższym, wszelkie zmiany parametrów związanych z rozmiarem, kształtem, strukturą i krzywizną poszczególnych elementów gałki ocznej oraz brak zachowania odpowiednich proporcji pomiędzy nimi, przekładają się na upośledzenie widzenia [Kański, 1997].

Przedmiotem badań w niniejszej rozprawie doktorskiej są dwa zaburzenia funkcji narządu wzroku - stożek rogówki (*ang. keratoconus*; KTCN) oraz wysoka krótkowzroczność (*ang. high-grade myopia*; HM).

Stożek rogówki jest degeneracyjną chorobą oka, która manifestuje się postępującym ścięnczeniem i stożkowatym uwypukleniem centralnej lub paracentralnej części rogówki. W wyniku modyfikacji struktury i krzywizny rogówki dochodzi do stopniowego upośledzenia zdolności załamывania promieni świetlnych przez warstwę rogówki, co pogarsza jakość widzenia [Rabinowitz, 1998].

Stożek rogówki rozwija się u ludzi obojga płci, jednakże w większym stopniu schorzenie to dotyczy mężczyzn niż kobiet [Fink i wsp., 2005]. Przyjmuje się, że stożek rogówki występuje w populacji ogólnej z częstością 1:2000, natomiast różnice w zachorowalności, które obserwuje się pomiędzy poszczególnymi populacjami, mogą wynikać z niespójnych kryteriów diagnostycznych, trudności w rozpoznaniu wczesnego stadium choroby, a także liczebności i etnicznej przynależności badanych grup [Rabinowitz, 1998; Georgiou i wsp., 2004; Gokhale, 2013]. Nie ma dokładnych danych epidemiologicznych na temat częstości występowania stożka rogówki w Polsce, jednak szacuje się, że choroba ta może dotyczyć od 7 do 20 tysięcy Polaków [prof. Jerzy Szaflik, dane nieopublikowane].

Stożek rogówki występuje zazwyczaj obustronnie, a stopień jego zaawansowania w oku lewym i prawym bywa niesymetryczny [Rabinowitz, 1998]. Pierwsze symptomy choroby pojawiają się na ogół w drugiej lub trzeciej dekadzie życia, jednak znane są przypadki pacjentów, u których stożek rogówki rozwinął się w znacznie młodszym wieku, warunkując tym samym szybszy postęp zmian

degeneracyjnych rogówki [Léoni-Mesplé i wsp., 2012]. Wraz z progresją choroby, modyfikacji ulega struktura istoty właściwej rogówki, przez co staje się ona cieńsza i dochodzi do jej stożkowatego uwypuklenia. W rogówkach pacjentów można zaobserwować również szereg innych nieprawidłowości, do których należą, m.in.: zwłóknienia, blizny, linie Vogta, linie złogów żelaza (pierścienie Fleischer'a), a w ostrym stożku - bolesny obrzęk i zmętnienie, zanikające w ciągu kilku tygodni. W zaawansowanym stadium choroby występuje ponadto objaw Munsona, polegający na charakterystycznym, v-kształtnym formowaniu powieki dolnej, widocznym w czasie spuszczenia wzroku [Izdebska i wsp., 2009].

W leczeniu stożka rogówki przeprowadza się korekcję widzenia z wykorzystaniem soczewek okularowych oraz miękkich lub twardych soczewek kontaktowych. U pacjentów można wykonywać również zabieg sieciowania włókien kolagenowych rogówki w obecności ryboflawiny i światła UV-A (*ang. cross-linking*), w rezultacie którego dochodzi do utwardzenia rogówki. Inne zabiegi chirurgiczne obejmują wszczepianie pierścieni śródrogówkowych spłaszczających uwypuklenie, a także przeszczep rogówki, który wykonuje się aż u 21% pacjentów [Izdebska i wsp., 2009]. W bezpośredniej terapii stożka rogówki nie stosuje się środków farmakologicznych, natomiast w łagodzeniu stanów zapalnych towarzyszących chorobie, można wykorzystać leki z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. U pacjentów po zabiegach chirurgicznych wprowadza się leczenie kroplami antybiotykowymi oraz steroidowymi [Shimmura-Tomita i wsp., 2013; Fan Gaskin i wsp., 2014].

Wysoka krótkowzroczność polega na niezdolności oka do tworzenia prawidłowo zogniskowanego obrazu na siatkówce, co jest zwykle wynikiem wydłużenia osi oraz zmiany kształtu gałki ocznej. W przypadku wysokiej krótkowzroczności, wielkość wady w dioptriach (D) przekracza $-6,0$ D i może sięgać wartości $-20,0$ D.

Krótkowzroczność wysoka nazywana jest często krótkowzrocznością patologiczną, ponieważ w jej przebiegu obserwuje się występowanie licznych zmian degeneracyjnych w przednim i tylnym biegunie oka, do których należą m.in.: spłaszczenie rogówki, zaniki siatkówkowo-naczyniówkowe, odwarstwienie siatkówki oraz garbiak tylny twardówki [Zejmo i wsp., 2009a]. Ponadto u osób z wysoką krótkowzrocznością odnotowano wyższe ryzyko rozwoju innych patologii w obrębie narządu wzroku, takich jak przedwczesna zaćma, czy jaskra, co dodatkowo wpływa niekorzystnie na funkcję widzenia [Saw i wsp., 2005; Marcus i wsp., 2011].

