

Генетическая диагностика глаукомы в России

Методические рекомендации для врачей

Автор: Марианна Иванова,
врач-офтальмолог, к.м.н.,
основатель проекта www.ofthalmic.ru

Глаукома – это атрофия зрительного нерва и сужение полей зрения при повышенных или нормальных цифрах внутриглазного давления (ВГД). В России около 1 миллиона человек страдает глаукомой, в мире насчитывается 67 миллионов людей с диагнозом глаукома (Gibson J. 2012). Глаукома – весьма разнородное по этиологии заболевание, причинами которого могут быть: травма глаза, особое строение глаза (при закрытоугольной глаукоме), катаракта (когда мутный набухающий хрусталик затрудняет пути оттока внутриглазной жидкости – ВГЖ), генетические нарушения, приводящие к синтезу патологических белков, затрудняющих отток жидкости из глаза, гипоксические процессы в глазу и множество других факторов. Результат прогрессирования глаукомы – это необратимая атрофия волокон зрительного нерва либо вследствие затрудненного оттока ВГЖ из глаза и повышения давления в глазу, либо вследствие действия других факторов, приводящих к атрофии без выраженного повышения ВГД.

В России множество исследователей и практикующих врачей направляют свои усилия на поиск эффективных способов лечения и предотвращения развития глаукомы. На сегодняшний день при анализе генома человека найдены несколько десятков участков (локусов) ДНК, изменения в которых вызывают глаукому (табл. 1).

Таблица 1. Гены, ассоциированные с развитием ПОУГ (Fuse N., 2010)

Символ гена	Название гена	MIM #	Расположение гена	Ссылка
<i>AGTR2</i>	Angiotensin II receptor, type 2	300034	Xq22-q23	(Hashizume et al. 2005)
<i>ANP</i>	Atrial natriuretic peptide	108780	1p36.2	(Tunny et al. 1996)
<i>APOE</i>	Apolipoprotein E	107741	19q13.2	(Copin et al. 2002)
<i>CDKN1A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	116899	6p21.2	(Tsai et al. 2004)
<i>CDH-1</i>	E-cadherin	192090	16q22.1	(Lin et al. 2006)
<i>CYP1B1</i>	Cytochrome P450, subfamily I, polypeptide 1	601771	2p22-p21	(Vincent et al. 2002)
<i>EDNRA</i>	Endothelin receptor, type A	131243	4q31.2	(Ishikawa et al. 2005)
<i>GPDS1</i>	Glaucoma-related pigment dispersion syndrome	600510	7q35-q36	(Nakamura et al. 2009)
<i>GSTM1</i>	Glutathione S-transferase, mu-1	138350	1p13.3	(Juronen et al. 2000)
<i>HSPA1A</i>	Heat-shock 70kD protein 1A	140550	6p21.3	(Tosaka et al. 2007)
<i>IGF2</i>	Insulin-like growth factor II	147470	11p15.5	(Tsai et al. 2003)
<i>IL1β</i>	Interleukin 1-beta	147720	2q14	(Lin et al. 2003)
<i>MFN1</i>	Mitofusin 1	608506	3q25-q26	(Wolf et al. 2009)
<i>MFN2</i>	Mitofusin 2	608507	1p36.2	(Wolf et al. 2009)
<i>MTHFR</i>	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	607093	1p36.3	(Junemann et al. 2005)
<i>NCK2</i>	NCK adaptor protein 2	604930	2q12	(Akiyama et al. 2008)
<i>NOS3</i>	Nitric oxide synthase 3	163729	7q36	(Tunny et al. 1998)
<i>NTF4</i>	Neurotrophin 4	162662	19q13.3	(Pasutto et al. 2009)
<i>OCLM</i>	Oculomedin	604301	1q31.1	(Fujiwara et al. 2003)
<i>OLFM2</i>	noelin 2	ID: 93145	19p13.2	(Funayama et al. 2006)
<i>OPA1</i>	Optic atrophy 1	605290	3q28-q29	(Aung et al. 2002)
<i>PARL</i>	presenilin associated, rhomboid-like	607858	3q27	(Wolf et al. 2009)
<i>PON1</i>	Paraoxonase 1	168820	7q21.3	(Inagaki et al. 2006)
<i>TAP1</i>	Transporter, ATP-binding cassette, major histocompatibility complex, 1	170260	6p21.3	(Lin et al. 2004)
<i>TLR4</i>	Toll-like receptor 4	603030	9q32-q33	(Shibuya et al. 2008)
<i>TNF</i>	Tumor necrosis factor	191160	6p21.3	(Lin et al. 2003a)
<i>TP53</i>	Tumor protein p53	191170	17p13.1	(Lin et al. 2002)

