

Leber 遗传性视神经萎缩病外显率的影响因素研究进展

仲俊维, 陈 鼎, 余新平, 童 绎, 谷 峰

基金项目: 国家科技部 973 项目 (No. 2013CB967502); 国家自然科学基金项目 (No. 81201181/H1818); 浙江省卫生厅省部共建项目 (No. WKJ2013-2-023); 温州医科大学人才启动项目 (No. QTJ12011)

作者单位: (325027) 中国浙江省温州市, 温州医科大学眼视光学院

作者简介: 仲俊维, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼科遗传学。
通讯作者: 谷峰, 博士, 研究员, 硕士研究生导师, 基因修复与干细胞研究组组长, 研究方向: 基因修复新工具研究、遗传病基因突变和致病机理研究、人类胚胎干细胞定向分化为眼内细胞研究。gufenguw@gmail.com

收稿日期: 2015-06-29 修回日期: 2015-10-22

Progress of the factors influencing the penetrance of Leber's hereditary optic neuropathy

Jun-Wei Zhong, Ding Chen, Xin-Ping Yu, Yi Tong, Feng Gu

Foundation items: Chinese National Program on Key Basic Research Project (973 Program, No. 2013CB967502); National Natural Science Foundation of China (No. 81201181/H1818); Zhejiang Provincial & Ministry of Health Research Fund for Medical Sciences (No. WKJ2013-2-023); Wenzhou Medical University PI Starting Grant (No. QTJ12011)

School of Ophthalmology and Optometry, Eye Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Feng Gu. School of Ophthalmology and Optometry, Eye Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China. gufenguw@gmail.com

Received: 2015-06-29 Accepted: 2015-10-22

Abstract

• Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) is a maternally inherited blinding disease. The clinical phenotype of LHON is the degeneration of retinal ganglion cells (RGCs) and a progressive degeneration of the optic nerve. Three common mutations, G11778A, T14484C and G3460A are responsible for over 90% of cases. Differences in penetrance indicate the additional modifier genes influencing penetrance of the mitochondrial DNA mutation for LHON patients. Different types of mitochondrial haplogroups, environmental factors also have different effects on the penetrance of the mitochondrial DNA mutations. In the present paper, here the progress of the factors influencing the penetrance of Leber's hereditary optic neuropathy will be summarized.

• **KEYWORDS:** Leber's hereditary optic neuropathy; penetrance; influencing factors

Citation: Zhong JW, Chen D, Yu XP, *et al*. Progress of the factors influencing the penetrance of Leber's hereditary optic neuropathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(11):1888-1891

摘要

Leber 遗传性视神经萎缩病 (Leber's Hereditary Optic Neuropathy, LHON) 的发生是由于视网膜神经节细胞死亡进而导致视神经萎缩, 表现为急性或亚急性双眼视力下降, 是目前研究最为广泛的由线粒体基因突变引起的母系遗传病之一。超过 90% 的 LHON 是由线粒体基因组的 3 个原发致病突变之一所致, 即 G11778A、T14484C 和 G3460A。LHON 临床表型不同, 外显率的不同以及发病率的性别差异都提示可能存在其他相关基因 (核基因和线粒体基因组) 在其发挥着重要作用。本文主要对近二十年来该病的分子遗传学, 特别是可能的外显率影响因素的研究进展作一阐述, 为该病预防与临床治疗提供参考。

关键词: LHON; 外显率; 影响因素

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2015.11.13

引用: 仲俊维, 陈鼎, 余新平, 等. Leber 遗传性视神经萎缩病外显率的影响因素研究进展. 国际眼科杂志 2015;15(11):1888-1891

0 引言

Leber 遗传性视神经病是一种罕见的线粒体疾病, 呈急性或亚急性发病, 表现为突发的无痛性视力减退。多为双眼先后发病, 单侧眼发病后, 对侧眼在随后的数周内发病。患者出现具有特征性的临床表现如视野中心暗点, 色觉障碍, 视盘旁毛细血管扩张, 视网膜动静脉不同程度迂曲扩张等。发病年龄通常在 18~30 (平均 25~29) 岁, 但范围可从 1~80 岁。LHON 病情进展迅速, 在多数病例中视力丧失是主要临床表现, 但也可表现有其他神经异常如心律失常、心脏传导阻滞、外周神经病变、运动失调、肌张力障碍、痉挛、小脑性共济失调、多发性硬化样表现及罕见的神经退行性病变^[1]。