Wysoka krótkowzroczność dotyczy zarówno mężczyzn, jak i kobiet. W zależności od regionu geograficznego i przynależności etnicznej, stanowi od 6 do 33% wszystkich przypadków krótkowzroczności, będąc jednocześnie jedną z głównych przyczyn całkowitej utraty wzroku u ludzi [Pan i wsp., 2012]. W Polsce nie przeprowadzono do tej pory wielu badań epidemiologicznych dotyczących wysokiej krótkowzroczności, wskazano jednak, że w grupie niedowidzących oraz niewidomych pacjentów 26-31% dorosłych i 12% dzieci było obarczonych wysoką krótkowzrocznością [Hańczyc i wsp., 1981]. W badaniach dzieci w wieku szkolnym, przeprowadzonych na terenie szkół Poznania, wysoką krótkowzroczność stwierdzono u 0,06% dzieci [Dalz, 2003].

Podstawową metodą korekcji ostrości widzenia u osób obarczonych wysoką krótkowzrocznością jest stosowanie soczewek okularowych lub kontaktowych o ujemnej mocy optycznej, pozwalające na skupianie promieni świetlnych dokładnie na siatkówce. Spośród metod zabiegowych w terapii wykorzystuje się techniki laserowe, dzięki którym możliwe jest modelowanie centralnej części rogówki. Stosowane są również wszczepy soczewek faliżnych. Leczenie farmakologiczne polega głównie na stosowaniu środków z grupy antagonistów receptorów muskarynowych, zwiększających naczyniówkowo-siatkówkowy przepływ krwi [Zejmo i wsp., 2009b].

Zakłada się, że podłoże zarówno stożka rogówki, jak i wysokiej krótkowzroczności jest podobne. Z uwagi na jego złożoność, nie zostało jednak w pełni poznane. W związku z tym, w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, podjęto badania w kierunku wyjaśnienia przyczyn obu tych chorób.

Sugeruje się, że rolę w powstawaniu i rozwoju obydwu zaburzeń mogą odgrywać determinanty środowiskowe. Wśród czynników etiologicznych stożka rogówki wymienia się nawykowe pocieranie oczu, noszenie soczewek kontaktowych, alergię oraz atopię, które prowadzą do mikrourazów powierzchni nabłonka rogówki [McMonnies, 2009; Romero-Jiménez i wsp., 2010; Bawazeer i wsp., 2000; Sharma i wsp., 2013]. W odpowiedzi na powtarzające się uszkodzenia, komórki nabłonka rogówki wydzielają mediatory zapalenia z grupy cytokin - interleukiny 1 (IL-1). Uwalnianie interleukin może być również indukowane przez promieniowanie UV, które generuje powstawanie reaktywnych form tlenu, wywołujących w komórkach stres oksydacyjny. Ponieważ rogówka jest nieustannie narażona na działanie światła UV, jest szczególnie podatna na stres oksydacyjny i uszkodzenia wywołane działaniem wolnych rodników [Cejka i wsp., 2010; Karolak i wsp., 2012b].

Do czynników środowiskowych, zaangażowanych w etiologię wysokiej krótkowzroczności, zalicza się czynności wymagające utrzymywania długotrwałego skurczu akomodacji, takie jak czytanie przy sztucznym oświetleniu, praca przy komputerze, czy nasilona praca wzrokowa z bliska. Na rozwój choroby ma także wpływ styl życia - niska aktywność fizyczna, nieodpowiednie nawyki żywieniowe (wysoka podaż węglowodanów w okresie rozwojowym) oraz urbanizacja, która pociąga za sobą wzrost zanieczyszczenia środowiska [Zejmo i wsp., 2009a; Charman, 2011].

Pomimo niewątpliwego znaczenia czynników środowiskowych w patogenezie stożka rogówki i wysokiej krótkowzroczności, istnieje wiele przesłanek świadczących o tym, że przyczyna omawianych schorzeń leży głównie w zaburzeniach genetycznych. Badania rodziców i dzieci - bliźniąt oraz rodzeństwa - wskazują na istnienie uwarunkowań rodzinnych w stożku rogówki i wysokiej krótkowzroczności. W przypadku obu chorób stwierdzono, że osoby mające chorych rodziców lub rodzeństwo, znacznie częściej same są obarczone tym zaburzeniem wzroku [Young, 2007; Nowak i Gajecka, 2011]. Ponadto wykazano wyższą zgodność występowania stożka rogówki i wysokiej krótkowzroczności u bliźniąt monozygotycznych, w porównaniu z bliźniętami dizygotycznymi [Bechara i wsp., 1996; Zejmo i wsp., 2009b]. Odnotowano także współistnienie omawianych zaburzeń z różnymi zespołami genetycznymi, takimi jak zespół Downa, zespół Ehlersa-Danlosa, czy wrodzona ślepotą Lebera w przypadku stożka rogówki [Cullen & Butler 1963; Kuming i Joffe 1977; Elder, 1994], a także zespół Marfana, czy zespół Sticklera w przypadku wysokiej krótkowzroczności [Zejmo i wsp., 2009a, Baird i wsp., 2010]. Wśród pacjentów z pozytywnym wywiadem rodzinnym zarówno w kierunku stożka rogówki, jak i wysokiej krótkowzroczności, odnotowano wszystkie modele dziedziczenia, przy czym najczęściej obserwuje się autosomalny dominujący typ dziedziczenia [Rydzanicz i wsp., 2011a; Nowak i Gajecka, 2011].