Механизмы, по которым развивается болезнь при найденных мутациях, во многих случаях неясен. Однако есть несколько генов, для которых лучше, чем для остальных изучены причинно-следственные взаимосвязи при патогенезе глаукомы. Это гены миоцилина (MYOC), оптиневрина (OPTN), цитохрома P450 первого семейства подсемейства В полипептид 1 (CYP1B1), WD повторяющегося домена 36 (WDR36) и нейротрофина 4 (NTF4). О первых трех из них и пойдет речь в данной статье.

Ген MYOC (миоцилин)

1. Характеристика гена миоцилина

Ген миоцилина расположен на длинном плече 1-ой хромосомы (локус 1q24.3-q25.2), был впервые описан Stone в 1997 году, имеет размер 17217 пар нуклеотидов (обозначают обычно в тысячах пар нуклеотидов, называя их килобазами), то есть 17,22 кб, состоит из Промоторной (начальной) части, трех экзонов: N-концевой миозин-подобный домен, С-концевой ольфактомедин-подобный домен и средний домен - связка, а также двух длинных интронных областей. С гена миоцилина считывается полипептид длиной 504 аминокислоты. Подавляющее большинство мутаций в гене, вызывающих развитие глаукомы, находятся в третьем длинном ольфактомедин-подобном экзоне. В норме ген экспрессируется главным образом в сетчатке.



Рис. 1. Ген миоцилина, myocilin (MYOC)

2. Функция белка, синтезируемого с гена MYOC в норме и при мутациях

Миоцилин – гидрофобный белок, который был найден практически во всех тканях организма (цилиарное тело, сфинктер зрачка, сетчатка, скелетные мышцы, сердце и др.). В норме белок существует в виде гомодимера, взаимодействует с ольфактомедином (ноэлин-3), считываемым с гена OLFM3. В клетке располагается в области шероховатого эндоплазматического ретикулума в большом количестве в клетках фоторецепторов. Основное количество белка в норме обнаружено в области трабекулярного аппарата глаза, передней и увеальной его части.

При глаукоме белок миоцилин обнаруживают в значительно увеличенных количествах, причем во всех частях трабекулярного аппарата, не зависимо от степени выраженности клинических проявлений глаукомы.

Для миоцилина характерна посттрансляционная модификация, «созревание» белка после его синтеза путем присоединения остатков углеводов (гликозилирование) или пальмитиновой кислоты (пальмитилирование).

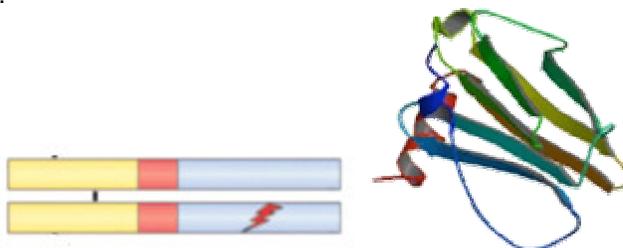
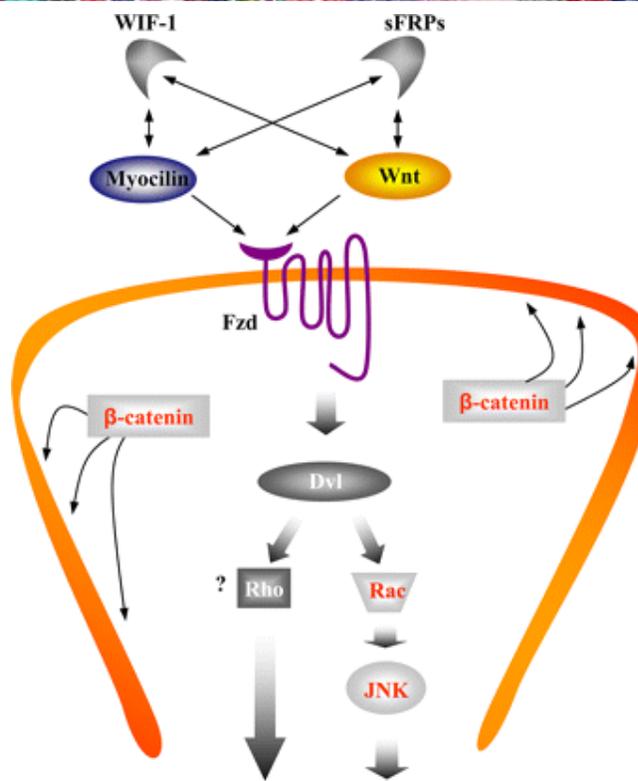


