

Мутации криптических сайтов сплайсинга в некодирующих областях гена *ABCA4* при болезни Штаргардта

Карандашева К.О.¹, Жоржоладзе Н.В.², Шерemet Н.Л.², Кузнецова Е.Б.^{3,4},
Танас А.С.^{1,3}, Аношкин К.И.^{1,3}, Залетаев Д.В.^{1,3,4}, Стрельников В.В.^{1,3}

¹ — Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997, ул. Островитянова, д.1, e-mail: christinavader@gmail.com

² — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «НИИ глазных болезней»,
Москва, 119021, ул. Россолимо, д. 11, e-mail: info@eyecademy.ru

³ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»,
Москва, 115478, ул. Москворечье, д.1, e-mail: vstrel@list.ru

⁴ — Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва, 119991, ул. Трубецкая, д.8, стр.2, e-mail: kuznetsova.k@bk.ru

Актуальность. Мутации в гене *ABCA4* вызывают широкий спектр рецессивных абнотрофий сетчатки, в том числе болезнь Штаргардта. Секвенирование полной белок-кодирующей последовательности гена у больных с клиническими признаками болезни Штаргардта не всегда позволяет выявить обе мутации, необходимые для развития заболевания. Ранее было высказано предположение, что патогенные мутации в гене *ABCA4* могут располагаться глубоко в интронных областях, провоцируя формирование альтернативных сплайсоформ мРНК. Глубокое высокопроизводительное параллельное секвенирование РНК, выделенной из сетчатки доноров, выявило 15 альтернативных экзонов, слабо экспрессирующихся в нормальной сетчатке глаза человека. Были определены криптические интронные сайты сплайсинга, активация которых посредством мутаций может приводить к формированию патологических аллелей *ABCA4*. **Цель.** Провести анализ криптических сайтов сплайсинга в некодирующих областях гена *ABCA4* у российских пациентов с болезнью Штаргардта. **Материалы и методы.** Определение нуклеотидных последовательностей всех ранее описанных минорных экзонов и прилегающих к ним областей проведено в выборке из 29 пациентов с болезнью Штаргардта методом высокопроизводительного параллельного полупроводникового секвенирования ДНК клеток периферической крови. **Результаты.** В исследованной выборке выявлены только генетические варианты в криптических сайтах сплайсинга, представляющие собой частые полиморфизмы, которые не могут быть интерпретированы как патогенные мутации. Предположительно патогенных интронных нуклеотидных замен, которые ранее были выявлены в США и странах Западной Европы, нами не наблюдалось. **Выводы.** Отсутствие интронных мутаций в исследованных районах гена *ABCA4* в выборке может объясняться низкой долей пациентов с единственной гетерозиготной экзонной мутацией или с отсутствием экзонных мутаций в гене *ABCA4*, и не ставит под сомнение целесообразность поиска вариантов криптических сайтов сплайсинга в рамках молекулярно-генетической диагностики болезни Штаргардта.

Ключевые слова: болезнь Штаргардта, ген *ABCA4*, высокопроизводительное параллельное секвенирование ДНК, альтернативный сплайсинг

Введение

Мутации в гене, кодирующем ретиноспецифичный АТФ-связывающий белок-транспортер *ABCA4*, вызывают широкий спектр рецессивных абнотрофий сетчатки, включающий болезнь Штаргардта (БШ), абнотрофию сетчатки типа Франческетти, колбочко-палочковую дистрофию и смешанную пигментную абнотрофию сетчатки, в зависимости от степени остаточной функции белка [1–3]. У части больных с клиническими признаками абнотрофии сетчатки, ассоциированной с мутациями в гене *ABCA4*, два патогенных аллеля этого гена детектировать не удаётся. Это затрудняет медико-генетическое консультирование семей и не позволяет рекомендовать таким пациентам современные инвазивные терапевтические подходы, в частности, генотерапию, поскольку, если заболевание вызвано мутацией в другом гене или представляет собой фенотипию без явной генетической причины, генотерапия мо-

жет не только не улучшить, но и ухудшить состояние здоровья пациента [4].