W poszukiwaniu genów warunkujących stożek rogówki zaangażowanych jest wiele zespołów. Na podstawie analizy sprzężeń zidentyfikowano dotychczas kilkanaście *loci* dla stożka rogówki w tym 1p36.23-36.21, 2p24, 3p14-q13, 5q14.3-q21.1, 5q21.2, 5q32-q33, 8q13.1-q21.11, 9q34, 14q11.2, 14q24.3, 15q2.32, 15q22.33-q24.2, 16q22.3-q23.1, 17p13 oraz 20q12 [Burdon i wsp., 2008; Hutchings i wsp. 2005; Brancati i wsp., 2004; Tang i wsp., 2005; Bisceglia i wsp., 2009; Li i wsp., 2006; Liskova i wsp., 2010; Hughes i wsp., 2003; Tyynismaa i wsp. 2002; Hameed i wsp., 2000; Fullerton i wsp., 2002]. Spośród wymienionych regionów

chromosomowych jedynie *locus* 5q21.2 zostało zreplikowane w innej niż badanej pierwotnie populacji [Bisceglia i wsp., 2009]. W zidentyfikowanych *loci* zmapowanych jest wiele genów, m.in.: *CTSH*, *CRABP1*, *IREB2*, *RASGRF1*, *COL8A1* i *VSX2*, które ze względu na lokalizację i pełnioną funkcję, zostały wybrane do dalszych badań molekularnych. Analiza sekwencji wspomnianych genów kandydatów nie wykazała jednak żadnych mutacji, mogących świadczyć o ich roli w powstawaniu stożka rogówki [Brancati i wsp., 2004, Burdon i wsp., 2008, Liskova i wsp., 2010, Hughes i wsp., 2003]. Mutację w regionie 15q22-q25, sprzężonym ze stożkiem rogówki, zidentyfikowano dopiero w 2011 roku w genie *miR-184*, w niewielkiej rodzinie z Irlandii Północnej [Hughes i wsp., 2011]. Innymi genami, które zaproponowano jako znaczące dla rozwoju choroby, były geny *VSX1* i *SOD1*, kodujące odpowiednio białko pełniące rolę czynnika transkrypcyjnego i dysmutazę ponadtlenkową [Heon i wsp., 2002; Udar i wsp., 2006]. Sprzeczne doniesienia badaczy, analizujących kolejne grupy pacjentów ze stożkiem rogówki, nie pozwoliły określić jednoznacznie związku pomiędzy mutacjami w tych genach a występowaniem choroby [Gajecka i wsp., 2009; Dash i wsp., 2010; Stabuc-Silih i wsp., 2010].

Podobną sytuację obserwuje się w przypadku wysokiej krótkowzroczności. Dotychczas zidentyfikowano blisko 30 *loci* związanych z krótkowzrocznością, spośród których przynajmniej 13 związanych jest z krótkowzrocznością wysoką, m. in.: 18p11.31 (MYP2), 12q21-q23 (MYP3), 7q36 (MYP4), 17q21-q22 (MYP5), 4q22-q27 (MYP11) i Xq23-q25 [Young i wsp. 1998a; Young i wsp. 1998b; Nürnberg i wsp., 2008; Naiglin i wsp., 2002; Paluru i wsp., 2003; Zhang i wsp., 2005, Zhang i wsp., 2007]. Lista genów, potencjalnie znaczących dla rozwoju zarówno rodzinnej, jak i sporadycznej formy wysokiej krótkowzroczności, zlokalizowanych w zidentyfikowanych *loci*, jest długa i obejmuje kilkanaście genów o różnorodnej funkcji. Wśród genów kandydatów wymieniano geny, takie jak *TGIF* (MYP2), *LUM* (MYP3) czy *COL1A1* (MYP5), jednak w kolejnych latach nie udało się dostarczyć jednoznacznych dowodów na potwierdzenie ich roli w rozwoju schorzenia [Pertile i wsp., 2008; Wang i wsp., 2009; Inamori i wsp., 2007; Nakanishi i wsp., 2009]. Doniesienia na temat udziału innych genów, *PAX6* i *SOX2*, w rozwoju wysokiej krótkowzroczności w niektórych populacjach, nie zostały do dziś bezsprzecznie potwierdzone [Simpson i wsp., 2007; Han i wsp., 2009].

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że czynniki genetyczne odgrywają znaczącą rolę w etiologii stożka rogówki oraz wysokiej krótkowzroczności. Sprzeczne

doniesienia dotyczące genów i mutacji warunkujących powstawanie oraz rozwój omawianych schorzeń sprawiają jednak, że istnieje konieczność prowadzenia dalszych prac badawczych w dziedzinie genetyki wieloczynnikowych chorób narządu wzroku.

Cel badań

Celem badań, prowadzonych w ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej, było poznanie, poprzez analizy molekularne, nowych czynników genetycznych uwikłanych w etiologię stożka rogówki i wysokiej krótkowzroczności, a także próba ustalenia związku pomiędzy tymi czynnikami, a występowaniem fenotypu choroby.

Punktem wyjścia realizowanych prac badawczych, dotyczących genetycznych uwarunkowań stożka rogówki i wysokiej krótkowzroczności, były analizy, które doprowadziły do identyfikacji *loci* 2q13-q14.3, 5q31, 13q32, 13q34 oraz 20p13-p12.2 sprzężonych ze stożkiem rogówki w wielopokoleniowych rodzinach z Ekwadoru oraz *loci* 7p12.3-7p11.2, 7p22.1-7p21.1 oraz 12p12.3-12p12.1 w polskiej rodzinie z wysoką krótkowzrocznością [Gajeczka i wsp., 2009, Rydzanicz i wsp., 2011a].

Hipoteza badawcza

Na podstawie powyższych wyników oraz zgromadzonych danych literaturowych, założono, że w patogenezie stożka rogówki i wysokiej krótkowzroczności uczestniczą różne geny, w których równocześnie występuje wiele wariantów sekwencji warunkujących fenotyp.

Material i metody

W ramach przedłożonej rozprawy doktorskiej przeprowadzono badania molekularne w ekwadorskich rodzinach ze stożkiem rogówki, w grupie polskich pacjentów ze sporadyczną formą stożka rogówki, a także wśród członków polskich rodzin z wysoką krótkowzrocznością. Materiał do badań stanowił genomowy DNA pozyskany z krwi obwodowej zarówno pacjentów, jak i tych członków rodzin, którzy nie przejawiali fenotypu stożka rogówki oraz wysokiej krótkowzroczności. Ponadto w badaniach wykorzystano linie komórkowe wyprowadzone z rogówek polskich pacjentów ze stożkiem rogówki oraz RNA, również pozyskany z rogówek pacjentów z Polski. Wszystkie badania zostały zaakceptowane przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu i prowadzone były zgodnie z Deklaracją Helsińską.

