

(106)

Analiza sekwencji kodującej eksonu III genu CYP1B1 w polskiej populacji pacjentów chorych na jaskrę wrodzoną i młodzieńczą

CYP1B1 exon III coding sequence analysis in primary congenital and juvenile glaucoma in Polish patients

Bronisława Koraszewska-Matuszewska¹, Elżbieta Samochowiec-Donocik¹, Aleksandra Zielińska², Piotr Kruszyński², Tomasz J. Wąsik²

¹Z Katedry i Kliniki Okulistyki Dziecięcej Śląskiej Akademii Medycznej
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Bronisława Koraszewska-Matuszewska

²Z Zakładu Wirusologii Śląskiej Akademii Medycznej
Kierownik: dr n. biol. Tomasz J. Wąsik

Summary: Several mutations of CYP1B1 gene, a member of cytochrome P450 gene family, have been associated with occurrence of primary congenital glaucoma. The aim of presented work was to investigate CYP1B1 gene exon III mutations in 72 unrelated Polish patients with primary congenital glaucoma (C), juvenile glaucoma (J) and juvenile glaucoma suspects (P). In one patient we have detected homozygous duplication of 10bp at nucleotide 8046 resulting in synthesis of truncated protein, first found among the Polish population. Furthermore, sequence analysis revealed three distinct single nucleotide polymorphisms at nucleotides 8131 (C→G), 8184 (C→T) and 8195 (A→G), in examined populations. The haplotypes in homozygous state (C/C/A, C/C/G, and G/T/A) were present in 52.6% cases. Since it is suggested that the presence of these haplotypes may be linked to mutations in exon II of the CYP1B1 gene, we plan to analyze that exon in the future.

Słowa kluczowe: pierwotna jaskra wrodzona, jaskra młodzieńcza, badanie mutacji, gen CYP1B1.

Key words: primary congenital glaucoma, juvenile glaucoma, mutations screening, CYP1B1 gene.

Jaskra stanowi heterogenną grupę neuropatii nerwu wzrokowego o różnych uwarunkowaniach genetycznych (3,5,8,10). W ostatnich latach zauważa się znaczny postęp w molekularnych badaniach genetycznych dotyczących pierwotnej jaskry otwartego kąta, pierwotnej jaskry wrodzonej i jaskry skojarzonej z anomaliami rozwojowymi (7). Dotychczas zidentyfikowano trzy geny, których defekty wydają się odpowiedzialne za występowanie jaskry. Należą do nich: gen MYOC (TIGR) kodujący myocilinę, gen OPTB kodujący optoneurynę oraz gen CYP1B1, kodujący cytochrom P450 1B1. Gen CYP1B1 zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu drugiego (2p21) i składa się z trzech eksonów, z których pierwszy jest eksonem niekodującym. Otwarta rama odczytu rozpoczyna się w obrębie eksonu II i obejmuje 1629 pz (9,2,1). Do chwili obecnej w obrębie genu CYP1B1 zidentyfikowano 35 różnego rodzaju mutacji związanych z występowaniem jaskry oraz 7 polimorfizmów, których obecność może mieć wpływ na pojawienie się tego schorzenia (9). Wykazano, że istnienie mutacji w genie CYP1B1 u pacjentów z jaskrą wrodzoną związane jest z wcześniejszym wystąpie-

niem objawów klinicznych i że częściej stwierdza się je u osób płci żeńskiej (6). W populacjach zróżnicowanych etnicznie częstość występowania mutacji u pacjentów z jaskrą wrodzoną wynosi 20-30%, podczas gdy w populacjach jednorodnych wzrasta ona do 85% (9).

Celem pracy jest zbadanie sekwencji kodującej eksonu III genu CYP1B1 u dzieci chorych na pierwotną jaskrę wrodzoną lub młodzieńczą w populacji polskiej. Wybór eksonu III do badań podyktowany był tym, że większość zidentyfikowanych dotychczas mutacji oraz polimorfizmów zlokalizowana została w obrębie tego fragmentu genu (9).