Доля пациентов с классическими фенотипами *ABCA4*-ассоциированной абнотрофии сетчатки, у которых секвенированием всех кодирующих областей гена *ABCA4* удаётся обнаружить лишь одну патогенную мутацию, достигает 40% [5]. При предполагаемой частоте заболевания 1:10000, частота патогенного аллеля гена *ABCA4* в общей популяции составляет 1:100 хромосом, а частота гетерозиготного носительства составляет 1:50 чел., что значительно меньше наблюдаемого в исследованных выборках пациентов [5]. Это говорит о том, что у значительной части пациентов с единственной выявленной мутацией в *ABCA4* причиной заболевания является повреждение именно этого гена, а не других генов-кандидатов. В связи с этим, ранее было высказано предположение о возможности локализации второй патогенной мутации в некодирующих участках гена *ABCA4* [2, 5, 6].

Полное секвенирование интронов *ABCA4* у таких больных не принесло результатов, отчасти из-за наличия в этих интронах большого количества повторяющихся элементов генома [4]. В 2013 г. Т.А. Браун с соавторами опубликовали результаты работы, основанной на альтернативном подходе. Исследователи провели глубокое секвенирование РНК образцов нормальной сетчатки человека с целью определения интронных криптических сайтов сплайсинга — последовательностей ДНК, близких к каноническим сплайс-сигналам. В основе работы лежала гипотеза, что некоторые мутации в таких последовательностях ДНК могут приводить к образованию альтернативных, патогенных, продуктов транскрипции гена. В результате исследования у пациентов с болезнью Штаргардта было выявлено две нуклеотидные замены в сайте сплайсинга экзона 36.1 гена *ABCA4*, не представленные в нормальной популяции. Анализ РНК кератиноцитов больных с этими мутациями показал наличие предсказанного альтернативного транскрипта [4]. Это исследование продемонстрировало важность поиска интронных мутаций в случаях, когда экзомное секвенирование не приводит к идентификации двух патогенных аллелей у пациентов с клинической картиной *ABCA4*-ассоциированной абиотрофии сетчатки.

В двух последующих работах других авторов был расширен спектр патогенных интронных мутаций в гене *ABCA4*. В 2014 г. М. Bauwens с соавторами показали, что патогенные глубоко интронные варианты встречаются

у четверти бельгийских больных с БШ, у которых присутствует только одна мутация в гетерозиготном состоянии в кодирующих или прилежащих интронных областях гена *ABCA4* [7]. N.M. Вах с соавторами выявили глубоко интронные патогенные варианты у 7 из 45 больных с БШ, для которых ранее было показано носительство одной из патогенных экзонных мутаций в гетерозиготном состоянии [8]. Известные на сегодняшний день патогенные интронные варианты гена *ABCA4* приведены в табл. 1; на рис. 1 представлена схема расположения мутаций в сайтах сплайсинга минорного экзона 36.1.

Целью настоящего исследования был анализ криптических сайтов сплайсинга всех ранее описанных минорных экзонов *ABCA4* в выборке больных с клиническим диагнозом «болезнь Штаргардта».

Материалы и методы

Клинический материал. В исследование было включено 29 пациентов с БШ, наблюдавшихся в ФГБНУ «НИИ глазных болезней», г.Москва.

Клинический диагноз БШ был верифицирован на основании стандартных (визометрии, офтальмоскопии, исследования цветового зрения) и специальных офтальмологических методов исследования (кинетической и статической компьютерной периметрии, оптической когерентной томографии сетчатки, флуоресцентной ангиографии глазного дна, аутофлуоресценции, электрофизиологических исследований).

Таблица 1

Известные патогенные интронные варианты гена *ABCA4*

Вариант	Положение в гене <i>ABCA4</i>	Геномные координаты*	Ссылка
V1	экзон 36.1 -3 G>A	Chr1: 94,484,001	T. Braun et al. [4]
V2	экзон 36.1 +4 C>A	Chr1: 94,483,992	T. Braun et al. [4]
V3	IVS36 +1056 A>G	Chr1: 94,484,082	T. Braun et al. [4]
V4	экзон 30.1, 110 G>A	Chr1: 94,493,000	T. Braun et al. [4]
V5	экзон 30.1, 138 C>T	Chr1: 94,492,973	T. Braun et al. [4]
Vg1	экзон 36.1 -4 C>A	Chr1: 94,484,002	M.Bauwens et al. [7]
Vg2	экзон 36.1 +19 G>A	Chr1: 94,483,979	M.Bauwens et al. [7]

