

Diagnostyka molekularna wrodzonej łamliwości kości typu I

ANNA GALICKA¹, TOMASZ BIELAWSKI², ANDRZEJ GINDZIĘSKI¹, KRYSZYNA ŚREDZIŃSKA¹

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku: ¹Zakład Chemii Medycznej, kierownik: prof. dr hab. med. A. Gindzieński, ²Klinika Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej

Diagnostyka molekularna wrodzonej łamliwości kości typu I

Galicka A.¹, Bielawski T.², Gindzieński A.¹, Średzińska K.¹

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku: ¹Zakład Chemii Medycznej, e-mail: angajko@umwb.edu.pl, ²Klinika Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej

Przyczyną wrodzonej łamliwości kości (OI) są mutacje w genach kodujących kolagen typu I. W OI typu I mutacje typu „null” powodują zmniejszenie syntezy prawidłowego kolagenu o około 50%, natomiast w OI typu II, III i IV występują mutacje strukturalne. Ponieważ leczenie farmakologiczne i planowanie terapii genowej uzależnione jest od rodzaju mutacji i ich konsekwencji, bardzo istotne jest szybkie i właściwe zdiagnozowanie typu choroby.

Cel pracy. Ocena zastosowania detekcji „null allele” genu COL1A1 i analizy kolagenu syntetyzowanego przez fibroblasty skórne w diagnostyce OI typu I.

Materiał i metody. Analizie poddano 17 chorych oraz 20 zdrowych (grupa kontrolna). Kolagen znakowano [³H] proliną w fibroblastach skórnych i analizowano elektroforetycznie, oraz poprzez trawienie bakteryjną kolagenazą z *Clostridium histolyticum*. Materiał genetyczny izolowano z fibroblastów lub z krwi obwodowej i stosując polimorfizm genu COL1A1 identyfikowano „null allele”.

Wyniki. W 17-osobowej grupie 11 badanych było heterozygotycznych pod względem insercji 4 pz w regionie 3'UTR genu COL1A1. „Null allele” wykryto u 7 badanych ze zredukowaną synteżą kolagenu o około 50%, oraz u 2 badanych ze zredukowaną synteżą kolagenu o 80% i 15%. Natomiast u jednej osoby z 50-procentową redukcją syntezy kolagenu występowały transkrypty obu alleli genu COL1A1.

Wnioski. Zastosowanie polimorfizmu insercji 4 pz w regionie 3'UTR genu COL1A1 w detekcji „null allele” pozwoliło na potwierdzenie diagnostyki klinicznej u 9 spośród 17 chorych. U trzech wyniki badań ilościowych kolagenu i detekcji „null allele” były niezgodne, co wskazuje na konieczność wykonania badań kompleksowych w celu postawienia ostatecznej diagnozy.

Słowa kluczowe: diagnostyka, wrodzona łamliwość kości typu I, kolagen, „null allele”

Pol. Merk. Lek., 2008, XXV, 148, 345

Molecular diagnosis of osteogenesis imperfecta type I

Galicka A.¹, Bielawski T.², Gindzieński A.¹, Średzińska K.¹

Medical University of Białystok, Poland: ¹Department of Medical Chemistry, e-mail: angajko@umwb.edu.pl, ²Department of Reproduction and Gynecological Endocrinology

Osteogenesis imperfecta (OI) is caused by mutations in collagen type I genes. In contrast to OI type II, III and IV where there are the structural mutations, in OI type I decreased production of normal collagen is due to the presence of a null allele. Because both pharmacological and gene therapy approaches depend on type of mutation and its consequences, quick and proper diagnosis is required.

Aim of the study. Application of COL1A1 null allele detection and analysis of collagen synthesized by skin fibroblasts in OI type I diagnosis.

Material and methods. Analysis was carried out in 17 patients and 20 healthy persons. Collagen was labeled with [³H]proline in skin fibroblasts and analyzed with electrophoretic method (SDS-PAGE) and by digestion with collagenase from *Clostridium histolyticum*. Nucleic acids were isolated from fibroblasts or peripheral blood and null allele was identified using a COL1A1 gene polymorphism.

Results. In the group of 17 OI patients 11 were heterozygous for insertion of 4 bp in 3'UTR region of COL1A1. „Null allele” was identified in 7 patients with decreased collagen synthesis by about 50% and in 2 patients with decreased collagen synthesis by 80% and 15%. However, in one patient with decreased collagen synthesis by about 50%, both allele transcripts were present.

