

Поліморфізм $G^{-47} \rightarrow A$ промотору гена γ -кристаліну впливає на рівень його експресії у тромбоцитах

С.О. Риков¹, Ю.Ю. Биць¹, С.В. Гончаров², В.Є. Досенко²

¹Київська міська клінічна офтальмологічна лікарня “Центр мікрохірургії ока”;

²Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця Національної академії наук України, Київ;

E-mail: byts.yuri@gmail.com

Визначення поліморфізму ($G^{-47} \rightarrow A$) промотору гена γ -кристаліну (CRYGB; rs2289917) проведено з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів. За результатами генотипування розподіл алельних варіантів значно відрізняється: G/G – 35,37% G/A – 53,66% A/A – 10,98% у хворих на катаракту та G/G – 55,06% G/A – 35,96% A/A – 8,99% у контрольній групі ($P=0,03$ за критерієм χ^2). При дослідженні рівня експресії гена у тромбоцитах показано, що кількість мРНК CRYGB у гомозигот G/G у 3,9 рази ($P < 0,05$) вища, ніж у носіїв алеля A (генотип G/A та A/A). Розподіл варіантів промотору ($G^{-47} \rightarrow A$) CRYGB суттєво відрізняється у хворих на катаракту та у контрольній групі і має функціональне значення, впливаючи на рівень експресії мРНК кристаліну.

Ключові слова: кристалін; одонуклеотидні поліморфізми; катаракта.

ВСТУП

Питання про роль спадкових факторів у розвитку найбільш розповсюджених захворювань, у тому числі вікової катаракти, є винятково актуальним у сучасній медичній генетиці [1–3]. Виходячи з даних ВООЗ, у світі нараховується близько 285 млн. людей з різноманітними порушеннями зору, з яких 39 млн. сліпі. На частку людей старших за 50 років припадає 82% від загальної кількості сліпих. За даними ВООЗ катаракта є основною причиною оборотної сліпоти у світі і знаходиться на другому місці серед чинників, що викликають зниження гостроти зору (33%). Серед факторів ризику цього захворювання розглядаються і одонуклеотидні поліморфізми (SNPs) та інші варіації [4]. Слід визнати, що досліджень одонуклеотидних поліморфізмів як факторів ризику у розвитку вікової катаракти практично немає, але роль спадкових чинників в етіології цього захворювання визнається більшістю вчених [5, 6, 2]. Мутації в гені γ -кристаліну (CRYGB), що

© С.О. Риков, Ю.Ю. Биць, С.В. Гончаров, В.Є. Досенко

кодує основний структуроутворювальний білок кришталика [7, 5], спричинюють розвиток вродженої катаракти. Проте даних про роль поліморфізмів в цьому гені, а також про функціональне значення варіацій обмаль [5]. Це й спонукало нас до проведення дослідження частоти поліморфізму гена CRYGB у хворих на вікову катаракту та рівня експресії мРНК його гена у клітинах людей із різними варіантами промотору – $G^{-47} \rightarrow A$. За даними бази даних genecards.org експресія вказаного гена не обмежується кришталиком, а спостерігається і в клітинах крові, а саме у тромбоцитах. Саме ці клітини ми і обрали для виділення у генотипованих осіб для виділення РНК та її кількісної оцінки.

Метою нашої роботи було вивчення впливу певних варіантів промотору ($G^{-47} \rightarrow A$) гена CRYGB на його експресію.

МЕТОДИКА

Матеріалом дослідження був букальний епітелій та венозна кров 96 людей, хворих

на початкову та незрілу катаракту. Букальний епітелій забирали за допомогою зонду “ЗГУ-ЦМ” (Росія). Про наявність катаракти у пацієнтів досліджуваної групи робили висновок, виходячи з даних біомікроскопії переднього відрізка ока. До контрольної групи ввійшла та сама кількість людей, що не мали ознак вікової катаракти. ДНК виділяли з використанням наборів «Isogen» (Росія).