Примечание. * референсный геном: NCBI build 37 — hg19

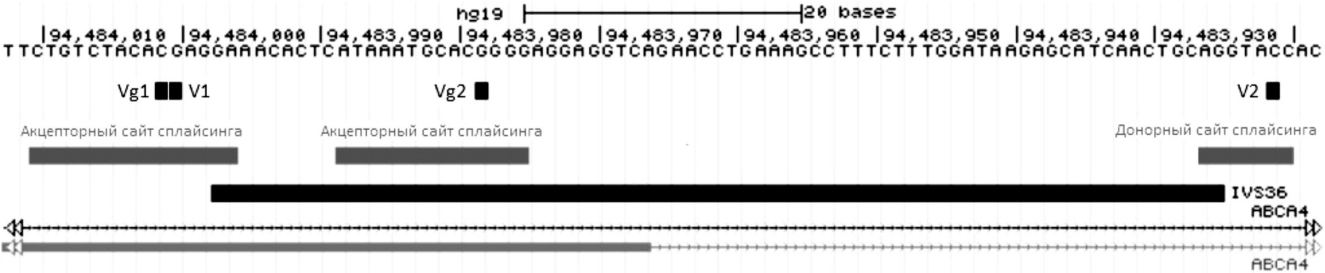


Рис. 1. Точковые мутации V1, V2, Vg1 и Vg2 в сайтах сплайсинга минорного экзона 36.1.

Генетическое исследование проведено на материале ДНК лимфоцитов периферической крови пациентов, выделенной стандартным методом фенол-хлороформной экстракции.

Скрининг мутаций. Для скрининга мутаций в кодирующих (экзонных) последовательностях и прилежащих участках интронов генов, вовлеченных в этиопатогенез болезни Штаргардта — *ABCA4*, *ELOVL4*, *PROM1* и *CNGB3* — использовали высокопроизводительное параллельное секвенирование на приборе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США). Для обогащения образцов ДНК фрагментами целевых участков генома методом AmpliSeq разработали два пула праймеров (в общей сложности 294 пары праймеров), обеспечивающие полное покрытие исследуемых участков генов *ABCA4*, *ELOVL4*, *PROM1* и *CNGB3*. В состав разработанной панели включили также 33 пары праймеров для секвенирования минорных экзонов *ABCA4*. Дизайн панели предполагает 99%-ное покрытие прилежащих интрон-

ных последовательностей протяженностью не менее 100 п.н. Геномные координаты минорных экзонов и их расположение в гене *ABCA4* представлены в табл. 2. При расчете границ сайтов сплайсинга минорных экзонов использовали схему сайта сплайсинга, опубликованную Т.А. Braun с соавторами, в соответствии с которой акцепторный сайт сплайсинга располагается в границах от –2 до +13 нуклеотида от начала экзона, а донорный сайт сплайсинга — от –5 до +2 нуклеотида от конца экзона [4]. Схема расположения минорных экзонов гена *ABCA4*, секвенирование которых проведено в нашем исследовании, показана на рис. 2.

Результаты секвенирования анализировали с использованием программного обеспечения Torrent Suite, в составе: Base Caller (первичный анализ результатов секвенирования); Torrent Mapping Alignment Program — TMAP (выравнивание последовательностей относительно референсного генома NCBI build 37 — hg19); Variant Caller (выявление вариаций нуклеотидных последова-

Таблица 2

Геномные координаты* минорных экзонов гена *ABCA4* и их расположение в гене [4]