据报道, 有超过 90% 的 LHON 与 mtDNA (线粒体 DNA) 的 3 个原发致病突变 (G11778A、T14484C、G3460A) 有关, 三个突变位点分别位于线粒体的 ND1、ND4 和 ND6 基因, 均编码线粒体呼吸链复合物 I 亚单位^[2], G11778A 是 LHON 患者最常见的致病突变^[3]。部分 LHON 患者缺乏这 3 种原发致病突变, 但基因分析可发现 mtDNA 其他致病突变, 如 G3733A、C4171A、T10663C、G14459A、C14482A/G、A14495G、C14568T 等。此外, 部分携带有 3 种主要原发致病突变之一的患者还合并 mtDNA 其他继发突变^[4]。

目前, LHON 的 3 个主要原发致病突变 (G11778A、T14484C、G3460A) 已被证实, 但对影响其外显率和表达的因素尚缺乏深入的了解。本文就近 20a 来发现的影响 LHON 的 3 个主要原发致病突变外显率及表达的因素作如下阐述。

1 mtDNA 遗传背景对 LHON 表型影响

mtDNA 的单倍群类型是由遗传学上 mtDNA 的差异定义而来,由于 mtDNA 具有突变率高、母系遗传等特点,使 mtDNA 单倍群类型成为区分不同地区人群的特定遗传标记。国内外研究及相关性分析表明,mtDNA 的单倍群类型可以影响 LHON 的发病。以下是近年来关于 mtDNA 单倍群类型对 LHON 的 3 个原发致病突变 (G11778A、T14484C、G3460A) 发病影响的研究。

携带有 G11778A 及 T14484C 突变的 LHON 个体外显率与单倍群 J 有关,研究表明单倍群 J 增加了突变基因的外显率,G11778A 主要与单倍群 J2 相关,T14484C 则主要与单倍群 J1 相关。相反,若携带 G11778A 突变个体属于单倍群 H,发病率降低。携带 T14484C 突变个体属于单倍群 M9、M10、N9,发病率增加^[5-6]。单倍群 W 有可能增加了携带 G11778A 突变个体的发病风险。单倍群 A、B、J (J1 及 J2)、K、M、W 则增加了携带 G3460A 突变个体的发病风险^[2,7-10]。单倍型内特异突变 stRNA [(Ser (AGY)) A12223G, tRNA (Thr) G15927A, tRNA (Glu) A14693G 可能提高了携带突变 G3460A 个体视力丧失的外显率^[8]。也有报道指出欧洲人种内单倍型 H、I、J、K、T、U、V、W 和 X 对突变 G3460A 外显率无影响^[6]。单倍型 M7b1*2 及 M8a 对携带突变 G11778A 的个体疾病外显率也会产生影响^[11],单倍型 B5a1 有可能增加突变 G11778A 致病风险^[3]。单倍型 M9a 中特定突变 ND1 T3394C 对突变 G11778A 表达可能起到修饰作用^[12]。

有体外试验证实属于单倍型 J 并携带 G11778A 或 T14484C 突变的细胞对 2,5-HD 诱导细胞死亡的敏感性增加,而携带有 G11778A 突变并属于单倍群 H 或 U 的细胞生存能力增强。这项研究表明 mtDNA 遗传背景可能与环境因素共同作用导致疾病的发生^[13]。

2 合并线粒体其他基因突变对 LHON 表型影响

2.1 可能影响 G11778A 突变外显率的线粒体基因突变

可能影响 G11778A 突变外显率的线粒体基因突变有 A1555G^[14]、T14502C^[15]、G6480A、T12811C、A15395G^[16]、G11696A^[17]、A4435G^[18]。Khan 等在对 2 个同时携带相同突变 (G11778A 和 A1555G) 但单倍群亚型不同 (分别为 M5a 和 U2e1) 的 LHON 印度家系研究发现临床症状 (视力损害) 的外显率不同,而 A1555G 突变被认为与氨基糖苷类抗生素导致的无痛性听力丧失有关,家系内无听力损害和 LHON 临床表型的差异提示着其他调控因素存在^[14]。虽然携带 A1555G 突变增加了患者听力损害的易感性,但若此印度家系患者若未接触氨基糖苷类抗生素则并不会导致听力损害,此研究不能表明 A1555G 突变对 G11778A 突变外显率产生影响。