Рис. 2. Желтым показан миозин-подобный участок белка миоцилина «лейциновые молнии», голубым показан ольфактомедин-подобный участок миоцилина (один из них с красной полосой мутирован) и красный соединительный фрагмент между этими участками.



Регуляция цитоскелета и клеточная миграция

Рис. 3. Схематическая диаграмма роли миоцилина в клетке.

Миоцилин является модулятором Wnt сигнального пути (от рецепторов на поверхности клетки до экспрессии ДНК в ядре), который отвечает за межклеточные взаимодействия в эмбриогенезе и во взрослом организме. Миоцилин может связываться с Wnt антагонистами WIF-1 и sFRPs и конкурировать с Wnt за связывание с некоторыми Fzd рецепторами. Белки, на которые действует миоцилин, на рисунке 3 показаны красным. Тонкие непрерывные линии с двумя стрелками показывают белки, которые взаимодействуют друг с другом. Подробнее об этом в публикациях Kwop HS 2009, 2011. Таким образом, важно понимать, что миоцилин участвует

- в реорганизации актинового цитоскелета клетки
- в миграции клеток
- в межклеточных взаимодействиях.

На сегодняшний день в pubmed.com около 500 публикаций, описывающих свойства и функции миоцилина.

3. Какую роль играет миоцилин в развитии глаукомы

До сих пор ясного понимания роли миоцилина в патогенезе глаукомы нет. Предполагалось, что при мутациях, изменяющих заряд на поверхности белка или 3D-структуру белка, у миоцилина появляется тенденция к формированию конгломератов, состоящих из десятков и сотен молекул, которые, попадая в трабекулярную сеть, своим размером засоряют ее и затрудняют отток внутриглазной жидкости, однако гистологически данная гипотеза не была подтверждена. Поэтому сейчас преобладает теория, по которой мутантный миоцилин образует не гомодимеры, а гетеродимеры, например, с кальпаином II, что приводит к накоплению в эндоплазматическом ретикулуме и секреции в экстраклеточный матрикс мутантных гетероолигомеров с измененной функцией, которые, изменяют свойства клеток трабекулярного аппарата и как следствие отток ВГЖ. Показано, что к сходным процессам приводит появление мутантного миоцилина в почках, приводя к мезангиопролиферативному гломерулонефриту (Goldwisch A., 2005)

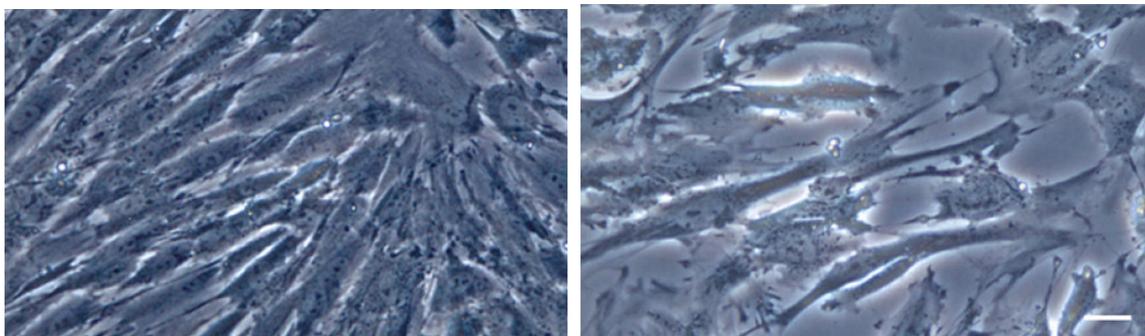


Рис. 4. Цитотоксичность мутированного миоцилина Pro370Leu.