W badaniach wykorzystano tradycyjne techniki biologii molekularnej. Metodyka obejmuje projektowanie starterów, amplifikację i sekwencjonowanie wybranych fragmentów genów, analizę RFLP oraz RT-PCR. W projekcie wykorzystano także metody hodowli komórkowych oraz analizy komputerowe *in silico* z użyciem dostępnych programów i narzędzi internetowych.

Skrótowe omówienie publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

Poniżej przedstawiono skrótowe omówienie opublikowanych prac, będących wynikiem badań uzyskanych w trakcie realizacji przedłożonej rozprawy doktorskiej. Referencje odnoszące się do tych publikacji zostały pogrubione. Poszczególne publikacje naukowe ujęto w części „Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej”.

Celem pierwszej pracy było określenie roli genu *COL4A2* w patogenezie stożka rogówki w rodzinach ekwadorskich. Gen ten znajduje się w regionie chromosomowym 13q34, sprzężonym ze stożkiem rogówki i koduje łańcuch $\alpha 2$ kolagenu typu IV, który stanowi jeden z elementów budulcowych rogówki [Jun i wsp., 2001]. We wcześniejszych badaniach, zwrócono uwagę na korelację przebiegu stożka rogówki z rearanżacją włókien kolagenowych, zmianą ich średnicy, a także zwiększoną podatnością kolagenów na działanie enzymów proteolitycznych [Patey i wsp., 1984]. Na tej podstawie wnioskowano, że zmiany w genie *COL4A2* na poziomie sekwencji mogą wywoływać efekt fenotypowy, prowadzący do powstania stożka rogówki.

W genie *COL4A2* zidentyfikowano 111 wariantów sekwencji, w tym 13, które znajdowały się w regionach kodujących. Pięć wariantów było zmianami niesynonimicznymi - c.574G>T (Val192Phe), c.1550G>A (Arg517Lys), c.2048G>C (Gly683Ala), c.2102A>G (Lys701Arg), c.2152C>T (Pro718Ser). Nie zidentyfikowano zmian na poziomie sekwencji w regionie promotora wspólnym dla genów *COL4A1* i *COL4A2*. Żadna z wykrytych zmian nie okazała się znacząca dla rozwoju choroby w badanych rodzinach ze stożkiem rogówki [**Karolak i wsp., 2011**].

W kolejnej pracy poszukiwano zmian w sekwencji trzech genów *PITX1*, *TGFBI* oraz *IL9* zlokalizowanych w regionie chromosomowym 5q31, sprzężonym ze stożkiem rogówki. Badania molekularne wspomnianych genów przeprowadzono w ekwadorskiej rodzinie ze stożkiem rogówki KTCN-011 oraz u pięciu pacjentów z delecjami lub duplikacjami w regionie chromosomowym 5q31, u których występowały zmiany okulistyczne, w tym stożek rogówki. W literaturze wskazywano na obniżony poziom

ekspresji genu *TGFBI* wśród chorych ze stożkiem rogówki, a także związek mutacji w tym genie z innymi degeneracyjnymi chorobami rogówki [Zhao i wsp., 2002; Yang i wsp., 2010]. Przesłanką do analizy genu *IL-9* był jego udział w procesach zapalnych, które mogą być przyczyną rozwoju stożka rogówki. Sekwencjonowanie genów *PITX1*, *TGFBI* oraz *IL9* doprowadziło do identyfikacji łącznie 19 wariantów sekwencji, w tym czterech w regionach kodujących genów. Losowe występowanie zmian u chorych oraz zdrowych członków badanej rodziny, a także brak segregacji tych wariantów u pacjentów z delecjami lub duplikacjami w regionie 5q31, wykluczyło rolę genów *PITX1*, *TGFBI* oraz *IL9* w patogenezie stożka rogówki [**Rosenfeld i wsp., 2011**].

Celem kolejnej pracy było określenie roli ośmiu genów: *MBNL1*, *IPO5*, *FARP1*, *RNF113B*, *STK24*, *DOCK9*, *ZIC5* oraz *ZIC2* w rozwoju stożka rogówki. Geny te zlokalizowane są w *locus* 13q32, sprzężonym ze stożkiem rogówki w pochodzącej z Ekwadoru rodzinie KTCN-014. Zostały wybrane do analizy na podstawie obserwacji, które wskazywały na udział tych genów w różnicowaniu komórek i odpowiedzi na stres oksydacyjny, a więc procesów ważnych w kontekście rozwoju stożka rogówki. W badanych genach zidentyfikowano łącznie 92 warianty sekwencji, spośród których 17 nie było dotychczas opisywanych w genetycznych bazach danych i literaturze. Wykryto nową mutację c.2262A>C w eksonie 20 genu *DOCK9* oraz trzy warianty sekwencji w genach *DOCK9*, *IPO5* i *STK24* (odpowiednio, c.717+43A>G, c.2380-134A>C oraz c.1089+29G>C), segregujące w pełni z fenotypem stożka rogówki w badanej rodzinie z populacji ekwadorskiej. Mutacja c.2262A>C w genie *DOCK9*, prowadząca do potencjalnie patogenicznej substytucji Gln754His na poziomie białka, nie występowała w grupie kontrolnej, co wskazuje na prawdopodobny udział genu *DOCK9* w patogenezie i/lub rozwoju stożka rogówki w badanej rodzinie z Ekwadoru [**Czugala, Karolak i wsp. 2012**]. Warto jednak zaznaczyć, że w grupie polskich pacjentów, obarczonych stożkiem rogówki, rozkład tego wariantu sekwencji jest zupełnie odmienny, co sugeruje wpływ innych genów na rozwój choroby w populacji polskiej [dane własne, nieopublikowane]. W ramach badań przeprowadzono także analizę ekspresji genów *DOCK9*, *IPO5* i *STK24* w rogówce ludzkiej, obciążonej stożkiem rogówki oraz w rogówce, pochodzącej od osoby bez fenotypu choroby. Była to pierwsza praca ukazująca ekspresję genów *IPO5* i *STK24* w ludzkiej rogówce [**Czugala, Karolak i wsp. 2012**].