Zhang 等^[15]对 4 个属于亚洲单倍群 M10a 及 M7c2 并携带原发突变 G11778A 以及合并突变 T14502C 的中国汉族 LHON 家系研究发现 T14502C 突变导致 ND6 第 58 位高度保守的异亮氨酸被缬氨酸取代,导致这 4 个家系的疾病外显率和表型严重程度高于仅携带原发突变 G11778A 的 11 个中国家系,这提示 T14502C 突变在 LHON 发病中与原发突变 G11778A 起协同作用,加重了疾病的严重程度。Cai 等^[16]对 1 个携带同质性原发突变 G11778A 和其他 44 个属于亚洲单倍群 M7b 内特异突变的具有较高外显率和家系成员视力损害程度不等的 5 代中国汉族 LHON 家系研究发现,其他突变 CO1 G6480A、ND5

T12811C 和 Cytb A15395G 位于蛋白中高度保守的位置,提示这些突变可能在疾病的发生中起着协同作用影响着疾病的外显率和表型的严重程度。Qu 等^[17]对一个携带原发突变 G11778A 和其他 33 个属于亚洲单倍群 D4 内特异突变的具有起病年龄和视力损害程度差异明显的 4 代中国 LHON 家系的研究表明,G11696A 突变导致 ND4 蛋白跨膜区 313 位异亮氨酸被缬氨酸取代,进而推测此突变在疾病发生中起到了协同作用,加重了疾病的严重程度。他对一个携带同质原发突变 G11778A 和其他 35 个属于亚洲单倍群 D5 内特异突变的具有起病年龄和视力丧失程度差异明显的 3 代中国 LHON 家系研究表明 A4435G 突变 (此突变临近反密码子的 3' 端,在 tRNAMet 高度保守的第 37 位 (A37),该调控区域 (A37) 保证反密码子识别的高保真性以及 tRNAS 结构和功能稳定)。同时携带 G11778A 和 A4435G 突变导致细胞内 tRNAMet 稳态水平降低,A4435G 突变导致线粒体 tRNA 代谢紊乱,增加 LHON 的外显率和疾病严重程度^[18]。Wang 等^[19]对携带原发突变 G11778A 且同属于单倍群 G2a 的两个外显率截然不同的中国 LHON 家系的研究表明 G13708A 突变并不会影响疾病的外显率和表型,此突变也存在于正常中国人群。Li 等^[20]对一个中国家系的研究发现携带 G11778A 突变的个体若同时携带 A15951G 突变比仅携带 G11778A 突变患者的细胞中 tRNA (Thr) 稳态水平显著减少,导致线粒体内 tRNA 代谢紊乱,加重 G11778A 导致的线粒体功能紊乱,对携带原发突变 G11778A 的 LHON 患者的疾病外显率和表型起到调控作用,增加疾病外显率和疾病的严重程度。Phasukkijwatana 等^[21]对来自泰国的 30 个携带有原发突变 G11778A 的 LHON 家系研究发现疾病的表型具有一定的种族差异性,这些泰国 LHON 患者的疾病特点与来自加拿大和日本的患者存在着差异。这些泰国家系男患者患病率与女患者患病率的比值较低 (2.6:1),而携带 G11778A 突变的血液异质性较高,约 37%。这些泰国患者中线粒体突变的异质性影响了疾病的表型,但并未改变发病年龄。这些泰国家系 LHON 外显率各不相同,同一家系其不同分支疾病外显率也存在差异。在对存活者的研究中发现合并 G3316A 和 C3497T 线粒体突变对原发突变 G11778A 疾病的发生具有协同的有害效应,使这些泰国患者疾病发生的年龄提早。