На рис. 4 слева показаны клетки трабекулярного аппарата в норме. На рисунке справа показаны те же клетки после действия на них в течение 24 часов укороченного миоцилина при замене аминокислоты пролин на лейцин в 370-й позиции (Yuan He, 2009). Авторы статьи, таким образом, показывают наличие цитотоксичности мутированного миоцилина.

Наша задача – выяснить, есть ли полиморфизмы и делеции/дупликации в гене миоцилина у пациента, или нет. И если есть, что в этом случае делать? Для начала рассмотрим, какие мутации в гене миоцилина уже известны.

4. Описанные мутации в гене миоцилина

- частота мутаций
- особенности российской популяции
- серьезность последствий различных мутаций

Показано, что мутации в гене миоцилина приводят к развитию врожденной и ювенильной глаукомы и встречаются в 2 – 10% случаев у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой. Единичные исследования, проводимые в России (Астахов Ю.С., Васильев В.Б., Рахманов В.В., 2005, Бикбов М.М., Суркова В.К. и др. 2010), не дают достаточно материала для оценки особенностей в вариациях гена в Российской популяции. Необходимо создание референсной базы населения России для выявления патогенных и нейтральных полиморфизмов.

Основную долю описанных в мировой базе мутаций миоцилина составляют миссенс (83%) и нонсенс (6,4%) мутации. Малые (меньше 21 пары нуклеотидов) делеции, вставки и комбинация вставка/делеция составляют соответственно 4,3%, 5,3% и 1,1% (Рис. 5).

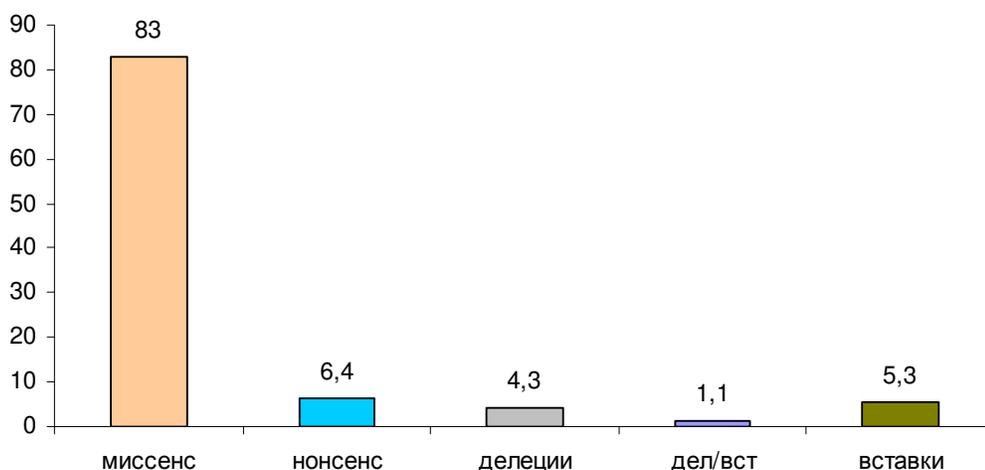


Рис. 5. Спектр мутаций, описанных в гене миоцилина (MYOC)

Несколько сотен полиморфизмов, описанных для миоцилина, собраны в базе данных: myocilin.com/variants.php. Так как данная статья посвящена поиску изменений в геноме,

приводящих к глаукоме, считаю уместным в качестве примера привести здесь полную таблицу мутаций миоцилина, ведущих к глаукоме (95 шт), нейтральных полиморфизмов (146) и замен с недоказанной патогенностью (18) (Табл. 2):

Таблица 2. Полиморфизмы, описанные в гене миоцилина

Положение	Замена аминокислоты	Нуклеотидная замена	Вызывает ли глаукому
Промотор	–	-2084g>t	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-1770g>a	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-1760ins_a	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-1422g>t	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-1378ins_t	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-1340del_a	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-1333g>a	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-1081a>g	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-1000c>g	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-700_-699ins	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-467gt>ca	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-387c>t	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-339gt11-19	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-320c>t	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-315g>a	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-306g>a	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-306g>t	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-255t>c	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-241g>a	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-224t>c	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-190g>t	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-159t>c	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-153t>c	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-127t>c	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-126t>g	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-126t>c	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-92_-91del_ct	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-83g>a	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-78t>g	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-77g>a	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-18c>t	Нейтральный полиморфизм
Промотор	–	-8c>t	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Phe4Ser	11T>C	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Cys8X	24C>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 1	Cys9Ser	26G>C	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Gly12Arg	34G>C	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Pro13Leu	38C>T	Патогенность не доказана
Экзон 1	Pro13Pro	39T>G	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Pro16Leu	47C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Ala17Ser	49G>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Val18Leu	52G>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Cys25SerfsX65	56_72dup	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 1	Gln19His	57G>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Cys25Arg	73T>C	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 1	Arg33Lys	98G>A	Патогенность не доказана