G⁻⁴⁷→A-поліморфізм промотору визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів за власною методикою. Для цього ампліфікували ділянку промотору гена CRYGB за допомогою пари специфічних праймерів: прямий 5'-TGT CCT CGT AGA AGG TGA TCTG -3' та зворотний 5'-TAG AAC AAC CCG AAC СТА ССAG-3'. Праймери синтезовано фірмою «Метабійон» (Німеччина). Для ампліфікації брали 30-50 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного ПЛР-буферу, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 30 пмоль/л кожного з праймерів і 0,5 ОД Dream-Taq-полімерази (“АмпліСенс”, Росія), об’єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. ПЛР проводили в термоциклері “Applied Biosystems 2700” (“PerkinElmer”, США). Програма ампліфікації фрагменту промотора складалася з 45 циклів: денатурація – 94°C (5 хв), гібридизація праймерів – 57°C (50 с), початкова – 72°C (1 хв) та кінцева елонгація – 70°C (7 хв). Надалі 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 18 год. з 5 ОД рестриктази PstI (“Ферментас”, Литва) в буфері О такого складу: 50 ммоль/л триас-ацетату (рН 7,5), 10 ммоль/л MgCl₂, 100 ммоль/л ацетату хлориду

натрію, 0,1 мг/мл альбуміну. За наявності в -47-му положенні промотору аденіну PstI розщеплює ампліфіковану ділянку (розмір 343 пар основ – п.о.) на два фрагменти – 170 та 173 п.о., які візуалізуються як одна смужка в агарозному гелі (рис. 1), при генотипі G/A візуалізуються два фрагменти наступного розміру: 343 п.о. та сумарне свічення двох фрагментів (170 та 173 п.о.). При найбільш розповсюдженному генотипі рестрикція фрагмента не відбувається і візуалізується один ампліфікат розміром 343 п.о.

Ампліфікати після рестрикції розділяли в 2,5 %-му агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Візуалізацію ДНК після горизонтального електрофорезу (160 В протягом 40 хв) проводили за допомогою транслюмінатора (“Біоком”, Росія) та відеосистеми ViTran (Росія).

Для виділення тромбоцитів венозну кров набирали в стерильних умовах у моновети об’ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (11,7 ммоль/л) як антикоагулянта (“Sarstedt”, Німеччина), а для попередження адгезії та агрегації тромбоцитів використовували апіразу (1 ОД/мл). Виділення тромбоцитів відбувалося в три етапи: центрифугування (100 g) цільної крові протягом 5 хв (супернатант містив тромбоцити і моноцити); центрифугування (400 g) протягом 2 хв (моноцити сідають на дно пробірки, а тромбоцити залишаються у верхньому шарі); центрифугування (900 g) протягом 6 хв з наступним ресуспензування тромбоцитів у буфері Тіроде такого складу (ммоль/л): NaCl – 137, NaHCO₃ – 12, KCl – 2, Na₂HPO₄ – 0,34, MgCl₂ – 1, глюкози – 5,5, HEPES – 5; рН 7,3), що містив 0,35% сироват-



Рис. 1. Результати електрофорезу фрагмента промотору гена γ -кристаліну після рестрикції за використання фермента PstI. Смужки 2, 3, 6-8, 10, 13, 14, 16-18 відповідають G/G, 1, 4, 5, 9, 11, 12 – G/A, 15 – A/A-генотипам

кового альбуміну бика. Підрахунок кількості тромбоцитів проводили в камері Горяєва.

РНК із ізольованих тромбоцитів виділяли за допомогою набору Trizol RNA-prep («Isogen», Росія), її концентрацію визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 1000 («Thermo Scientific», США). Зворотну транскрипцію проводили з використанням набору реагентів First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas», Литва), застосовуючи 1,2 – 1,5 мкг загальної РНК і гексамерний праймер. Отриману кДНК використовували для проведення кількісної ПЛР у реальному часі із застосуванням флуоресцентного барвника SYBR-Green та специфічної пари праймерів: прямий 5'- TAT CTC TGT TCA GGA CCG CTTC -3' та зворотний 5'- GAT ACT GCC TCC CCC TGT AGTT -3'. Програма ампліфікації складалася з 45 циклів денатурації (95°C, 5 с), приєднання праймерів та елонгації (60°C, 60 с) та проводилася за використання системи 7500 Fast Real-time PCR («Applied Biosystems», США). Експресію цих генів стандартизували відносно такої гена β -актину. Аналіз отриманих результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення 7500 Fast Real-time PCR Software («Applied Biosystems», США). Рівень експресії розраховували за загальноприйнятною формулою $2^{-\Delta Ct}$.

Статистичну обробку результатів проводили у спеціалізованому пакеті SPSS версії 20.0.