2.2 可能影响 T14484C 突变外显率的线粒体基因突变

可能影响 T14484C 突变外显率的线粒体基因突变有 T14502C^[22]、G10680A^[23]。Zhang 等^[22]通过对一个具有完全外显率的中国 LHON 家系的研究发现,该家系患者具有不同于普通 LHON 患者的临床特征,基因测序发现该家系存在原发突变 T14484C 并且此原发突变合并临近位点突变 T14502C、T14502C 导致 ND6 蛋白中第 58 位异亮氨酸变为缬氨酸,此突变存在于该家系内所有患者,但不存在于未受累 4 个家庭成员以及 200 名对照个体。T14502C 突变可能在原发突变 T14484C 的致病过程中起协同作用,两个突变共存解释了该家系患者疾病的完全外显率,不存在显著患病性别差异及视力恢复的困难性。同样 Yang 等^[23]对一个中国 LHON 家系 (合并其他 27 个属于东亚单倍群 B4b'd 的特异突变) 的研究发现一个新突变 G10680A 导致 ND4L 中的 71 位高度保守的丙氨酸被苏氨酸取代,而在未受累的家庭成员和 100 个正常对照个体中未发现。这提示 G10680A 突变可能在原发突变 T14484C

的致病过程中起到协同作用,导致该家系患者具有完全疾病外显率。

3 核基因组对 LHON 表型影响

目前为止,尚未发现任何一个核调控基因的存在,但是数个敏感的区域被发现,这些区域表现出与 X 染色体相关的基因变异。目前,一个位于 Xp21-Xq21 的视神经疾病易感位点被报道。通过对属于单倍型 J 并携带有同质突变 G11778A 的一个大的巴西家系进行 X 染色体连锁分析证实 Xq25-27.2 与 LHON 易感性相关^[24]。

Giordano 等^[25]对 PPARGC1A (PGC-1 α), PPARGC1B (PGC-1 β), TP53 (p53), TFAM, PARL 的编码基因的 9 个有文献报道与疾病相关的 SNP 进行研究发现只有 PARL 基因的两个 SNP 在一个意大利 LHON 家族中存在着显著关联,而其余被认为可能参与核调控作用 SNP 与疾病不存在关联。

PARL 基因 (Presenilins - associated rhomboid - like protein) 在 LHON 发病过程中可能起调控作用。在对泰国 LHON 患者的研究中 PARL 基因被认为对 LHON 的表达起到调控作用,研究表明,PARL 基因的变异是 LHON 在发病机理过程中影响其外显率的调控机制之一^[26]。

OPA1 (Optic Atrophy 1) 基因编码的蛋白为线粒体内源发动蛋白,属于线粒体塑形蛋白,OPA1 基因作为 DOA 的主要基因座,在线粒体形态结构、呼吸作用和细胞凋亡中起重要作用^[27]。Abu - Amero 在对 62 例携带有 G11778A 突变的 LHON 患者进行了全基因组表达谱分析,在患者中发现了 137 个表达上调的基因以及 152 个表达下调的基因。OPA1 基因被发现在携带有 G11778A 突变的 LHON 患者中表达量较对照个体明显下调^[28]。OPA1 基因在携带有 G11778A 突变的 LHON 患者中的表达下调提示 OPA1 基因可能作为核调控基因在疾病发生的病理生理方面起协同作用,加重疾病的严重程度。

4 mtDNA 的杂合型及组织间的差异性

每个细胞可能含有数千个 mtDNA 分子,已经发现在部分 LHON 患者中存在杂合型 mtDNA 分子,即突变型 mtDNA 分子和野生型 mtDNA 分子共存于一个细胞中。Holt 等发现突变型 mtDNA 所占的比例与 LHON 疾病的严重性具有一定的相关性,他发现所有表现出临床症状的患者其突变型 mtDNA 所占的比例超过 96%,而所占比例在 80% 以下的男性其临床症状不明显。Holt 的发现被 Vilkki 采用 Southern 印记、PCR、位点特异性寡聚核苷酸探针杂交等实验技术充分证实。Lott 观察到某一 LHON 家系内一男一女突变型 mtDNA 几乎为 100%,但视力正常,而另一家庭成员突变型 mtDNA 只占 71% 却视力丧失。Lott 在研究中比较了携带杂合型 mtDNA 的成员头发、血细胞内线粒体突变的含量,发现存在较大的差异,一患者血细胞内 mtDNA 几乎全部为突变型,而头发内 mtDNA 野生型占优势^[29]。这表明,在某一携带有相同 mtDNA 突变的 LHON 家系中,突变型 mtDNA 所占比例以及在视神经内含量差异性有可能成为同一家系不同成员疾病表型差异的重要原因。