Положение	Замена аминокислоты	Нуклеотидная замена	Вызывает ли глаукому
Экзон 1	Arg46X	136C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Gln48His	144G>T	Патогенность не доказана
Экзон 1	Val53Ala	158T>C	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 1	Ser55Thr	164G>C	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Asn57Asp	169A>G	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Ser69Ser	Не определено	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Val70Val	210C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Asn73Ser	218A>G	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Arg76Lys	227G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Asp77Glu	Не определено	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Arg82Cys	244C>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 1	Arg82His	245G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Thr88Thr	Не определено	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Arg91X	271C>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 1	Leu95Pro	284T>C	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Glu96Glu	288G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Gln101Gln	303A>G	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Thr103Thr	309C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Ala108Gly	323C>G	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Gln118Leu	353A>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Gly122Gly	366C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Gly122Gly	366C>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Thr123Thr	369C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Leu124Leu	372G>C	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Arg125SerfsX158	375delG	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 1	Arg126Trp	376C>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 1	Arg126Gln	377G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Arg128Arg	384G>C	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Gln134Gln	402A>G	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Thr135Ile	404C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Thr140Ser	419C>G	Патогенность не доказана
Экзон 1	Ala141Ala	425C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Arg158Gln	473G>A	Патогенность не доказана
Экзон 1	Leu159Leu	477A>G	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Gln161Arg	482A>G	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Glu162dup	484_486dup	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 1	Leu166Leu	498G>C	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Arg168Arg	504G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Leu180Leu	Не определено	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Gly183Ser	547G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 1	Arg189Gln	566G>A	Нейтральный полиморфизм
Интрон 1	–	604+13a>c	Нейтральный полиморфизм
Интрон 1	–	604+14g>a	Нейтральный полиморфизм
Интрон 1	–	604+16g>t	Нейтральный полиморфизм
Интрон 1	–	604+19g>c	Нейтральный полиморфизм
Интрон 1	–	604+50g>a	Нейтральный полиморфизм
Интрон 1	–	604+228a>t	Нейтральный полиморфизм
Экзон 2	Ser203Phe	608C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 2	Thr204Met	611C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 2	Thr204Thr	612G>T	Нейтральный полиморфизм

Положение	Замена аминокислоты	Нуклеотидная замена	Вызывает ли глаукому
Экзон 2	Asp208Glu	624C>G	Нейтральный полиморфизм
Экзон 2	Thr209Asn	626C>A	Патогенность не доказана
Экзон 2	Leu215Pro	644T>C	Нейтральный полиморфизм
Экзон 2	Leu215Gln	644T>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 2	Lys216Lys	648G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 2	Glu218Glu	654G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 2	Arg226Gln	677G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 2	Leu228Ser	683T>C	Патогенность не доказана
Экзон 2	Glu230Lys	688G>A	Патогенность не доказана
Экзон 2	Glu240Gly	719A>G	Патогенность не доказана
Экзон 2	Thr243Thr	Не определено	Нейтральный полиморфизм
Интрон 2	–	730+3a>g	Нейтральный полиморфизм
Интрон 2	–	730+35g>a	Нейтральный полиморфизм
Интрон 2	–	730+172c>a	Нейтральный полиморфизм
Интрон 2	–	731-73c>t	Нейтральный полиморфизм
Интрон 2	–	731-23g>a	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Gly244Ser	730G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Gly244Val	731G>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Cys245Tyr	734G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Gly246Arg	736G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Asp247X	739G>T	Патогенность не доказана
Экзон 3	Val251Ala	752T>C	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Gly252Arg	754G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Thr256Met	767C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Ala260Ala	780A>G	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Glu261Lys	781G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Lys266Lys	798G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Arg272X	814C>T	Патогенность не доказана
Экзон 3	Arg272Gly	814C>G	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Arg272Arg	816A>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Asp273AspfsX344	819delC	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Pro274Arg	821C>G	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Thr285Met	854C>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Thr285Thr	855G>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Trp286Arg	856T>C	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Ile288Ile	864C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Ile288Met	864C>G	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Thr290Ala	868A>G	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Thr293Lys	878C>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Thr293Thr	879G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Arg296Cys	886C>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Gln297His	893G>C	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Glu300Lys	898G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Asp302Asp	906G>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Ile304Ile	Не определено	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Gln309Gln	927G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Ser313Phe	938C>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Leu318Leu	952C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Glu323Lys	967G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Thr325Thr	975G>A	Нейтральный полиморфизм