Начало экзона	Конец экзона	Положение в гене <i>ABCA4</i>	Координаты акцепторного сайта сплайсинга	Координаты донорного сайта сплайсинга
94,585,995	94,585,900	IVS1	94,585,993 — 94,586,008	94,585,895 — 94,585,902
94,571,098	94,571,006	IVS4	94,571,096 — 94,571,111	94,571,001 — 94,571,008
94,546,959	94,546,863	IVS7	94,546,957 — 94,546,972	94,546,858 — 94,546,865
94,537,960	94,537,868	IVS11	94,537,958 — 94,537,973	94,537,863 — 94,537,870
94,527,737	94,527,644	IVS13	94,527,735 — 94,527,750	94,527,639 — 94,527,646
94,527,024	94,526,939	IVS13	94,527,022 — 94,527,037	94,526,934 — 94,526,941
94,511,521	94,511,428	IVS19	94,511,519 — 94,511,534	94,511,423 — 94,511,430
94,511,493	94,511,450	IVS19	94,511,491 — 94,511,506	94,511,445 — 94,511,452
94,493,110	94,492,766	IVS30	94,493,108 — 94,493,123	94,492,761 — 94,492,768
94,483,998	94,483,926	IVS36	94,483,996 — 94,484,011	94,483,921 — 94,483,928
94,482,160	94,481,973	IVS36	94,482,158 — 94,482,173	94,481,968 — 94,481,975
94,478,528	94,478,424	IVS38	94,478,526 — 94,478,541	94,478,419 — 94,478,426
94,467,858	94,467,638	IVS44	94,467,856 — 94,467,871	94,467,633 — 94,467,640
94,463,713	94,463,417	IVS47	94,463,711 — 94,463,726	94,463,412 — 94,463,419
94,456,746	94,456,655	3'UTR	94,456,744 — 94,456,759	94,456,650 — 94,456,657

Примечание. * референсный геном: NCBI build 37 — hg19.

тельностью). Аннотация функционального значения генетических вариаций и фильтрация известных полиморфизмов проведены с помощью компьютерной программы ANNOVAR. Визуальный анализ данных, ручная фильтрация артефактов секвенирования и выравнивания последовательностей осуществлялись с использованием программы Integrative Genomic Viewer — IGV. Достоверность выявления мутаций валидирована секвенированием ДНК по Сэнгеру.

Результаты

Мутации в кодирующих и прилежащих интронных областях генов, ассоциированных с БШ. Высокопроизводительное параллельное секвенирование ДНК 29 больных с БШ позволило выявить по две патогенные мутации в гене *ABCA4* у 17 человек, из них у 4 человек одна из мутаций локализована в сайте сплайсинга: с.768-1G>T, с.4540-1G>A, с.4634+1G>-, с.5714+5C>T (референсный транскрипт NM_000350). По одному патогенному аллелю гена *ABCA4* в гетерозиготном состоянии выявлено у 2 больных. У 4 больных обнаружены мутации в других генах, ассоциированных с данным заболеванием — *PROM1* и *CNGB3*. У 6 больных не удалось выявить ни одной мутации в генах, ассоциированных с болезнью Штаргардта.

Генетические варианты в сайтах сплайсинга минорных аллелей гена *ABCA4*. В исследованной выборке больных с БШ нами не выявлено ни одной из ранее описанных патогенных интронных мутаций (табл. 1). Поиск генетических вариантов в сайтах сплайсинга всех 15 описанных минорных экзонов гена выявил три однонуклеотидные замены: chr1:g.94478538 G>T (акцепторный сайт сплайсинга экзона 38.1), chr1:g.94478425 C>T (донорный сайт сплайсинга экзона 38.1) и chr1:g.94511533 G>A (акцепторный сайт сплайсинга экзона 19.1). Эти однонуклеотидные замены являются частыми полиморфизмами (описаны в базе данных коротких полиморфных вариантов dbSNP как rs4147853, rs486879 и rs3789398) с популяционными частотами соответственно 19%, 42% и 50%, что не позволяет рассматривать их как патогенные генетические варианты.

Обсуждение результатов

На сегодняшний день в мире опубликованы три работы, посвященные целенаправленному поиску патогенных мутаций в интронах гена *ABCA4* [4, 7, 8]. Направление поиска интронных мутаций было задано публикацией Braun с соавторами (2013), в которой представлены 15 минорных экзонов гена, имеющих слабую экспрессию в нормальной сетчатке глаза человека [4]. Собственно в исследовании Т.А. Braun с соавторами у больных с БШ было идентифицировано 5 патогенных мутаций криптических сайтов сплайсинга (V1–V5, табл. 1). В общей сложности, такие мутации были выявлены у 10 из 28 пациентов с единственными экзонными мутациями гена *ABCA4* в гетерозиготном состоянии [4].