Conclusions. Application of 4 bp insertion in 3'UTR of COL1A1 gene to detect „null allele” confirmed clinical diagnosis in 9 among 17 OI patients. In 3 patients results of quantitative study of collagen and „null allele” detection were different, what indicate that for final diagnosis comprehensively studies are needed.

Key words: osteogenesis, imperfecta type I diagnosis, collagen, null allele

Pol. Merk. Lek., 2008, XXV, 148, 345

Wrodzona łamliwość kości OI (ang. osteogenesis imperfecta) jest autosomalną, genetyczną chorobą tkanki łącznej dziedziczną jako cecha dominująca [4, 13]. Na podstawie klinicznych, genetycznych i radiologicznych cech *Sillence* i *Rimoin* [14] wyodrębnili 4 typy choroby (I-IV). W chorobie typu I występują najłagodniejsze objawy, m.in. niebieska twardówka, nieliczne złamania lub ich brak, niski wzrost, oraz niekiedy utrata słuchu. Typ II choroby jest śmiertelny, noworodki rodzą się z licznymi złamaniami żeber i kości długich, niezmieralną czaszką, a bezpośrednią przyczyną ich śmierci jest niewydolność oddechowa. Typ III charakteryzuje się wielokrotnymi złamaniami, postępującą deformacją sylwetki, niskim wzrostem, trójkątną twarzą. Łagodniejsza w przebiegu jest choroba typu IV. W ostatnich latach klasyfikację choroby rozszerzono o trzy kolejne typy choroby V, VI i VII [13].

Biochemiczne i molekularne badania wykazały, że w większości przypadków przyczyną choroby są mutacje w genach

COL1A1 i COL1A2 kodujących kolejno łańcuchy $\alpha 1$ i $\alpha 2$ kolagenu typu I, stanowiącego główne strukturalne białko skóry, kości i ścięgien [4, 5, 9]. Zmutowane geny, w zależności od rodzaju mutacji, albo nie ulegają ekspresji, czego następstwem jest brak zmutowanego kolagenu, albo ulegają ekspresji prowadząc do syntezy kolagenu o nieprawidłowej strukturze i funkcji. Mutacje występujące w regionie promotora lub mutacje wprowadzające przedwczesne kodony terminacyjne w jednym z alleli genu COL1A1 mogą spowodować zahamowanie jego ekspresji („null allele”). Brak ekspresji zmutowanego allele i zmniejszenie syntezy kolagenu prawidłowego o około 50% stwierdzono u osób z najłagodniejszymi objawami OI typu I [1, 15].

Występowanie kolagenu zmutowanego wiąże się z cięższymi i śmiertelnymi objawami choroby charakterystycznymi dla OI typów II, III i IV [4, 5]. W związku z różnymi konsekwencjami mutacji, leczenie farmakologiczne i planowane strategie terapii genowej są również zasadniczo różne w przypad-

ku OI typu I i pozostałych typów choroby. Dlatego też bardzo istotne w diagnostyce typu choroby jest potwierdzenie obrazu klinicznego choroby za pomocą badań molekularnych.

Celem niniejszej pracy była ocena zastosowania detekcji „null allele” genu *COL1A1* oraz badań biochemicznych kolagenu syntetyzowanego przez fibroblasty skórne w diagnostyce OI typu I.

MATERIAŁ I METODY

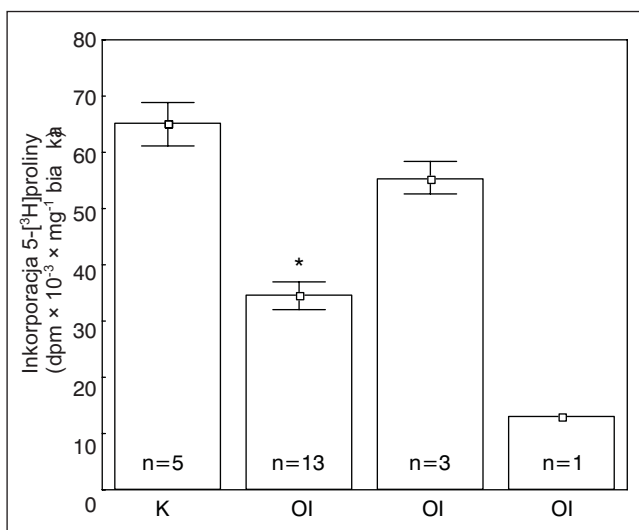
Analizie poddano 17 chorych ze zdiagnozowaną klinicznie OI typu I oraz 20 zdrowych (grupa kontrolna).