Положение	Замена аминокислоты	Нуклеотидная замена	Вызывает ли глаукому
Экзон 3	Gly326Ser	976G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Val329Met	985G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Val329Val	Не определено	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Ser331Thr	991T>A	Патогенность не доказана
Экзон 3	Ser331Ser	Не определено	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Ser331Leu	992C>T	Патогенность не доказана
Экзон 3	Ser333Cys	997A>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Leu334Pro	1001T>C	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Phe336Phe	1008C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Gln337X	1009Cdel	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Gln337Glu	1009C>G	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Gln337Arg	1010A>G	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Asp338Asn	1014G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Ser341Pro	1021T>C	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Arg342Lys	1025G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Ile345Met	1035A>G	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Arg346Thr	1037G>C	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Tyr347Tyr	1041T>C	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Tyr347X	1041T>G	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Thr351Thr	1053C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Glu352Lys	1054G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Thr353Ile	1058C>T	Патогенность не доказана
Экзон 3	Ile360Asn	1079T>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Pro361Ser	1081C>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Gly362GluFsX45	1085delG	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Ala363Thr	1087G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Gly364Val	1091G>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Gly367Arg	1099G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Gln368SerFsX38	1100_1103delGAC AinsT	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Gln368X	1102C>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Phe369Leu	1105T>C	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Pro370Leu	1109C>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Pro370Pro	1110G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Tyr371Asp	1111T>G	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Gly374Val	1121G>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Thr377Met	1130C>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Thr377Lys	1130C>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Thr377Thr	Не определено	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Asp380Gly	1138G>C	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Asp380His	1138G>C	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Asp380Asn	1138G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Asp380Ala	1139A>C	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Asp384Asn	1150G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Asp384Gly	1151A>G	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Ser393Asn	1178G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Ser393Arg	1179C>G	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Thr394Thr	1182C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Asp395Glu	1185T>G	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Glu396dup	1186_1188dup	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Asp395_Glu396insAspPro	1187_1188insCCCAGA	Мутация, приводящая к глаукоме

Положение	Замена аминокислоты	Нуклеотидная замена	Вызывает ли глаукому
Экзон 3	Glu396Glu	1188G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Lys398Arg	1193A>G	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Gly399Val	1196G>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Gly399Asp	1196G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Val402Ile	1204G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Leu403Leu	1209C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Leu413Leu	1239C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Glu414Lys	1240G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Arg422Cys	1264C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Arg422His	1265G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Lys423Glu	1267A>G	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Ser425Pro	1273T>C	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Ser425X	1274C>G	Патогенность не доказана
Экзон 3	Val426Phe	1276G>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Val426Val	1278C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Ala427Thr	1279G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Asn428Ser	1283A>G	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Phe430Leu	1288T>C	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Cys433Arg	1297T>C	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Gly434Ser	1300G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Gly434Gly	1303C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Tyr437His	1309T>C	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Thr438Ile	1313C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Thr438Thr	Не определено	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Val439Val	1317C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Val439Val	1317C>G	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Ala445Val	1334C>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Asp446Tyr	1336G>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Ala447Val	1340C>T	Патогенность не доказана
Экзон 3	Thr448Pro	1342A>C	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Asn450Asp	1348A>G	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Arg450Tyr	1348A>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Tyr453MetfsX11	1357delT	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Thr455Lys	1364C>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Gly458Asp	1373G>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Ile465Met	1395C>G	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Arg470Cys	1408C>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Arg470His	1409G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Tyr471Cys	1412A>G	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Tyr473Cys	1418A>G	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Met476Arg	1427T>G	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Ile477Asn	1430T>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Ile477Ser	1430T>G	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Tyr479His	1435T>C	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Asn480Lys	1440C>G	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Asn480Lys	1440C>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Pro481Thr	1441C>A	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Pro481Ser	1441C>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Pro481Arg	1442C>G	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Pro481Leu	1442C>T	Мутация, приводящая к глаукоме