Секвенирование криптических сайтов сплайсинга гена *ABCA4* в голландской выборке из 45 пациентов с БШ с одной экзонной мутацией в этом гене, позволило выявить 2 пациентов с вариантом V1 и четырех — с вариантом V4 [8].

В бельгийской выборке из 131 пациента с БШ, у которых не удалось выявить ни одной экзонной мутации в гене *ABCA4* или была выявлена лишь одна экзонная мутация, у 20 пациентов был обнаружен глубоко интронный вариант V4, и у одного — вариант V1 [7]. В этом же исследовании были идентифицированы два новых интронных варианта *ABCA4*, названные Vg1 и Vg2 (табл. 1), каждый из которых присутствовал у одного из пациентов исследованной выборки.

Во всех проведенных на сегодняшний день работах по поиску мутаций криптических сайтов сплайсинга гена *ABCA4* размеры выборок пациентов с БШ без экзонных мутаций гена или лишь с одной экзонной мутацией составляли десятки человек. Выявляемость мутаций криптических сайтов сплайсинга гена *ABCA4* в этих выборках составила от 13% до 36% [4, 7, 8]. В нашей выборке из 29 пациентов одна или ни одной экзонной мутации в *ABCA4* были обнаружены у 8 чел. Учитывая выявляемость мутаций криптических сайтов сплайсинга гена *ABCA4*, показанную в предыдущих работах, вероятность обнаружить такие мутации в нашей группе больных невысока. Действительно, проведенное секвениро-

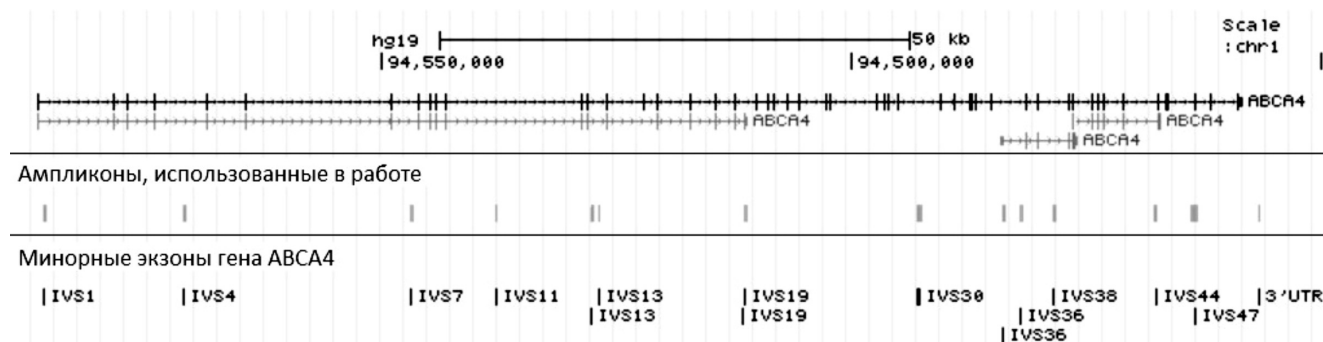


Рис. 2. Расположение минорных экзонов гена *ABCA4* и ампликонов, секвенированных в работе.

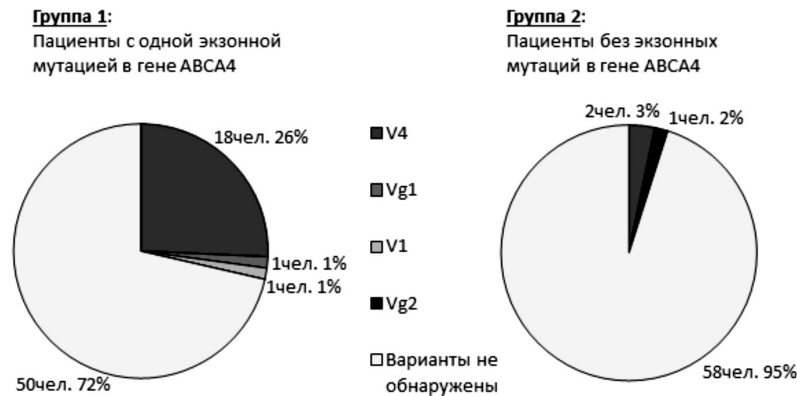


Рис. 3. Выявляемость мутаций криптических сайтов сплайсинга в некодирующих областях гена *ABCA4* у пациентов с болезнью Штаргардта, несущих только одну экзонную мутацию в гетерозиготном состоянии (группа 1) и не имеющих ни одной экзонной мутации (группа 2) в гене *ABCA4*.

