

Т.Ю.Комарова (4 курс, каф. ФХОМ), Л.Г.Кохреидзе (2 курс магистратуры, СПбГУ, каф. биохимии), М.Ю.Мандельштам, д.б.н., доц., в.н.с., (ГУ НИИЭМ РАМН),
Н.А.Грудинина, к.б.н., н.с. (ГУ НИИЭМ РАМН)

ПОИСК МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *WDR36* У БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

Сегодня в мире глаукомой страдают около 66 млн. человек. Уже к 2030 году ожидается увеличение числа таких больных в 2 раза. По некоторым данным в России насчитывается 750 тыс. больных глаукомой.

Наиболее частой формой глаукомы является первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ). При ПОУГ у больных отмечается повышение внутриглазного давления, развитие прогрессирующей оптической нейропатии с последующей атрофией головки зрительного нерва и появление типичных дефектов поля зрения. ПОУГ является одной из ведущих причин неустраняемой слепоты среди лиц трудоспособного возраста в развитых странах и, несмотря на достигнутые успехи в ее лечении, более половины больных продолжают терять зрительные функции.

Частота семейных форм ПОУГ по данным разных авторов варьирует от 21 до 50 %, а риск развития этого заболевания среди потомков больных глаукомой в десять раз выше, чем среднепопуляционный. В течение длительного времени ПОУГ протекает бессимптомно, поэтому необходимо усовершенствование методов тестирования генетической предрасположенности к заболеванию, которое направлено на максимально раннее выявление групп риска развития глаукомы.

Существует много генов, мутации в которых предрасполагают к развитию глаукомы. Изучение семей с множественными случаями ПОУГ в нескольких поколениях позволило выявить специфические гены, ассоциированные с развитием данного заболевания. Эти гены получили названия гена миоцилина (*MYOC/TIGR*) и гена оптиневрина (*OPTN*). Кодлируемые этими локусами белки миоцилин и оптиневрин важны для нормального развития и функционирования глаза, однако их роль в патогенезе глаукомы неизвестна.

Ранее в коллекции ДНК больных ПОУГ Санкт-Петербурга с помощью анализа конформационного полиморфизма однонитевых фрагментов ДНК (SSCP-анализа) нами была найдена лишь одна патологически значимая мутация гена миоцилина Q368X (с.1102 C>T), и один риск-ассоциированный полиморфизм M98K (с.603 T>A) в гене оптиневрина [1]. Однако, у большинства пациентов с ПОУГ генетических вариантов, ведущих к развитию глаукомы, найдено не было.

Недавно был картирован новый ген, предположительно ответственный за развитие ПОУГ - *WDR36*. Этот ген состоит из 23 экзонов и кодирует белок размером в 951 аминокислотный остаток, функция которого до конца неизвестна. В первом исследовании гена *WDR36* [2] было идентифицировано 4 мутации, предположительно вызывающие заболевание, а именно: N355S, A449T, R529Q, D658G, локализованные, соответственно, в 8-ом, 11-ом, 13-ом и 17-ом экзонах.

Как правило, спектры мутационных изменений в генах являются популяционно и этнически специфичными. В нашей стране не проводились исследования гена *WDR36*, поэтому отсутствует какая-либо информация о типах и частоте встречающихся мутаций в нем у больных ПОУГ Санкт-Петербурга.

Целью настоящей работы являлся анализ частоты возникновения названных четырех мутаций гена *WDR36* у больных ПОУГ Санкт-Петербурга.

Для работы использовали банк ДНК, ранее выделенной из крови пациентов с ПОУГ, проходивших лечение в клинике СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, офтальмологических отделениях городской многопрофильной больницы №2 и ряда поликлиник города (200 человек, из них 100 человек- группа контроля).

В ходе работы было проведено исследование 100 образцов ДНК пациентов с ПОУГ и 100 контрольных образцов на предмет наличия в них мутаций D658G и R529Q.

Для амплификации фрагмента 17-го и 13-го экзона гена WDR36 применяли полимеразную цепную реакцию с использованием специфических праймеров [2].

Для оценки количества и специфичности продуктов амплификации ДНК проводили электрофорез этих продуктов в вертикальных пластинах полиакриламидного геля (ПААГ, 80x100x2мм) с последующей окраской нитратом серебра. Для работы использовали 8% полиакриламидный гель.

Затем выполняли ПДРФ-анализ образцов с использованием эндонуклеаз рестрикции *BglI* и *TaqI* для продуктов амплификации 17-го и 13-го экзонов соответственно. Размер продуктов амплификации образцов 17-го экзона составляет 443 п.н. Известно, что при мутации D658G (с.1973 A>G) появляется сайт для эндонуклеазы рестрикции *BglI*, которая расщепляет ДНК на 2 фрагмента: 156 п.н. и 287 п.н. [2]. В нормальном аллеле сайт для эндонуклеазы рестрикции *BglI* отсутствует. Размер продукта амплификации 13-го экзона составляет 125 п.н. При наличии мутации R529Q (с.1568 G>A) в амплифицированном фрагменте сайт для эндонуклеазы рестрикции *TaqI* отсутствует. Продукт амплификации нормального аллеля расщепляется *TaqI* на фрагменты 91 п.н. и 34 п.н..

Ферментативный гидролиз осуществляли в течение 2 часов в водяном термостате при температуре 37°C (при использовании эндонуклеазы рестрикции *TaqI*) и при температуре 65°C (при использовании *BglI*). После окончания ферментативного гидролиза, образцы ДНК наносили на 8% ПААГ. После окончания электрофореза ДНК окрашивали нитратом серебра. Для определения размера полученных образцов применяли маркер молекулярного веса от 100 до 1000 п.н. с шагом 100 п.н. производства фирмы “Медиген” (Новосибирск).

В результате проведенного исследования мутацию D658G обнаружили в гетерозиготном состоянии у одного из пациентов с ПОУГ и у одного здорового донора, а мутацию R529Q не обнаружили ни у одного из обследованных. Полученные результаты исследования, также как и результаты исследований, проведенных в других странах, не позволяют считать мутацию D658G фактором, предрасполагающим к развитию ПОУГ. В дальнейшем планируется осуществить поиск и других мутаций в гене *WDR36*.

Настоящие исследования финансировались из средств гранта РФФИ № 07-04-00476.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Рахманов В.В., Никитина Н.Я., Захарова Ф.М., Астахов Ю.С., Квасова М.Д., Васильев В.Б., Голубков В.И., Мандельштам М.Ю. Генетика. 2005. Том 41, N 11. – С. 1567 – 1574.
2. Monemi S., Spaeth G., DaSilva A., Popinchalk S., Plitchev E., Liebmann J., Ritch R., Heon E., Crick R.P., Child A., Sarfarazi M. I Hum Mol Genet. 2005 Vol. 14. No.6. – P. 725 – 733.