Положение	Замена аминокислоты	Нуклеотидная замена	Вызывает ли глаукому
Экзон 3	Glu483X	1447G>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Ala488Ala	1464C>T	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Val495Ile	1483G>A	Нейтральный полиморфизм
Экзон 3	Ile499Phe	1495A>T	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Ile499Ser	1496T>G	Мутация, приводящая к глаукоме
Экзон 3	Lys500Arg	1499A>G	Патогенность не доказана
Экзон 3	Ser502Pro	1504T>C	Мутация, приводящая к глаукоме
	–	*4g>c	Нейтральный полиморфизм
	–	*20a>g	Нейтральный полиморфизм
	–	*73g>c	Нейтральный полиморфизм
	–	*291a>g	Нейтральный полиморфизм
	1544ins489X	1544insC	Мутация, приводящая к глаукоме
	1q24.3_1q31.2del	–	Патогенность не доказана
	1q23_1q25del	–	Нейтральный полиморфизм

Мутациями в гене миоцилина, приводящими к самой тяжелой клинической картине, являются те, которые приводят к обрыву цепи (всего их описано четыре: rs139804296, rs74315329, rs143413116, rs74315337 в положениях 171605329, 171605478, 171621481 и 171621616 соответственно), а также 46 миссенс вариантов – ведущих к изменению структуры считываемого белка (список их можно легко найти в базе данных ensembl.org, подробнее на странице www.oftalmic.ru/pubmed-gene-manual.php)

5. Подходы к лечению генетических аномалий в гене MYOC

Мы добрались до самого интересного и самого главного. Как, используя новый инструмент, генетическую диагностику, подходить к индивидуальному, эффективному, направленному на устранение причины глаукомы лечению наших пациентов?

В последние годы в англоязычной литературе появился целый шквал публикаций о новых попытках и подходах к молекулярно-генетическим способам лечения болезней, часто совмещая достижения в технологии, молекулярной биологии и генетике. Что касается конкретного вопроса лечения миоцилиновой глаукомы (с позволения, назовем ее так), то действенных методов пока не так много. Проводятся единичные клинические испытания в США, оценивающие эффективность блокировки гена миоцилина короткоцепочечными РНК.

Разберем общую суть предлагаемого лечения, хотя, конечно же, в данной публикации множество деталей будет упущено из виду, однако они будут рассмотрены в дальнейших публикациях. Мне очень импонирует изящность предлагаемого способа лечения.

В виде глазных капель (!) подбирают короткоцепочечные фрагменты РНК, (в англоязычной литературе short interfering – siRNA), последовательность их известна, представлена ниже на табл. 3. Должным образом упакованные (в липосомы или полиамидаминовые дендримеры – наночастицы для целевой доставки действующего вещества к нужным клеткам) их закапывают в глаза (Xin GH, 2012).

Таблица 3. короткоцепочечные РНК, применяемые для генетического лечения миоцилиновой глаукомы

Контроль	5'-aacagtcgcttgcgactgg-3'
siMYOC-A	5'-aacttacagagagacagcagc-3'
siMYOC-B	5'-aataccgagacagtgaaggct-3'
siMYOC-C	5'-aacatccgtaagcagtcagtc-3'
siMYOC-D	5'-aaccctggagaagaagctc-3'

В клетках трабекулярного аппарата и сетчатки эти siРНК комплементарно связываются с участками гена миоцилина (так как они специальным образом подобраны именно под этот ген), не

давая производить мРНК и останавливая синтез мутированного гена миоцилина. Данный способ описан в американском патенте US7700575.

Далее возможны варианты. Либо на этом останавливаются, так как терапевтический эффект достигнут – при таком подходе блокируется синтез не всего, но значительной части измененного миоцилина, так что при гаплонедеятельности (когда поврежден только один аллель миоцилина, второй функционирует нормально) этот метод эффективен, прогрессирование глаукомы практически останавливается. Либо вторым этапом можно внедрять вектор со здоровым геном миоцилина, данный подход будет иметь смысл при гомозиготном состоянии, когда оба аллеля миоцилина повреждены. Данный вопрос – тема дальнейших публикаций, а пока, согласитесь, изящный метод?