Відповідність розподілу генотипів закону Харді-Вайнберга була перевірена за допомогою он-лайн калькулятора (<https://thething.shinyapps.io/SNPcalc/>). Для встановлення можливої асоціації між G⁻⁴⁷→A-поліморфізмом промотору гена CRYGB та ризиком розвитку катаракти був застосований метод χ^2 -критерію за Пірсоном. Статистично значущими результатами вважали при P < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Генотипування пацієнтів з катарактою та без її ознак показало, що розподіл генотипів у цих групах суттєво відрізняється: G/G – 35,37%, G/A – 53,66%, A/A – 10,98% у хворих на катаракту та G/G – 55,06%, G/A – 35,96%, A/A – 8,99% у контрольній групі (рис. 2,а). Проведений статистичний аналіз із застосуванням χ^2 -критерію Пірсона встановив вірогідність розподілу алельних варіантів (P=0,03). Аналіз розподілу алелей (див. рис. 2,б) також відрізняє групу хворих на катаракту – частота мінорного алеля становила 0,38 (в контрольній групі – 0,27, P=0,03).

Визначення рівня експресії гена CRYGB у тромбоцитах за допомогою зворотної транскрипції з наступною ПЛР у реальному часі дало змогу встановити, що рівень мРНК CRYGB у гомозигот G/G у 3,9 раза (P < 0,05) вищий, ніж у носіїв алеля A (генотип G/A та

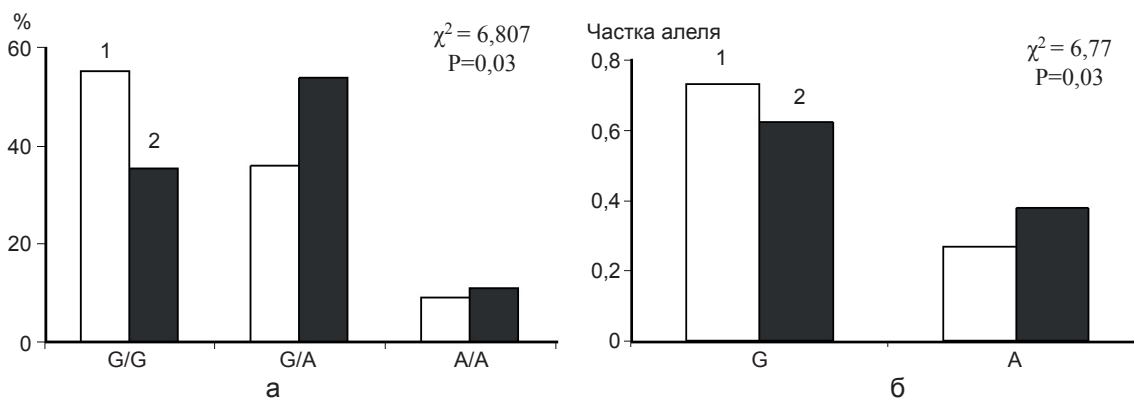


Рис. 2. Розподіл генотипів (а) та алелей (б) гена γ -кристаліну (поліморфізм промотору G⁻⁴⁷→A) у практично здорових людей без ознак вікової катаракти (1) та у хворих на катаракту (2). Вірогідність відмінностей у розподілі частот генотипів та алелей визначено за χ^2 -критерієм. Кількість людей з генотипом G/G - 49, G/A - 32, A/A - 8 у контрольній групі та 29, 44, 9 у дослідній відповідно

A/A). Це свідчить, що вказаний поліморфізм є функціональним, тобто зменшує експресію досліджуваного гена у тромбоцитах. Звичайно, регуляція експресії генів у різних тканинах має свої особливості і встановлена нами закономірність для тромбоцитів може не повністю реалізуватися в тканинах ока, а саме кришталіку. Проте аналогічні функціонально-генетичні дослідження інших генів дають можливість стверджувати, що можна з високою вірогідністю говорити про наявність залежності експресії мРНК CRYGB від генотипу.

Отримані нами результати повністю співпадають з отриманими індійськими вченими у пацієнтів з «педіатричною» катарактою [10]. Серед досліджених чотирьох поліморфізмів у генах CRYGA та GRYGB тільки $G^{-47} \rightarrow A$ -поліморфізм rs2289917 виявив сильну асоціацію з катарактою. Функціональних досліджень автори не проводили, але застосування біоінформаційного методу, а саме множинного вирівнювання (multiple sequence alignment), дало змогу показати, що нуклеотид у -47 -му положенні знаходиться в висококонсервативному регіоні гена GRYGB як у приматів, так і у гризунів. Таким чином, отримані нами результати знаходять біоінформаційне підтвердження і доводять функціональне значення заміни $G^{-47} \rightarrow A$. Подальший аналіз із застосуванням програмного забезпечення ALIBABA пока-