Celem kolejnej pracy było przeprowadzenie analizy genów kandydatów - *IL1A*, *IL1B* i *IL1RN* z *locus* 2q13-q14.3 oraz genu *SLC4A11* z *locus* 20p13-p12.2,

sprzężonych ze stożkiem rogówki w ekwadorskiej rodzinie KTCN-019. W literaturze zaproponowano hipotezę, że zwiększenie ilości wydzielania IL-1 przez komórki nabłonka rogówki, zwiększa równocześnie ich wrażliwość na działanie IL-1, co może prowadzić do aktywacji apoptozy keratocytów i rozwoju stożka rogówki [Wilson i wsp., 1996]. Rolę genów z grupy interleukin zdawały się potwierdzać wyniki badań asocjacji polimorfizmów w genach *IL1A*, *IL1B* i *IL1RN* ze stożkiem rogówki, w grupie niespokrewnionych osób z populacji koreańskiej, które wykazały, że dwa polimorfizmy w promotorze genu *IL1B* (-31T>C i -511 C>T) korelują z fenotypem stożka rogówki w badanej grupie [Kim i wsp., 2008]. Sekwencjonowanie genów *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN* i *SLC4A11*, przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, wykazało obecność łącznie 66 wariantów sekwencji, w tym substytucję c.214+242C>T w genie *IL1RN* oraz nową delecję 54 nukleotydów w pozycji c.2558+149_2558+203 w genie *SLC4A11*. Zaobserwowano istotnie statystycznie częstsze występowanie wspomnianych zmian u chorych, w porównaniu z osobami zdrowymi, co sugeruje udział genów *IL1RN* oraz *SLC4A11* w powstawaniu fenotypu stożka rogówki w grupie pacjentów z Ekwadoru [Nowak, Karolak i wsp., 2013].

Kolejna praca dotyczyła wysokiej krótkowzroczności. Jej celem było określenie roli trzech polimorfizmów - rs6214, rs10860860 oraz rs2946834 - w genie *IGF-1* w polskich rodzinach z wysoką krótkowzrocznością, które wcześniej asocjowane były z rozwojem choroby w populacji pochodzenia kaukaskiego [Metlapally i wsp., 2010]. W populacji polskiej wykonano genotypowanie z wykorzystaniem techniki PCR-RFLP oraz sekwencjonowania. Analiza wykazała brak asocjacji badanych polimorfizmów z wysoką krótkowzrocznością w polskich rodzinach, co wskazuje, że genetyczne przyczyny powstawania wysokiej krótkowzroczności mogą różnić się między populacjami [Rydzanicz i wsp., 2011b]. Ponadto w ramach rozprawy przeprowadzono analizę sekwencji genu *GRB10* z *locus* 7p12.3-7p11.2, sprzężonego z wysoką krótkowzrocznością w pochodzącej z Polski rodzinie HM-32. Analiza doprowadziła do identyfikacji 21 wariantów w sekwencji genu *GRB10*. Żadna ze zmian nie korelowała jednak w pełni z fenotypem choroby w badanej rodzinie [badania własne, nieopublikowane].

Ostatnie dwie publikacje, które stanowią część niniejszej rozprawy doktorskiej, są pracami przeglądowymi. Są one podsumowaniem obecnego stanu wiedzy na temat wieloczynnikowości stożka rogówki, przeprowadzonym na podstawie badań własnych oraz danych pochodzących z literatury światowej. W pracach wskazano na znaczącą

rolę czynników genetycznych w stożku rogówki, które dodatkowo modyfikowane są przez czynniki środowiskowe [Karolak i wsp., 2012a; Karolak i wsp., 2012b]

Podsumowanie

Uzyskane wyniki badań pozwoliły na poznanie nowych czynników genetycznych i potwierdzają hipotezę postawioną w niniejszej rozprawie, zakładającą heterogeniczność i udział wielu genów w powstawaniu zaburzeń wzroku - stożka rogówki i wysokiej krótkowzroczności.

Podjęte w ramach rozprawy doktorskiej zadania badawcze, wiążące wiele aspektów, dotyczących etiologii stożka rogówki i wysokiej krótkowzroczności, nie były dotychczas prowadzone w przedstawionym zakresie.

Zarówno stożek rogówki, jak i wysoka krótkowzroczność odnoszą się do znaczącej części populacji ludzkiej, stanowiąc przez to ważny problem zdrowotny i ekonomiczny w naszym kraju, a także na świecie. Identyfikacja nieznanych dotąd przyczyn wspomnianych chorób, może przynieść wymierne korzyści dla samych pacjentów oraz środowiska lekarskiego i naukowego.

PIŚMIENICTWO

Baird PN, Schäche M, Dirani M. *The GEnes in Myopia (GEM) study in understanding the aetiology of refractive errors*. Prog Retin Eye Res. 2010; 29(6):520-42.

Bawazeer AM, Hodge WG, Lorimer B. *Atopy and keratoconus: a multivariate analysis*. Br J Ophthalmol. 2000; 84:834-836.

Bechara SJ, Waring GO 3rd, Insler MS. *Keratoconus in two pairs of identical twins*. Cornea. 1996; 15(1):90-93.