Pacjenci

Badania genetyczne przeprowadzono u 72 pacjentów, wśród których wyróżniono chorych na pierwotną jaskrę wrodzoną – grupa C (n = 19), jaskrę młodzieńczą – grupa J (n = 11) oraz podejrzanych o jaskrę – grupa P (n = 42). W grupie C znajdowało się 19

Pozycja ^a	Allel	Zmiana aminokwasu	Częstość allelu				Wartość p
			Pacjenci ogółem	Pacjenci z jaskrą wrodzoną (C)	Pacjenci z jaskrą młodzieńczą (J)	Pacjenci z podejrzeniem o jaskrę (P)	
8131	G	L432V	0,43	0,5	0,32	0,43	0,17 ^b 0,46 ^c 0,35 ^d
8184	T	D449D	0,54	0,55	0,32	0,43	0,08 ^b 0,20 ^c 0,35 ^d
8195	A	N453S	0,99	1	0,91	0,99	0,25 ^b 0,68 ^c 0,21 ^d

Tab. I. Występowanie zmian polimorficznych w poszczególnych grupach pacjentów.

Tab. I. Polymorphisms in the exon III of CYP1B1 gene in examined Polish patients with primary congenital glaucoma (C), juvenile glaucoma (J) and juvenile glaucoma suspects (P).

^a GB U56438

^b test niezależności między C a J

^c test niezależności między C a P

^d test niezależności między J a P

Pacjenci				Ekson III ^a			Wartość p ^b
Pacjenci ogółem n	Jaskra wrodzona (C) n (%)	Jaskra młodzieńcza (J) n (%)	Podejrzenie o jaskrę (P) n (%)	L432V 8131 C→G	D449D 8184 C→T	N453S 8195 A→G	
21	5 (26,3)	4 (36,4)	12 (28,6)	C/C	C/C	A/A	0,98
1	0 (0,0)	1 (9,1)	0 (0,0)	C/C	C/C	G/G	1,00
1	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,4)	C/C	C/C	A/G	1,00
34	7 (36,8)	5 (45,4)	22 (52,4)	C/G	C/T	A/A	0,33
2	2 (10,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	C/G	T/T	A/A	0,06
13	5 (26,3)	1 (9,1)	7 (16,7)	G/G	T/T	A/A	0,57
72	19	11	42				

Tab. II. Częstości występowania genotypów w poszczególnych grupach pacjentów.

Tab. II. Genotype frequencies among Polish patients with primary congenital glaucoma (C), juvenile glaucoma (J) and juvenile glaucoma suspects (P).

^a GB U56438

^b test U Manna-Witneya dla dwóch grup niezależnych

i wsp. (11) stwierdzili obecność tej zmiany u 5 chorych spośród 28 przebadanych pacjentów z populacji mieszanej (Turcy, Anglicy i Amerykanie). Natomiast Colomb i wsp. (3) zidentyfikowali 2 przypadki tej duplikacji wśród 15 pacjentów z jaskrą wrodzoną z populacji francuskiej. W sekwencji kodującej eksonu III w grupie pacjentów z pierwotną jaskrą wrodzoną, pierwotną jaskrą młodzieńczą oraz osób podejrzanych o jaskrę nie wykryliśmy obecności zmian o charakterze mutacji punktowych.

W obrębie przebadanej przez nas sekwencji stwierdziliśmy występowanie trzech polimorfizmów: 8131 (C→G, L432V), 8184 (C→T, D449D) oraz 8195 (A→G, N453S) (GBU56438). Wpływ obecności alleli polimorficznych na rozwój jaskry pozostaje dyskusyjny. Z jednej strony polimorfizmy te występują również u osób zdrowych (4), jednakże wyniki badań przeprowadzonych dla różnych popula-

cji wykazują, że u osób z jaskrą dominuje homozygotyczny układ haplotypów. Wykazano ponadto, że nierzadko są one powiązane z wystąpieniem mutacji w sekwencji kodującej eksonu II genu CYP1B1 (2,1). Najczęściej spotykaną zmianą mutacyjną w tym rejonie jest G61E (2,1). Wśród przeanalizowanych przez nas przypadków haplotypy (C/C/A, C/C/G, G/T/A) występowały u 52,6% przebadanych pacjentów z jaskrą wrodzoną i u 54,6% z jaskrą młodzieńczą, a u pacjentów z podejrzeniem o jaskrę częstość haplotypów była nieco mniejsza i wynosiła 45,3%. W zależności od różnych grup etnicznych oraz ich lokalizacji geograficznej obserwuje się odmienne wzorce zmian genetycznych w genie CYP1B1, warunkujących rozwój jaskry (9,4,1,11). W celu sprawdzenia, czy w polskiej populacji osób z jaskrą istnieje powiązanie homologicznego układu haplotypów w eksonie III z występowaniem mutacji w eksonie II

genu CYP1B1, w dalszej części naszych badań planujemy przeprowadzenie analizy sekwencji kodującej eksonu II.