5 环境因素

LHON 患者男性明显多于女性,世界上多数地区包括经济发达地区以及经济落后地区,男性的吸烟及饮酒的比例都远远高于女性,因此,吸烟、酗酒有可能增加了 LHON 患者发病的可能性^[25]。有研究认为,每日吸烟的数量以

及吸烟的年数都与罹患 LHON 疾病的症状相关^[30]。尽管酒精可能影响患者的症状严重程度,但其没有吸烟那么明显且没有统计学的显著差异^[31]。

6 展望

LHON 目前尚无有效的治疗方法,许多影响疾病表型的因素也悬而未决。疾病外显率的不同以及性别差异提示着可能存在核基因的调控,环境因素,性激素也可能参与了疾病的病理生理过程。随着分子生物学技术的不断进步,该病的发病机理将得到更加深入的阐释,进一步明确基因型和表型的关系,阐明影响线粒体突变基因外显率的因素,为以后疾病的基因治疗奠定基础。

参考文献

- 1 Piotrowska A, Korwin M, Bartnik E, et al. Leber hereditary optic neuropathy - historical report in comparison with the current knowledge. *Gene* 2015;555(1):41-49
- 2 Tonska K, Kodron A, Bartnik E. Genotype-phenotype correlations in Leber hereditary optic neuropathy. *Biochim Biophys Acta* 2010;1797(6-7):1119-1123
- 3 Kaewsutthi S, Phasukkijwatana N, Joyjinda Y, et al. Mitochondrial haplogroup background may influence Southeast Asian G11778A Leber hereditary optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(7):4742-4748
- 4 Shu L, Zhang YM, Huang XX, et al. Complete mitochondrial DNA sequence analysis in two southern Chinese pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy revealed secondary mutations along with the primary mutation. *Int J Ophthalmol* 2012;5(1):28-31
- 5 Zhang J, Zhao F, Fu Q, et al. Mitochondrial haplotypes may modulate the phenotypic manifestation of the LHON-associated m. 14484T>C (MT-ND6) mutation in Chinese families. *Mitochondrion* 2013;13(6):772-781
- 6 Torroni A, Petrozzi M, D'Urbano L, et al. Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am J Hum Genet* 1997;60(5):1107-1121
- 7 Hudson G, Carelli V, Spruijt L, et al. Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA - haplogroup background. *Am J Hum Genet* 2007;81(2):228-233
- 8 Ji Y, Liang M, Zhang J, et al. Mitochondrial haplotypes may modulate the phenotypic manifestation of the LHON - associated ND1 G3460A mutation in Chinese families. *J Hum Genet* 2014;59(3):134-140
- 9 Shafa Shariat Panahi M, Houshmand M, Tabassi AR. Mitochondrial D-loop variation in leber hereditary neuropathy patients harboring primary G11778A, G3460A, T14484C mutations: J and W haplogroups as high-risk factors. *Arch Med Res* 2006;37(8):1028-1033
- 10 Howell N, Herrnstadt C, Shults C, et al. Low penetrance of the 14484 LHON mutation when it arises in a non-haplogroup J mtDNA background. *Am J Med Genet A* 2003;119A(2):147-151
- 11 Ji Y, Zhang AM, Jia X, et al. Mitochondrial DNA haplogroups M7b12 and M8a affect clinical expression of leber hereditary optic neuropathy in Chinese families with the m. 11778G->a mutation. *Am J Hum Genet* 2008;83(6):760-768
- 12 Zhang M, Zhou X, Li C, et al. Mitochondrial haplogroup M9a specific variant ND1 T3394C may have a modifying role in the phenotypic expression of the LHON-associated ND4 G11778A mutation. *Mol Genet Metab* 2010;101(2-3):192-199
- 13 Ghelli A, Porcelli AM, Zanna C, et al. The background of mitochondrial DNA haplogroup J increases the sensitivity of Leber's hereditary optic neuropathy cells to 2,5-hexanedione toxicity. *PLoS One* 2009;4(11):7922
- 14 Khan NA, Govindaraj P, Jyothi V, et al. Co-occurrence of m.