Bisceglia L, De Bonis P, Pizzicoli C, Fischetti L, Laborante A, Di Perna M, Giuliani F, Delle Noci N, Buzzonetti L, Zelante L. *Linkage analysis in keratoconus: replication of locus 5q21.2 and identification of other suggestive Loci*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009; 50(3):1081-1086.

Brancati F, Valente EM, Sarkozy A, Fehér J, Castori M, Del Duca P, Mingarelli R, Pizzuti A, Dallapiccola B. *A locus for autosomal dominant keratoconus maps to human chromosome 3p14-q13*. J Med Genet. 2004; 41:188-192.

Burdon KP, Coster DJ, Charlesworth JC, Mills RA, Laurie KJ, Giunta C, Hewitt AW, Latimer P, Craig JE. *Apparent autosomal dominant keratoconus in a large Australian pedigree accounted for by digenic inheritance of two novel loci*. Hum Genet. 2008; 124(4):379-386.

Cejka C, Pláteník J, Sirc J, Ardan T, Michálek J, Brůnová B, Cejková J. *Changes of corneal optical properties after UVB irradiation investigated spectrophotometrically*. Physiol Res. 2010; 59(4):591-597.

Charman N. *Myopia: its prevalence, origins and control*. Ophthalmic Physiol Opt. 2011; 31(1):3-6.

Cullen JF, Butler HG. *Mongolism (Down's syndrome) and keratoconus*. Br J Ophthalmol. 1963; 47:321-330.

Czugała M, Karolak JA, Nowak DM, Polakowski P, Pitarque J, Molinari A, Rydzanicz M, Bejjani BA, Yue BY, Szaflik JP, Gajecka M. *Novel mutation and three other sequence variants segregating with phenotype at keratoconus 13q32 susceptibility locus*. Eur J Hum Genet. 2012; 20(4):389-397.

Dalz M. *Ocena epidemiologiczna występowania wad wzroku u dzieci i młodzieży miasta Poznania*, rozprawa doktorska. Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2003 rok, Syg. BG 136671.

Dash DP, George S, O'Prey D, Burns D, Nabili S, Donnelly U, Hughes AE, Silvestri G, Jackson J, Frazer D, Héon E, Willoughby CE. *Mutational screening of VSX1 in keratoconus patients from the European population*. Eye (Lond). 2010; 24(6):1085-1092.

Elder LJ. *Leber congenital amaurosis and its association with keratoconus and keratoglobus*. J Pediatr Ophthalmol Strabismus. 1994; 31(1):38-40.

Fan Gaskin JC, Patel DV, McGhee CN. *Acute corneal hydrops in keratoconus - new perspectives*. Am J Ophthalmol. 2014; Jan 31. pii: S0002-9394(14)00047-6.

- Fink BA, Wagner H, Steger-May K, Rosenstiel C, Roediger T, McMahon TT, Gordon MO, Zadnik K. *Differences in keratoconus as a function of gender*. Am J Ophthalmol. 2005; 140(3):459-468.
- Fullerton J, Paprocki P, Foote S, Mackey DA, Williamson R, Forrest S. *Identity-by-descent approach to gene localisation in eight individuals affected by keratoconus from north-west Tasmania, Australia*. Hum Genet. 2002; 110(5):462-470.
- Gajecka M, Radhakrishna U, Winters D, Nath SK, Rydzanicz M, Ratnamala U, Ewing K, Molinari A, Pitarque JA, Lee K, Leal SM, Bejjani BA. *Localization of a gene for Keratoconus to a 5,6 Mb interval on 13q32*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009; 50(4): 1531-1539.
- Georgiou T, Funnell CL, Cassels-Brown A, O'Connor R. *Influence of ethnic origin on the incidence of keratoconus and associated atopic disease in Asians and whites*. Eye 2004; 18(4):379-383.
- Gokhale NS. *Epidemiology of keratoconus*. Indian J Ophthalmol. 2013; 61:382-383.
- Hameed A, Khaliq S, Ismail M, Anwar K, Ebenezer ND, Jordan T, Mehdi SQ, Payne AM, Bhattacharya SS. *A novel locus for Leber congenital amaurosis (LCA4) with anterior keratoconus mapping to chromosome 17p13*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000; 41(3):629-633.
- Han W, Leung KH, Fung WY, Mak JY, Li YM, Yap MK, Yip SP. *Association of PAX6 polymorphisms with high myopia in Han Chinese nuclear families*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009; 50:47-56.
- Hańczyc P, Koziorowska M, Lejcuś U. *Przyczyny utraty wzroku u niewidomych i ociemniałych na Dolnym Śląsku*. Klinika Oczna. 1981; 83:339-340.
- Héon E, Greenberg A, Kopp KK, Rootman D, Vincent AL, Billingsley G, Priston M, Dorval KM, Chow RL, McInnes RR, Heathcote G, Westall C, Sutphin JE, Semina E, Bremner R, Stone EM. *VSI1: a gene for posterior polymorphous dystrophy and keratoconus*. Hum Mol Genet. 2002; 11(9):1029-1036.
- Hughes AE, Bradley DT, Campbell M, Lechner J, Dash DP, Simpson DA, Willoughby CE. *Mutation altering the miR-184 seed region causes familial keratoconus with cataract*. Am J Hum Genet. 2011; 89(5):628-633.
- Hughes AE, Dash DP, Jackson AJ, Frazer DG, Silvestri G. *Familial keratoconus with cataract: linkage to the long arm of chromosome 15 and exclusion of candidate genes*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44(12):5063-5066.
- Hutchings H, Ginisty H, Le Gallo M, Levy D, Stoësser F, Rouland JF, Arné JL, Laloux MH, Calvas P, Roth MP, Hovnanian A, Malecaze F. *Identification of a new locus for isolated familial keratoconus at 2p24*. J Med Genet. 2005; 42(1):88-94.
- Inamori Y, Ota M, Inoko H, Okada E, Nishizaki R, Shiota T, Mok J, Oka A, Ohno S, Mizuki N. *The COL1A1 gene and high myopia susceptibility in Japanese*. Hum Genet. 2007; 122:151-157.
- Izdebska J, Polakowski P, Czeszyk-Piotrowicz A, Szaflik JP, Szaflik J. *Stożek rogówki – obecne dane epidemiologiczne i możliwości terapeutyczne*. Okulistyka. 2009; 2:17-23.