Analiza elektroforetyczna kolagenu. W celu analizy jakości kolagenu hodowle fibroblastów znakowano 50 $\mu\text{Ci/ml}$ L-[5- ^3H]proliną (o specyficzności 28 Ci/mmol, Amersham Corp.) w DMEM (Sigma) bez surowicy, zawierającym 50 $\mu\text{g/ml}$ kwasu askorbinowego (Sigma) przez 18 godzin [2]. Prokolagen wydzielany przez fibroblasty wytrącano 25-procentowym siarczanem amonu w obecności inhibitorów proteinaz. Kolagen uzyskiwano po trawieniu prokolagenu przy udziale pepsyny (50 $\mu\text{g/ml}$) przez 4 godziny w temperaturze 4°C i rozdzielano w 5-procentowym żelu poliakryloamidowym z 0,1-procentową solą sodową siarczanu dodecylu i 2-molowym mocznikiem [2]. Żele poddawano autofluorografii.

Ocena biosyntezy kolagenu. Biosyntezę kolagenu oznaczano przez inkubację fibroblastów w obecności 5 $\mu\text{Ci/ml}$ L-[5- ^3H]proliny (28 Ci/mmol) w tych samych warunkach jak poprzednio. Inkorporację izotopu do kolagenu mierzono poprzez trawienie białek bakteryjną kolagenazą z *Clostridium histolyticum* (Sigma) według metody *Peterkofsky* i wsp. [11].

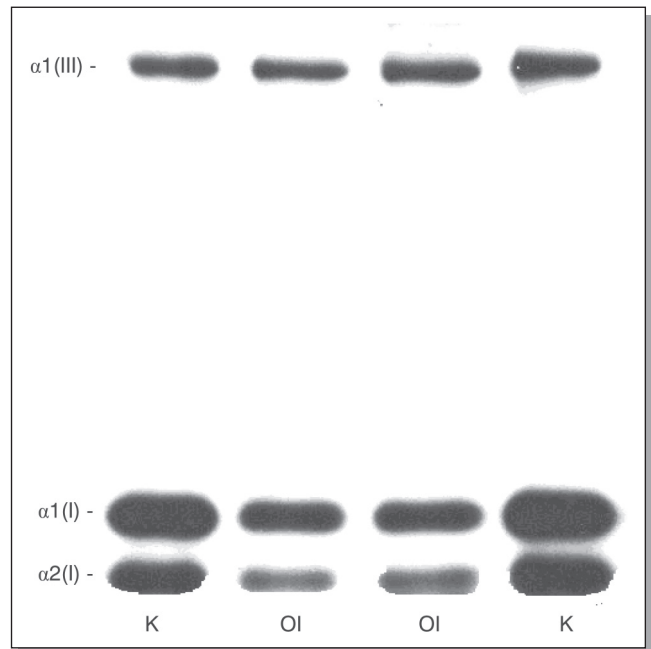
Detekcja „null allele”. DNA izolowano z krwi obwodowej przy użyciu kitu MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies). Polimorfizm insercji 4 pz w regionie 3'UTR oceniano metodą PCR [10]. W tym celu amplifikowano 500 ng genomowego DNA stosując następujące startery: 5' CCTTTCTGCTCCTTTCTCCA (sensowny) i 5' AGCAACACAGTTACACAAGG (antysensowny), oraz REDTaq[®]ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma). Zastosowano następujące warunki amplifikacji: wstępną denaturację przez 3 minuty w temperaturze 94°C, a następnie 25 cykli włączając etap denaturacji w temperaturze 94°C przez 1 minutę, hybridyzacji w temperaturze 56°C przez 1 minutę i syntezy w temperaturze 72°C przez 1 minutę.