вание всех минорных экзонов *ABCA4* показало отсутствие мутаций криптических сайтов сплайсинга в исследованной выборке.

Отсутствие таких мутаций в нашей выборке больных может объясняться, кроме небольшого размера группы без экзонных мутаций *ABCA4* или с одной экзонной мутацией, структурой этой группы: из 8 пациентов по одной экзонной мутации в гетерозиготном состоянии было выявлено у двух, а ни одной не выявлено у шести человек. Как показано в работе М. Vauwens с соавторами [7], выявляемость глубоко интронных мутаций значительно выше среди пациентов, несущих одну экзонную мутацию в гене *ABCA4*, чем среди пациентов, не имевших ни одной экзонной мутации (рис. 3). Это наблюдение в ещё большей степени снижает вероятность обнаружить в нашей выборке интронные мутации в гене *ABCA4*.

Наконец, для интронных мутаций, обнаруженных в группах больных из США и Западной Европы, авторами исследований показано наличие эффекта основателя. Особенно выраженный эффект основателя наблюдали М. Vauwens с соавторами [7] в бельгийской популяции, где вариант V4, обнаруженный у 26% пациентов с БШ и единственной экзонной мутацией в гене *ABCA4*, всегда является частью общего гаплотипа. В целом, эффект основателя различных мутаций в гене *ABCA4* был неоднократно описан для самых разных популяций [9–11]. Для российских пациентов с БШ эффект основателя не характерен. У наших пациентов часто встречаются лишь две мутации в гене *ABCA4* — p.G1961E (35% обследованных) и гаплотип p.L541P/p.A1038V (50% обследованных). Другие распространённые во всём мире мутации, такие, как G863A, P1380L, IVS40+5G>A и др. у наших пациентов не встречаются или встречаются в единичных случаях. Не исключено, что глубоко интронные мутации в гене *ABCA4*, для которых в предыдущих исследованиях показан эффект основателя, не характерны для российских больных в силу популяционных особенностей, что также может снижать вероятность обнаружения таких мутаций у наших пациентов.

Заключение

Проведенное нами исследование не позволило выявить глубоких интронных мутаций в гене *ABCA4* у российских пациентов с БШ, что можно объяснить целым рядом причин:

- 1) недостаточным размером выборки пациентов, у которых не было экзонных мутаций или была только одна экзонная мутация в гетерозиготном состоянии;
- 2) низкой долей пациентов с единственной экзонной мутацией в гетерозиготном состоянии;
- 3) популяционными особенностями исследованной выборки.

В то же время, учитывая высокую представленность мутаций криптических сайтов сплайсинга в гене *ABCA4* в других ранее обследованных группах пациентов с БШ, не получивших полного молекулярно-генетического подтверждения диагноза на основе только экзонного секвенирования, нельзя исключить практической ценности секвенирования минорных экзонов, в том числе при проведении молекулярно-генетического обследования пациентов с БШ в Российской Федерации.

Список литературы

1. Гудзенко С.В., Хлебникова О.В., Беклемищева Н.А., Поляков А.В. ДНК-диагностика наследственных абиотрофий сетчатки, обусловленных мутациями в гене *ABCA4* // Медицинская генетика. — 2006. — (9). — С. 37–40.
2. Schindler E.I., Nylén E.L., Ko A.C. et al. Deducing the pathogenic contribution of recessive *ABCA4* alleles in an outbred population // Hum. Mol. Genet. — 2010. — Vol. 19. — P. 3693–3701.
3. Sheffield V.C., Stone E.M. Genomics and the eye // N. Engl. J. Med. — 2011. — Vol. 364. — P. 1932–1942.
4. Braun T.A., Mullins R.F., Wagner A.H. et al. Non-exonic and synonymous variants in *ABCA4* are an important cause of Stargardt disease // Hum. Mol. Genet. — 2013. — Vol. 22(25). — P. 5136–5145.
5. Zernant J., Schubert C., Im K.M. et al. Analysis of the *ABCA4* gene by next-generation sequencing // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2011. — Vol. 52. — P. 8479–8487.
6. Webster A.R., Heon E., Lotery A.J. et al. An analysis of allelic variation in the *ABCA4* gene // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2001. — Vol. 42. — P. 1179–1189.