1555A>G and m.11778G>A mitochondrial DNA mutations in two Indian families with strikingly different clinical penetrance of Leber hereditary optic neuropathy. *Mol Vis* 2013;19:1282–1289

15 Zhang J, Zhou X, Zhou J, *et al* . Mitochondrial ND6 T14502C variant may modulate the phenotypic expression of LHON – associated G11778A mutation in four Chinese families. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;399(4) : 647–653

16 Cai W, Fu Q, Zhou X, *et al* . Mitochondrial variants may influence the phenotypic manifestation of Leber's hereditary optic neuropathy – associated ND4 G11778A mutation. *J Genet Genomics* 2008; 35 (11) :649–655

17 Qu J, Li R, Zhou X, *et al* . Cosegregation of the ND4 G11696A mutation with the LHON – associated ND4 G11778A mutation in a four generation Chinese family. *Mitochondrion* 2007;7(1–2) :140–146

18 Qu J, Li R, Zhou X, *et al* . The novel A4435G mutation in the mitochondrial tRNAMet may modulate the phenotypic expression of the LHON – associated ND4 G11778A mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(2) :475–483

19 Wang HW, Jia X, Ji Y, *et al* . Strikingly different penetrance of LHON in two Chinese families with primary mutation G11778A is independent of mtDNA haplogroup background and secondary mutation G13708A. *Mutat Res* 2008;643(1–2) :48–53

20 Li R, Qu J, Zhou X, *et al* . The mitochondrial tRNA(Thr) A15951G mutation may influence the phenotypic expression of the LHON – associated ND4 G11778A mutation in a Chinese family. *Gene* 2006;376 (1) :79–86

21 Phasukkijwatana N, Chuenkongkaew WL, Suphavilai R, *et al* . The unique characteristics of Thai Leber hereditary optic neuropathy: analysis of 30 G11778A pedigrees. *J Hum Genet* 2006;51(4) :298–304

22 Zhang S, Wang L, Hao Y, *et al* . T14484C and T14502C in the

mitochondrial ND6 gene are associated with Leber's hereditary optic neuropathy in a Chinese family. *Mitochondrion* 2008;8(3) :205–210

23 Yang J, Zhu Y, Tong Y, *et al* . The novel G10680A mutation is associated with complete penetrance of the LHON/T14484C family. *Mitochondrion* 2009;9(4) :273–278

24 Shankar SP, Fingert JH, Carelli V, *et al* . Evidence for a novel x – linked modifier locus for leber hereditary optic neuropathy. *Ophthalmic Genet* 2008;29(1) :17–24

25 Giordano C, Iommarini L, Giordano L, *et al* . Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* 2014;137(Pt2) :335–353

26 Istikharah R, Tun AW, Kaewsutthi S, *et al* . Identification of the variants in PARL, the nuclear modifier gene, responsible for the expression of LHON patients in Thailand. *Exp Eye Res* 2013;116:55–57

27 Alavi MV, Fuhrmann N. Dominant optic atrophy, OPA1, and mitochondrial quality control: understanding mitochondrial network dynamics. *Mol Neurodegener* 2013;8:32

28 Abu – Amero KK, Jaber M, Hellani A, *et al* . Genome – wide expression profile of LHON patients with the 11778 mutation. *Br J Ophthalmol* 2010;94(2) :256–259

29 Lott MT, Voljavec AS, Wallace DC. Variable genotype of Leber's hereditary optic neuropathy patients. *Am J Ophthalmol* 1990;109(6) : 625–631

30 Tsao K, Aitken PA, Johns DR. Smoking as an aetiological factor in a pedigree with Leber's hereditary optic neuropathy. *Br J Ophthalmol* 1999;83(5) :577–581

31 Kirkman MA, Yu – Wai – Man P, Korsten A, *et al* . Gene – environment interactions in Leber hereditary optic neuropathy. *Brain* 2009;132(Pt9) :2317–2326