Jun AS, Liu SH, Koo EH, Do DV, Stark WJ, Gottsch JD. *Microarray analysis of gene expression in human donor corneas*. Arch Ophthalmol. 2001; 119:1629-1634.

Kański J. *Okulistyka kliniczna*. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 1997, 99-103.

Karolak JA, Kulinska K, Nowak DM, Pitarque JA, Molinari A, Rydzanicz M, Bejjani BA, Gajecka M. *Sequence variants in COL4A1 and COL4A2 genes in Ecuadorian families with keratoconus*. Mol Vis. 2011; 17:827-843.

Karolak JA, Nowak DM, Gajecka M. *Complexity of genetics in keratoconus*. Annual Report Polish Academy of Sciences. 2012a; 89-91.

Karolak JA, Szaflik JP, Gajecka M, *Etiologia stożka rogówki i molekularne aspekty choroby – aktualny stan wiedzy*. Okulistyka. 2012b; 3:9-13.

Kim S, Mok J, Kim H, Joo CK. *Association of -31T>C and -511 C>T polymorphisms in the interleukin 1 beta (IL1B) promoter in Korean keratoconus patients*. Mol Vis. 2008; 14:2109-2116.

Kuming BS, Joffe L. *Ehlers-Danlos syndrome associated with keratoconus. A case report*. S Afr Med J. 1977; 52(10):403-405.

Léoni-Mesplié S, Mortemousque B, Touboul D, Malet F, Praud D, Mesplié N, Colin J. *Scalability and severity of keratoconus in children*. Am J Ophthalmol. 2012; 154(1):56-62.

Li X, Rabinowitz YS, Tang YG, Picornell Y, Taylor KD, Hu M, Yang H. *Two-stage genome-wide linkage scan in keratoconus sib pair families*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006; 47:3791-3795.

Liskova P, Hysi PG, Waseem N, Ebenezer ND, Bhattacharya SS, Tuft SJ. *Evidence for keratoconus susceptibility locus on chromosome 14: a genome-wide linkage screen using single-nucleotide polymorphism markers*. Arch Ophthalmol. 2010; 128(9):1191-1195.

Marcus MW, de Vries MM, Junoy Montolio FG, Jansonius NM. *Myopia as a risk factor for open-angle glaucoma: a systematic review and meta-analysis*. Ophthalmology. 2011; 118(10):1989-1994.

McMonnies CW. *Mechanisms of Rubbing-Related Corneal Trauma in Keratoconus*. Cornea. 2009; 28:607-615.

Metlapally R, Ki CS, Li YJ, Tran-Viet KN, Abbott D, Malecaze F, Calvas P, Mackey DA, Rosenberg T, Paget S, Guggenheim JA, Young TL. *Genetic association of insulin-like growth factor-1 polymorphisms with high-grade myopia in an international family cohort*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010; 51:4476-4479.

Naiglin L, Gazagne C, Dallongeville F, Thalamas C, Idder A, Rascol O, Malecaze F, Calvas P. *A genome wide scan for familial high myopia suggests a novel locus on chromosome 7q36*. J Med Genet. 2002; 39:118-124.

Nakanishi H, Yamada R, Gotoh N, Hayashi H, Otani A, Tsujikawa A, Yamashiro K, Shimada N, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Saito M, Saito K, Iida T, Matsuda F, Yoshimura N. *Absence of association between COL1A1 polymorphisms and high myopia in the Japanese population*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009; 50:544-550.

Nowak DM, Gajecka M. *The genetics of keratoconus*. Middle East Afr J Ophthalmol. 2011; 18(1):2-6.

Nowak DM, Karolak JA, Kubiak J, Gut M, Pitarque JA, Molinari A, Bejjani BA, Gajecka M. *Substitution at IL1RN and deletion at SLC4A11 segregating with phenotype in familial keratoconus*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013; 54(3):2207-2215.

Nürnberg G, Jacobi FK, Broghammer M, Becker C, Blin N, Nürnberg P, Stephani U, Pusch CM. *Refinement of the MYP3 locus on human chromosome 12 in a German family with Mendelian autosomal dominant high-grade myopia by SNP array mapping*. Int J Mol Med. 2008; 21:429-438.

Paluru P, Ronan SM, Heon E, Devoto M, Wildenberg SC, Scavello G, Holleschau A, Mäkitie O, Cole WG, King RA, Young TL. *New locus for autosomal dominant high myopia maps to the long arm of chromosome 17*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44:1830-1836.

Pan CW, Ramamurthy D, Saw SM. *Worldwide prevalence and risk factors for myopia*. Ophthalmic Physiol Opt. 2012; 32(1):3-16.

Patey A, Savoldelli M, Pouliquen Y. *Keratoconus and normal cornea: a comparative study of the collagenous fibers of the corneal stroma by image analysis*. Cornea. 1984; 3:119-124.

Pertile KK, Schache M, Islam FM, Chen CY, Dirani M, Mitchell P, Baird PN. *Assessment of TGIF as a candidate gene for myopia*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008; 49:49-54.

Rabinowitz YS. *Keratoconus: major review*. Surv Ophthalmol. 1998; 42:297-319.