Otrzymane w naszej pracy wyniki wskazują obecność odmiennego niż w innych populacjach typu zmian polimorficznych w obrębie eksonu III genu CYP1B1 w badanej populacji polskich pacjentów (1,3,4,6,9) i wydają się potwierdzać tezę, że częstość występowania mutacji jest niższa w populacjach heterogennych. Jednakże aby jednoznacznie określić częstość zmian mutacyjnych i polimorficznych genu CYP1B1 w populacji polskiej oraz ich wpływ na rozwój pierwotnej jaskry wrodzonej i młodzieńczej, podjęliśmy badania obejmujące analizę pozostałych eksonów genu CYP1B1.

PIŚMIENNICTWO: 1. Bejjani B. A., Stockton D. W., Lewis R. A. i wsp.: *Multiple CYP1B1 mutations and incomplete penetrance in an inbred population segregating primary congenital glaucoma suggest frequent de novo events and a dominant modifier locus*. Hum. Mol. Genet., 2000, 9, 367-374. 2. Belmouden A., Melki R., Hamdani M. i wsp.: *A novel frameshift founder mutation in the cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) gene is associated with primary congenital glaucoma in Morocco*. Clin. Genet., 2002, 62, 334-339. 3. Colomb E., Kaplan J., Garchon H. J.: *Novel cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) mutations in patients with primary congenital glaucoma in France*. Hum. Mutat., 2003, 22 (6), 496. 4. Kakiuchi-Matsumoto T., Isashiki Y., Ohba N. i wsp.: *Cytochrome P450 1B1 gene mutations in Japa-*

nese patients with primary congenital glaucoma. Am. J. Ophthalmol., 2001, 131, 345-350. 5. Libby R. T., Smith R. S., Savinova O. V., Zabaleta A., Martin J. E., Gonzalez F. J., John S. W.: *Modification of ocular defects in mouse developmental glaucoma models by tyrosinase*. Science, 2003, 299 (5612), 1578-1581. 6. Ohtake Y., Tanino T., Suzuki Y., Miyata H., Taomoto M., Azuma N., Tanihara H., Ariaie M., Mashima Y.: *Phenotype of cytochrome P4501B1 gene (CYP1B1) mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma*. Br. J. Ophthalmol., 2003, 87 (3), 302-304. 7. Ray K., Mukhopadhyay A., Acharya M.: *Recent advances in molecular genetics of glaucoma*. Mol. Cell. Biochem., 2003, 253 (1-2), 223-231. 8. Sarfarazi M., Stoilov I., Schenkman J. B.: *Genetics and biochemistry of primary congenital glaucoma*. Ophthalmol. Clin. North. Am., 2003, 16 (4), 543-54. 9. Sitarus R., Ardjo S. M., Lorenz B., Preising M.: *CYP1B1 gene analysis in primary congenital glaucoma in Indonesian and European patients*. J. Med. Genet., 2003; 40, e9. 10. Soley G. C., Bosse K. A., Flikier D., Flikier P., Azofeifa J., Mardin C. Y., Reis A., Michels-Rautenstrauss K. G., Rautenstrauss B. W.: *J. Glaucoma*, 2003, 12 (1), 27-30. 11. Stoilov I., Akarsu A. N., Alozie I., et al.: *Sequence Analysis and Homology Modeling Suggest That Primary Congenital Glaucoma on 2p21 Results from Mutations Disrupting Either the Hinge Region or the Conserved Core Structures of Cytochrome P4501B1*. Am. J. Hum. Genet., 1998, 62, 573-584.

Praca wpłynęła do Redakcji 16.04.2004 r. (506).

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
 prof. dr hab. n. med.
 Bronisława Koraszewska-Matuszewska
 ul. Żwirki i Wigury 15/31
 40-063 Katowice
 dr n. biol. Tomasz Wąsik
 Zakład Wirusologii ŚAM
 ul. Narcyzów 1
 41-200 Sosnowiec