RNA izolowano z fibroblastów lub krwi obwodowej stosując MasterPure™ RNA Purification Kit (Epicentre Biotechno-



Ryc. 1. Biosynteza kolagenu w fibroblastach osób z grupy kontrolnej (K) i chorych (OI). * $p < 0,05$ względem wartości kontrolnych

Fig. 1. Collagen biosynthesis in control (K) and OI fibroblasts (OI). * $p < 0,05$ compared to the control



Ryc. 2. Obraz elektroforetyczny kolagenu, rozdzielanego w 5-procentowym żelu poliakryloamidowym z 0,1-procentową solą sodową siarczanu dodecylu i 2-molowym mocznikiem w warunkach niedenaturujących, syntetyzowanego przez fibroblasty kontrolne (K) i chorych (OI). Autofluorogram przedstawia reprezentatywne wyniki badań u chorych, u których stwierdzono 50-procentowe zmniejszenie syntezy kolagenu

Fig. 2. 5% SDS-PAGE with 2-mol urea of collagen separated under nonreducing conditions, synthesized with control (K) and OI fibroblasts. Autofluorogram presents representative results of study in OI patients with reduced collagen synthesis by 50%

logies). Przed syntezą cDNA, próbki RNA (1 μg) były trawione DNA-zą (1 U) przez 15 minut w celu uniknięcia zanieczyszczenia genomowym DNA. Enzym inaktywowano przez dodanie 1 μl EDTA (25 mmol) i ogrzewanie w temperaturze 65°C przez 10 minut. W celu syntezy cDNA do mieszaniny reakcyjnej dodawano odwrotną transkryptazę (Enhanced Avian Reverse Transcriptase, Sigma) – U/ μl , starter oligo (dT)₂₃ – 3,5 μmol , NTP – 10 mmol, oraz inhibitor RN-azy (U/ μl) i całość inkubowano przez 50 minut w temperaturze pokojowej. Uzyskany cDNA amplifikowano stosując startery i warunki podane dla genomowego DNA w reakcji PCR.

Produkty PCR i RT PCR rozdzielano w 6-procentowym żelu poliakryloamidowym z 6-molowym mocznikiem w warunkach denaturujących, a do dokumentacji żele wybarwiają metodą srebrową.

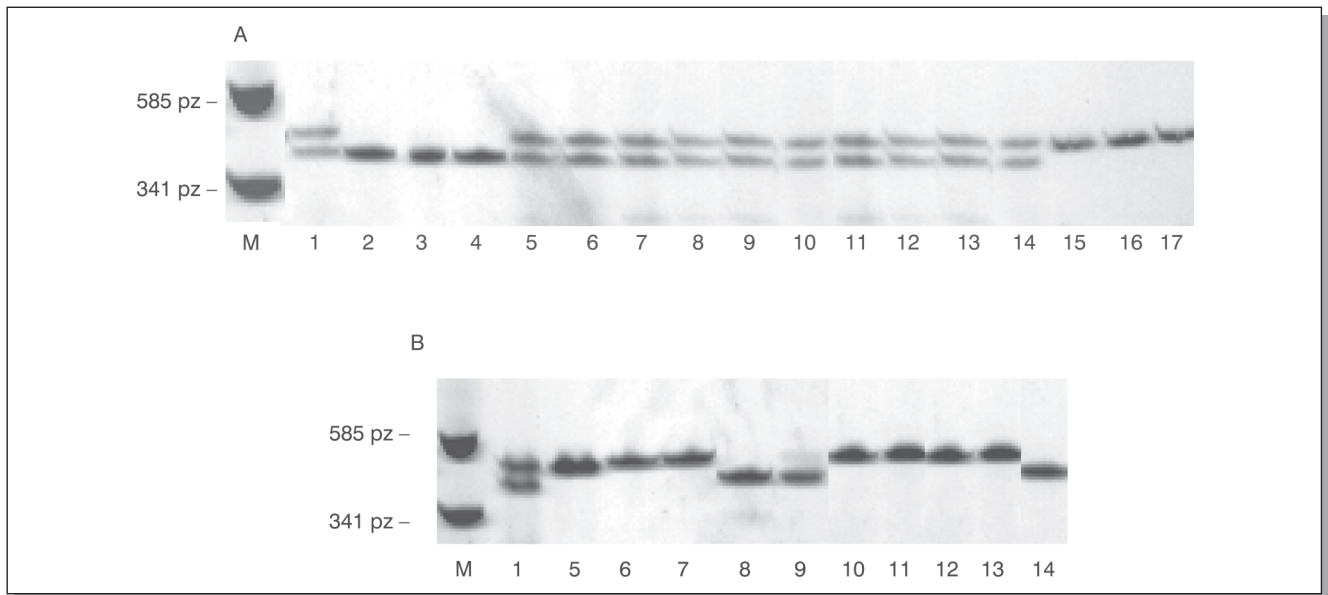
Wyniki przedstawiające syntezę kolagenu przez fibroblasty poddano analizie statystycznej przy użyciu testu t-Studenta. Za znamienne statystycznie przyjmowano różnice między wartościami średnimi przy $p < 0,05$.