Romero-Jiménez M, Santodomingo-Rubido J, Wolffsohn JS. *Keratoconus: a review*. Cont Lens Anterior Eye. 2010; 33(4):157-166.

Rosenfeld JA, Drautz JM, Clericuzio CL, Cushing T, Raskin S, Martin J, Tervo RC, Pitarque JA, Nowak DM, Karolak JA, Lamb AN, Schultz RA, Ballif BC, Bejjani BA, Gajecka M, Shaffer LG. *Deletions and duplications of developmental pathway genes in 5q31 contribute to abnormal phenotypes*. Am J Med Genet A. 2011; 155A(8):1906-1916.

Rydzanicz M, Nath SK, Sun C, Podfigurna-Musiela M, Frajdenberg A, Mrugacz M, Winters D, Ratnamala U, Radhakrishna U, Bejjani BA, Gajecka M. *Identification of novel suggestive loci for high-grade myopia in Polish families*. Mol Vis. 2011a; 17:2028-2039.

Rydzanicz M, Nowak DM, Karolak JA, Frajdenberg A, Podfigurna-Musiela M, Mrugacz M, Gajecka M. *IGF-1 gene polymorphisms in Polish families with high-grade myopia*. Mol Vis. 2011b; 17:2428-2439.

Saw SM, Gazzard G, Shih-Yen EC, Chua WH. *Myopia and associated pathological complications*. Ophthalmic Physiol Opt. 2005; 25:381-391.

Sharma N, Rao K, Maharana PK, Vajpayee RB. *Ocular allergy and keratoconus*. Indian J Ophthalmol. 2013; 61:407-409.

Shimmura-Tomita M, Shimmura S, Satake Y, Shimazaki-Den S, Omoto M, Tsubota K, Shimazaki J. *Keratoplasty postoperative treatment update*. Cornea. 2013; 32 Suppl 1:S60-64.

Simpson CL, Hysi P, Bhattacharya SS, Hammond CJ, Webster A, Peckham CS, Sham PC, Rahi JS. *The roles of PAX6 and SOX2 in myopia: lessons from the 1958 British birth cohort*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007; 48:4421-4425.

Stabuc-Silih M, Strazisar M, Hawlina M, Glavac D. *Absence of pathogenic mutations in VSX1 and SOD1 genes in patients with keratoconus*. Cornea. 2010; 29:172-176.

Tang YG, Rabinowitz YS, Taylor KD, Li X, Hu M, Picornell Y, Yang H. *Genomewide linkage scan in a multigeneration Caucasian pedigree identifies a novel locus for keratoconus on chromosome 5q14.3-q21.1*. Genet Med. 2005; 7:397-405.

Tyynismaa H, Sistonen P, Tuupanen S, Tervo T, Dammert A, Latvala T, Alitalo T. *A locus for autosomal dominant keratoconus: linkage to 16q22.3-q23.1 in Finnish families*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002; 43(10):3160-3164.

Udar N, Atilano SR, Brown DJ, Holguin B, Small K, Nesburn AB, Kenney MC. *SOD1: a candidate gene for keratoconus*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006; 47:3345-3351.

Wang P, Li S, Xiao X, Jia X, Jiao X, Guo X, Zhang Q. *High myopia is not associated with the SNPs in the TGIF, Lumican, TGFBI, and HGF genes*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009; 50:1546-1551.

Wilson SE, He YG, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M, Chwang EL. *Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing*. Exp Eye Res. 1996; 62:325-327.

Yang J, Han X, Huang D, Yu L, Zhu Y, Tong Y, Zhu B, Li C, Weng M, Ma X. *Analysis of TGFBI gene mutations in Chinese patients with corneal dystrophies and review of the literature*. Mol Vis. 2010; 16:1186-1193.

Young TL, Metlapally R, Shay AE. *Complex trait genetics of refractive error*. Arch Ophthalmol. 2007; 125:38-48.

Young TL, Ronan SM, Alvear AB, Wildenberg SC, Oetting WS, Atwood LD, Wilkin DJ, King RA. *A second locus for familial high myopia maps to chromosome 12q*. Am J Hum Genet. 1998a; 63:1419-1424.

Young TL, Ronan SM, Drahozal LA, Wildenberg SC, Alvear AB, Oetting WS, Atwood LD, Wilkin DJ, King RA. *Evidence that a locus for familial high myopia maps to chromosome 18p*. Am J Hum Genet. 1998b; 63:109-119.

Zejmo M, Forminska-Kapuscik M, Pieczara E, Filipek E, Mrukwa-Kominek E, Samochowiec-Donocik E, Leszczynski R, Smuzyńska M. *Etiopathogenesis and management of high-degree myopia. Part I*. Med Sci Monit. 2009; 15: 199-202.

Zejmo M, Forminska-Kapuscik M, Pieczara E, Filipek E, Mrukwa-Kominek E, Samochowiec-Donocik E, Domanska O, Smuzyńska M. *Etiopathogenesis and management of high-degree myopia. Part II*. Med Sci Monit. 2009; 15(9):RA252-255.

Zhang Q, Guo X, Xiao X, Jia X, Li S, Hejtmancik JF. *A new locus for autosomal dominant high myopia maps to 4q22-q27 between D4S1578 and D4S1612.* Mol Vis. 2005; 11:554-560.

Zhang Q, Li S, Xiao X, Guo X. *Confirmation of a genetic locus for X-linked recessive high myopia outside MYP1.* J. Hum. Genet.. 2007; 52:469-472.

Zhao G, Wang C, Sun W, Zhang W, Li Y, Sheng H, Liang T. *Expression of betaig-h3 in keratoconus and normal cornea.* Chin Med J (Engl). 2002; 115(9):1401-1404.

PUBLIKACJE STANOWIĄCE PODSTAWĘ
ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
WRAZ Z MATERIAŁAMI UZUPEŁNIAJĄCYMI