7. Bauwens M., De Zaeytjij J., Weisschuh N. et al. An augmented ABCA4 screen targeting noncoding regions reveals a deep intronic founder variant in Belgian Stargardt patients // Human mutation. — 2015. — Vol. 36(1). — P. 39–42.

8. Bax N.M., Sangermano R., Roosing S. et al. Heterozygous Deep-Intronic Variants and Deletions in ABCA4 in Persons with Retinal Dystrophies and One Exonic ABCA4 Variant // Human mutation. — 2015. — Vol. 36(1). — P. 43–47.

9. September A.V., Vorster A.A., Ramesar R.S., Greenberg L.J. Mutation spectrum and founder chromosomes for the ABCA4 gene in South African patients with Stargardt disease // Investigative ophthalmology & visual science. — 2004. — Vol. 45(6). — P. 1705–1711.

10. Chacon-Camacho O.F., Granillo-Alvarez M., Ayala-Ramirez R., Zenteno J.C. ABCA4 mutational spectrum in Mexican patients with Stargardt disease: Identification of 12 novel mutations and evidence of a founder effect for the common p. A1773V mutation // Experimental eye research. — 2013. — Vol. (109). — P. 77–82.

11. Maugeri A., Flothmann K., Hemmrich N. et al. The ABCA4 2588G> C Stargardt mutation: single origin and increasing frequency from South-West to North-East Europe // Eur. J. Hum. Genet. — 2002. — Vol. 10(3). — P. 197–203.

Cryptic splice site mutations in the non-coding regions of the *ABCA4* gene in Stargardt disease patients

Karandasheva K.O.¹, Zhorzholadze N.V.², Sheremet N.L.², Kuznetsova E.B.^{3,4}, Tanas A.S.^{1,3}, Anoshkin K.I.^{1,3}, Zaletaev D.V.^{1,3,4}, Strelnikov V.V.^{1,3}

¹ — Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation, 117997, Ostrovityanova St, 1, e-mail: christinavader@gmail.com

² — Research Institute of Eye Diseases of Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation, 119021, Rossolimo St., 11, e-mail: info@eyeacademy.ru

³ — Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation, 115478, Moskvorechye St, 1, e-mail: vstrel@list.ru

⁴ — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation, 119991, Trubetskaya St, 8, e-mail: kuznetsova.k@bk.ru

Background. Mutations in the *ABCA4* gene cause Stargardt disease and other blinding autosomal recessive retinal disorders. However, sequencing of the complete coding sequence in patients with clinical features of Stargardt disease sometimes fails to detect both mutations required to cause the disease. It has previously been hypothesized that mutations near rare alternate splice junctions in *ABCA4* might cause disease by increasing the probability of mis-splicing at these sites. Deep next-generation sequencing of RNA extracted from human donor eyes revealed 15 alternate exons that are weakly expressed in normal human retina. Cryptic intronic splice sites, activation of which by mutations might lead to the formation of *ABCA4* disease causing alleles, have been identified. **Objective.** To analyze the cryptic splice sites in the noncoding regions of the *ABCA4* gene in Russian patients with Stargardt disease. **Material and methods.** High throughput parallel semiconductor sequencing of all previously described minor exons was performed on peripheral blood cells DNA from 29 patients with Stargardt disease. **Results.** In the group of patients under study we have identified only genetic variants in the cryptic splice sites that represent common polymorphisms and that cannot thus be interpreted as disease causing mutations. Our cohort of the patients lacked apparently disease causing intronic nucleotide substitutions that were previously identified in the North American and European populations. **Conclusion.** Failure to identify *ABCA4* intronic mutations in this study may be explained by low representation of patients with one or no exonic mutations in our cohort and does not compromise the utility of intron cryptic splice sites sequencing as a part of Stargardt disease molecular genetic diagnostics.

Key words: Stargardt disease, *ABCA4* gene, next generation DNA sequencing, alternative splicing