WYNIKI

Pomiar biosyntezy kolagenu przeprowadzono w fibroblastach skórnych inkubowanych przez 24 godziny w DMEM bez surowicy w obecności 50 $\mu\text{g/ml}$ kwasu askorbinowego i 5 μl 5- ^3H]proliny zgodnie z metodą *Peterkofsky* i wsp. [11]. W 17-osobowej grupie chorych ze zdiagnozowanym klinicznie typem I, u 13 stwierdzono zmniejszenie syntezy kolagenu o około 50%, u trzech o około 15%, a u jednego o 80% (ryc. 1).

Analiza elektroforetyczna kolagenu wydzielanego przez fibroblasty chorych ze zredukowaną syntezą kolagenu o około 50% wskazuje na zmniejszenie ilościowe łańcuchów kolagenowych $\alpha 1$ i $\alpha 2$ kolagenu typu I przy porównywalnej ilości podjednostek $\alpha 1$ kolagenu typu III (ryc. 2).

Większość mutacji wykrytych w OI typu I powoduje zmniejszenie lub brak ekspresji jednego allele genu *COL1A1* [1,



Ryc. 3. Obraz elektroforetyczny uzyskany po rozdzieleniu produktów PCR genomowego DNA (A) i cDNA (B) chorych w 6-procentowym żelu poliakryloamidowym z 6-molowym mocznikiem w warunkach denaturujących, M - marker wielkości DNA

Fig. 3. 6% SDS-PAGE of genomic (A) and cDNA (B) PCR products of OI patients, separated under reducing conditions with 6 mol urea, M - molecular size marker

15], dlatego przeprowadzono badanie materiału genetycznego na obecność „null allele”, wykorzystując polimorfizm insercji 4 pz (AGCA) występujący w regionie 3' nie ulegającym translacji (UTR) [10]. Z krwi 17 chorych i 20 zdrowych osób izolowano DNA i amplifikowano fragment zawierający polimorfizm insercji 4 pz, a produkty PCR rozdzielano w 6-procentowym żelu poliakryloamidowym z 6-molowym mocznikiem w warunkach denaturujących. Jak pokazuje rycina 3A wśród 17 badanych, 11 było heterozygotycznych i 3 homozygotycznych pod względem badanego polimorfizmu, a u 3 badanych polimorfizm nie wystąpił. U chorych heterozygotycznych przeprowadzono reakcję RT PCR, a produkty tej reakcji rozdzielono w żelu w tych samych warunkach. Obecność transkryptów obu alleli genu *COL1A1* stwierdzono u jednego badanego (nr 1), znacznie zmniejszoną ilość jednego allela u badanego nr 9, natomiast u pozostałych badanych wykazano obecność tylko jednego allela („null allele”; ryc. 3B). W 14-osobowej grupie kontrolnej heterozygotycznej pod względem polimorfizmu, wykazano obecność transkryptów obu alleli genu.

Podsumowanie wyników uzyskanych z badań biochemicznych kolagenu i badań molekularnych materiału genetycznego przedstawiono w tabeli 1. Stosując polimorfizm genu *COL1A1* (insercji 4 pz w regionie 3'UTR) „null allele” wykryto u 9 badanych, co pozwala na potwierdzenie u nich diagnostyki klinicznej OI typu I. U siedmiu badania molekularne mRNA (występowanie „null alleli”) potwierdziły badania biochemiczne kolagenu (zmniejszenie syntezy kolagenu o około 50%). U pozostałych dwóch badanych, u których również wykryto „null allele” badania ilościowe kolagenu wykazały zmniejszenie syntezy kolagenu o około 15% i 80%. Z kolei u jednego badanego ze zmniejszoną syntezą kolagenu o około 50% wykazano występowanie obu transkryptów alleli genu *COL1A1*.