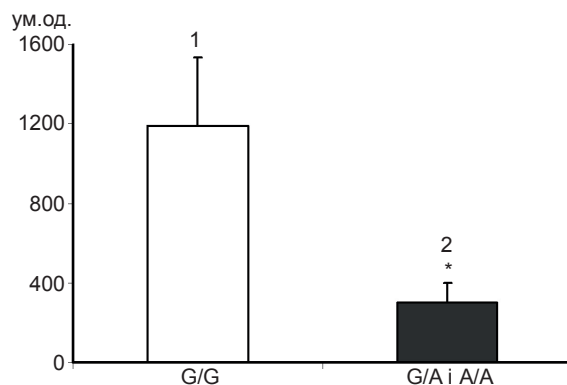


Рис. 3. Рівень експресії мРНК γ -кристаліну (CRYGB) у тромбоцитах людей із різними варіантами промотору гена CRYGB ($G^{-47} \rightarrow A$, rs2289917). * вірогідність відмінності ($P < 0,05$) експресії гена при генотипах G/A та A/A (2) ($n=10$) порівняно із G/G генотипом (1) ($n=25$)

зав, що послідовність, яка містить алель G, є сайтом зв'язування для двох транскрипційних факторів, а саме – ACE2 та прогестеронового рецептора, а заміна на аденін у даній позиції спричинює втрату сайту зв'язування з цими транскрипційними факторами. Перший з них у людини досі не описаний і є транскрипційним фактором у дріжджів. А прогестероновий відомий як рецептор ядерних гормонів класу NR3C, що включає в себе мінералокортикоїди, глюкокортикоїди та андрогенові рецептори. Основним сигнальним шляхом, що використовується прогестероновими рецепторами, є зв'язування ДНК і транскрипційна регуляція таргетних генів. Сигналізація за участю прогестеронового рецептора також може відбуватися через зв'язування з іншими транскрипційними факторами, такими, як NF-kB, AP-1 або STAT, проте даних, що ці білки впливають на експресію гена кристаліну, поки що немає.

Узагальнюючи результати, слід зазначити, що вони вказують на те, що $G^{-47} \rightarrow A$ -поліморфізм гена γ -кристаліну частіше зустрічається у хворих на вікову катаракту та може розглядатися як генетичний фактор ризику розвитку цього захворювання. Досить молодий вік людей, що були відібрані для участі у дослідженні, свідчить про прискорену появу вікових змін у кришталіку і, з огляду на це, вказаний генетичний маркер може бути застосований для первинного скринінгу осіб з високим ризиком розвитку катаракти і з наступним проведенням профілактичних заходів.

ВИСНОВКИ

1. Розподіл варіантів промотору ($G^{-47} \rightarrow A$) гена γ -кристаліну (rs2289917) суттєво відрізняється у хворих на катаракту та у контрольній групі осіб, що не мають ознак вікових змін кришталіка.

2. Поліморфізм має функціональне значення – експресія мРНК кристаліну у носіїв алеля A значно нижча, ніж у гомозигот G/G.

3. Визначення $G^{-47} \rightarrow A$ -поліморфізму промотору гена γ -кристаліну може знайти

застосування у разі проведення скринінгових досліджень для формування груп підвищеного ризику розвитку катаракти.

С.А. Рыков¹, Ю.Ю. Быць¹, С.В. Гончаров², В.Е. Досенко².

ПОЛИМОРФИЗМ (G-47→A) ПРОМОТОРА ГЕНА γ-КРИСТАЛЛИНА ВЛИЯЕТ НА УРОВЕНЬ ЕГО ЭКСПРЕССИИ В ТРОМБОЦИТАХ

Определение полиморфизма G⁻⁴⁷→A промотора гена γ-кристаллина (CRYGB; rs2289917) проведено с использованием метода полимеразной цепной реакции с последующим анализом длины рестрикционных фрагментов. По результатам генотипирования распределение аллельных вариантов значительно отличается: G/G – 35,37% G/A – 53,66% A/A – 10,98% у больных катарактой и G/G – 55,06% G/A – 35,96% A/A – 8,99% в контрольной группе (P = 0,03 по критерию χ²). При исследовании уровня экспрессии гена в тромбоцитах показано, что количество мРНК CRYGB у гомозигот G/G в 3,9 раза (P < 0,05) выше, чем у носителей аллеля A (генотип G/A и A/A). Распределение вариантов промотора G⁻⁴⁷→A гена CRYGB существенно отличается у больных катарактой и в контрольной группе и имеет функциональное значение, влияя на уровень экспрессии мРНК CRYGB.