Tabela 1. Zestawienie wyników analizy syntezy kolagenu i oznaczenia „null allele” u chorych

Table 1. Summarized results of collagen synthesis analysis and detection of „null allele” in OI patients

Parametr	Zmniejszenie kolagenu		
	50%	15%	80%
Liczba badanych	13	3	1
Liczba heterozygot wobec insercji 4 pz	8	2	1
Występowanie obu alleli cDNA	1	1	
Detekcja „null allele”	7	1	1

OMÓWIENIE

Powszechne stosowanie badań ultrasonograficznych spowodowało, że obecnie OI typu II i czasami III wykrywa się już w okresie prenatalnym [3]. Rozpoznanie OI typu II w USG jest możliwe dzięki klasycznym objawom, takim jak: liczne złamania i wyraźne skrócenia kości długich, złamania żeber, miękka podatna na ucisk czaszka i hipoechogenne kości. Wymienione cechy są w sposób pewny rozpoznawane ultrasonograficznie dopiero po 20 tygodniu ciąży. Rozpoznanie ultrasonograficzne typu III i IV OI zwykle jest możliwe, mimo tego, że pierwsze objawy ujawniają się w trzecim trymestrze ciąży. Głównym objawem stwierdzanym ultrasonograficznie w tym czasie jest łukowate wygięcie kości długich, ale o prawidłowej długości i stopniu mineralizacji. Objawy choroby w przypadku jej form łagodniejszych ujawniają się dopiero w okresie niemowlęcym lub w dzieciństwie.

W diagnostyce OI obok badań klinicznych niezwykle ważne są badania biochemiczne kolagenu oraz identyfikacja mutacji odpowiedzialnych za chorobę. Komórki kosmówki wytwarzają kolagen porównywalny do kolagenu wytwarzanego przez fibroblasty i biopsja kosmówki pozwala na ustalenie rozpoznania w 10-11 tygodniu ciąży, a więc wcześniej niż w badaniu ultrasonograficznym [12].

W przypadku osób z OI typu I, bardzo trudne jest postawienie jednoznacznej diagnozy, ponieważ objawy kliniczne są podobne do OI typu IV. O ile mutacje występujące w OI typu II, III i IV mogą być zidentyfikowane na poziomie cDNA, w przypadku OI typu I brak ekspresji zmutowanego allela wyklucza takie podejście. Konieczne są badania przesiewowe genomowego DNA, co ze względu na wielkość genów (*COL1A1* – 18 000 pz, *COL1A2* – 38 000 pz) jest procesem bardzo kosztownym i pracochłonnym. Ponieważ w OI typu I mutacje w regionie promotora lub mutacje wprowadzające przedwczesne kodony terminacyjne w jednym z alleli genu *COL1A1* mogą spowodować zahamowanie jego ekspresji, do badania ekspresji alleli genu mogą służyć polimorfizmy genu występujące w obszarze końca 3'.

W badanej 17-osobowej grupie z rozpoznaniem klinicznie typem I OI, badanie molekularne na obecność „null allele” można było wykonać u 11 osób heterozygotycznych pod względem polimorfizmu. Badania biochemiczne kolagenu wskazujące na zmniejszenie kolagenu o około 50% zostały potwierdzone wykryciem „null allele” u 7 osób. Jednakże „null allele” wykryto również u 2 osób, u których synteza kolagenu

była zmniejszona o 15 i o 80%. U osoby z 80-procentowym zmniejszeniem syntezy kolagenu oprócz wystąpienia „null alleli” dodatkowym czynnikiem odpowiadającym za obniżenie syntezy kolagenu może być obniżenie aktywności prolidazy i ekspresji czynników regulujących jej aktywność [8]. Natomiast trudno jest wytłumaczyć zmniejszenie syntezy kolagenu o około 15% u osoby z wykrytym jednym allelem niefunkcyjnym. Przyczyną tego zjawiska (obniżenia syntezy kolagenu nie o połowę, jak się spodziewano) może być podwyższona synteza kolagenu. Może to być również wynikiem zbyt małej liczby badanych w grupie kontrolnej niedobranym wiekowo do każdego chorego, od których uzyskano hodowle fibroblastów.

Drugi przykład niezgodności wyników analizy biochemicznej kolagenu i badań materiału genetycznego dotyczy osoby, u której wykryto dwa funkcjonalne allele, a synteza kolagenu była zmniejszona o połowę. W tym przypadku redukcja kolagenu może być związana z wystąpieniem mutacji powodujących defektywną translację zmutowanego mRNA lub zapobiegających inkorporacji zmutowanych łańcuchów w potrójną helisę.