Ключевые слова: кристаллин; однонуклеотидные полиморфизмы; катаракта.

¹Киевская городская клиническая офтальмологическая больница «Центр микрохирургии глаза»;

²Институт физиологии им. А.А. Богомольца Национальной академии наук Украины, Киев

S.A. Rykov¹, Y. Y. Byts¹, S. V. Goncharov², V. E. Dosenko².

ALLELIC VARIANT FREQUENCY OF PROMOTER (G⁻⁴⁷→A) γ-CRYSTALLIN GENE AFFECTS THE LEVEL OF ITS EXPRESSION IN PLATELETS

To investigate the genetical precursors of cataract development the next groups were included: patients suffering from cataract (96) and 96 healthy persons. The determination of γ-crystallin polymorphism (G⁻⁴⁷→A) (rs2289917) was provided using PCR method and further analyses of restriction fragment length polymorphism. These allelic variants have the significant different: G/G - 35,37 %, G/A - 53,66 %, A/A - 10,98 %, and G/G - 55,06 %, G/A - 35,96 %, A/A - 8,99 % comparing with the control group (P=0,03, by χ²-test). While investigating the level of expression of γ-crystallin gene (CRYGB) in platelets, showed that the quantity of mRNA in homozygotes G/G in 3,9

times (P<0,05) higher than in carriers of A allele (genotype G/A and A/A). This paper shows the significant difference in distribution of CRYGB promoter (G⁻⁴⁷→A) genotypes in patients with cataract compared to the control group. Furthermore, here we provide the data concerning its functional meaning: level of mRNA expression of crystallin is different in carriers of various CRYGB promoter (G⁻⁴⁷→A) genotypes. Key words: crystallin; single nucleotide polymorphism; cataract.

¹ "Eye Microsurgery Center", Kyiv;

² O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Lin Q, Zhou N, Zhang N, Zhu B, Hu S, Zhou Z, Qi Y. Genetic variations and polymorphisms in the ezrin gene are associated with age-related cataract. *Mol Vis.* 2013 Jul 20;19:1572-9.
2. Su S, Yao Y, Zhu R, Liang C, Jiang S, Hu N, Zhou J, Yang M, Xing Q, Guan H. The associations between single nucleotide polymorphisms of DNA repair genes, DNA damage, and age-related cataract: Jiangsu Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Feb 1;54(2):1201-7.
3. Zuercher J, Neidhardt J, Magyar I, Labs S, Moore AT, Tanner FC, Waseem N, Schorderet DF, Munier FL, Bhattacharya S, Berger W, Kloeckener-Gruissem B. Alterations of the 5' untranslated region of SLC16A12 lead to age-related cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Jul;51(7):3354-61.
4. Barreiro LB, Laval G, Quach H, Patin E, Quintana-Murci L. Natural selection has driven population differentiation in modern humans. *Nat Genet.* 2008 Mar;40(3):340-5.
5. Kapur S, Mehra S, Gajjar D, Vasavada A, Kapoor M, Sharad S, Alapure B, Rajkumar S. Analysis of single nucleotide polymorphisms of CRYGA and CRYGB genes in control population of western Indian origin. *Indian J Ophthalmol.* 2009 May-Jun;57(3):197-201.
6. Santhiya ST, Manisastry SM, Rawlley D, Malathi R, Anishetty S, Gopinath PM, Vijayalakshmi P, Namperumalsamy P, Adamski J, Graw J. Mutation analysis of congenital cataracts in Indian families: identification of SNPs and a new causative allele in CRYBB2 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 Oct;45(10):3599-607.
7. Graw J. Genetics of crystallins: cataract and beyond. *Exp Eye Res.* 2009 Feb;88(2):173-89.
8. VanderVeen DK, Andrews C, Nihalani BR, Engle EC. Crystalline cataract caused by a heterozygous missense mutation in γD-crystallin (CRYGD). *Mol Vis.* 2011;17:3333-8.
9. Weisschuh N, Aisenbrey S, Wissinger B, Riess A. Identification of a novel CRYBB2 missense mutation causing congenital autosomal dominant cataract. *Mol Vis.* 2012;18:174-80.
10. Mehra S, Kapur S, Vasavada AR. Polymorphisms of the gamma crystallin A and B genes among Indian patients with pediatric cataract. *J Postgrad Med.* 2011;57:201-5.

Матеріал надійшов до редакції 03.12.2014