Właściwa diagnostyka typu OI jest bardzo ważna w wyborze sposobu leczenia, ponieważ w leczeniu farmakologicznym chorych z OI typu I oprócz bisfosfonianów [13] można również zastosować czynniki stymulujące wybiórczo biosyntezę kolagenu [7] lub uzupełnienie allele nieaktywnego w terapii genowej [6, 13] w przeciwieństwie do OI typu II, III i IV, gdzie konieczne jest wyeliminowanie lub zmniejszenie ekspresji genu zmutowanego.

WNIOSKI

1. Zastosowanie polimorfizmu insercji 4 pz w regionie 3'UTR genu *COL1A1* pozwoliło na wykrycie „null alleli” u 9 spośród 17 chorych ze zdiagnozowanym klinicznie typem I OI.
2. U trzech badanych wyniki badań ilościowych kolagenu i detekcji „null alleli” były niezgodne, co wskazuje na konieczność wykonania badań kompleksowych w celu postawienia ostatecznej diagnozy.

PIŚMIENNICTWO

1. Barsh G.S., David K.E., Byers P.H.: *Type I osteogenesis imperfecta: a nonfunctional allele for pro alpha 1(I) chains of type I procollagen*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79, 3838-3842.
2. Bonadio J., Holbrook K.A., Gellinas R.E. i wsp.: *Altered triple helical structure of type I procollagen in lethal perinatal osteogenesis imperfecta*. J. Biol. Chem., 1985, 260, 1734-1742.
3. Bronshtein M., Weiner Z.: *Anencephaly in a fetus with osteogenesis imperfecta: Early diagnosis by transvaginal sonography*. Prenat. Diagn., 1992, 12, 831-839.
4. Byers P.H.: *Osteogenesis imperfecta*. In: *Connective Tissue and its heritable disorders: molecular, genetic and medical aspects*, (eds.: Royce P.M., Steinmann B.). Wiley-Liss, New York, 1993, 317-350.
5. Gajko-Galicka A.: *Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans*. Acta Biochim. Pol., 2002, 49, 433-441.
6. Gajko-Galicka A.: *Próby zastosowania terapii genowej w dominującej chorobie tkanki łącznej – wrodzonej łamliwości kości*. Post. Biochem., 2003, 49, 18-25.
7. Galicka A., Nazaruk J.: *Stimulation of collagen biosynthesis by flavonoid glycosides in skin fibroblasts of osteogenesis imperfecta type I and the potential mechanism of their action*. Intern. J. Molec. Medicine, 2007, 20, 889-895.
8. Galicka A., Surażyński A., Wolczyński S. i wsp.: *Phenotypic variability in a daughter and father with mild osteogenesis imperfecta correlated with collagen and prolidase levels in cultured skin fibroblasts*. Ann. Clin. Biochem., 2005, 42, 80-84.
9. Kuivaniemi H., Tromp G., Prockop D.J.: *Mutations in collagen genes. Causes of rare and some common diseases in humans*. FASEB J., 1991, 5, 2052-2060.
10. Nuytink L., Coppin C., De Paepe A.: *A four base pair insertion polymorphism in the 3' untranslated region of the COL1A1 gene is highly informative for null-allele testing in patients with osteogenesis imperfecta type I*. Matrix Biol., 1998, 16, 349-352.
11. Peterkofsky B., Chojkier M., Bateman J.: *Determination of collagen synthesis in tissue and cell culture system*. In: *Immunochemistry of the Extracellular Matrix* (eds.: Furthmay M.). CRC Press, Boca Raton, FL, 1982, 19-47.
12. Raghunath M., Steinmann B., Delozier-Blanchet C. i wsp.: *Prenatal diagnosis of collagen disorders by direct biochemical analysis of chorionic villus biopsies*. Pediatric Res., 1994, 36, 441-448.
13. Rauch F., Glorieux F.H.: *Osteogenesis imperfecta*. Lancet, 2004, 363, 1377-1385.
14. Silience D.O., Rimoin D.L.: *Classification of osteogenesis imperfecta*. Lancet, 1978, 13, 1041-1042.
15. Slayton R.L., Deschenes S.P., Willing M.C.: *Nonsense mutations in the COL1A1 gene preferentially reduce nuclear levels of mRNA but not hn RNA in osteogenesis imperfecta type I cell strains*. Matrix Biol., 2000, 19, 1-9.

Otrzymano: 3 czerwca 2008 r.

Adres: Anna Galicka, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Zakład Chemii Medycznej, 15-089 Białystok, ul. Mickiewicza 2a, tel.: 085 748 56 74, fax: 085 748 54 16, e-mail: angajko@umw.edu.pl