По аналогичной схеме, только более кратко, будут рассмотрены мутации в гене CYP1B1 и OPTN.

Ген CYP1B1 (цитохром P450)

1. Характеристика гена

Ген цитохрома расположен на коротком плече 2-й хромосомы в локусе 2p22.2, длиной 8,58 кб, имеет 3 экзона (рис. 6), впервые был описан в начале 1990-х в группе профессора Burke, секвенирован и опубликован под данным названием в 2001 году группой исследователей проекта «Геном человека» (Lander ES, 2001). Кодировать 1 из 57 мембран-связанных ферментов гемтиолатных (обычно от цистеинового остатка) монооксигеназ семейства цитохромов P450 подсемейства В полипептид 1, участвующих во многих каталитических реакциях, в том числе в синтезе холестерина, стероидов и других липидов, витамина D, а также в метаболизме лекарств.



Рис. 6. Три экзона гена цитохрома CYP1B1

2. Функция белка, синтезируемого с гена CYP1B1 в норме и при мутациях

Фермент, кодируемый этим геном, располагается в эндоплазматическом ретикулуме и метаболизирует проонкогены, такие как полициклические ароматические углеводороды и 17-бета эстрадиол. В микросомах печени этот фермент вовлечен в НАДФН-зависимый путь переноса электрона.

3. Какую роль играет ген CYP1B1 в развитии глаукомы

Предполагается, что этот фермент метаболизирует также сигнальную молекулу, вовлеченную в развитие глаза, возможно, стероид, поэтому мутации в гене цитохрома приводят к различным аномалиям строения глаза, в том числе приводящим к глаукоме. То есть данный фермент разлагает молекулу, которая принимает активное участие в правильном формировании угла передней камеры глаза и его фильтрующих структур. Существуют карты метаболизма CYP1B1 эстрадиола, ретинола и бензпирена (например, от компании GeneGo).

4. Описанные мутации в гене CYP1B1

- частота мутаций
- особенности российской популяции
- серьезность последствий различных мутаций

Показано, что от 20 до 50% пациентов с ПОУГ имеют мутации в гене цитохрома P450 (Mookherjee S, 2012). Всего описано 4499 вариаций в экзонах и интронах гена CYP1B1, в том числе 16 – обрыв цепи, 36 – сдвиг рамки считывания, 6 вставок в пределах рамки и 134 миссенс варианта (ensemble.org). Референсной базы вариаций гена на Российской популяции пока не создано. Общемировая база вариаций гена доступна в GenBank и ensembl.org. В табл. 4 приведены основные аномалии, к которым приводят мутации в гене CYP1B1 и ссылки на статьи.

Таблица 4. Список аномалий, к которым приводят мутации в гене CYP1B1

Заболевание	Код статьи в базе PubMed
Врожденная глаукома	9097971 (4), 18852424 (4), 15475877 (3), 19536304 (3)
Аномалия Петерса	16735991 (3), 15682044 (3), 20151268 (1), 16638984 (1)
Рак молочной железы	20093341 (6), 15734954 (6), 9823305 (5), 20037207 (5)
Глаукома	11774072 (4), 19622003 (3), 15342693 (2), 19668563 (2)
Синдром Ригера	16735994 (2), 17106362 (1)
ПОУГ	16862072 (1), 19096718 (1), 20198978 (1), 17361544 (1)
Открытоугольная глаукома	16319821 (2), 19793111 (2), 17563717 (2), 15342693 (1)
Опухоль эндометрия	14656940 (6), 12873984 (6), 15285606 (3), 20492382 (3)
Химический онкогенез	12520071 (1)

5. Подходы к лечению генетических аномалий в гене CYP1B1

Подходы к лечению генетических аномалий в гене CYP1B1 немногочисленны. Предлагается перенос определенным образом запрограммированных стволовых клеток с «диким типом» гена CYP1B1 у пациентов с мутациями с гене CYP1B1 (Choudhary D 2009).

Ген OPTN (оптиневрин)

1. Характеристика гена

Ген оптиневрин OPTN расположен на коротком плече 10-й хромосомы в локусе 10p13, длиной 38,2 кб и имеет 16 экзонов (рис. 7). С данного гена синтезируется спирализованная спираль, белок оптиневрин, который играет важную роль в поддержке комплекса Гольджи, экзоцитозе, перемещении мембран посредством взаимодействия с миозином VI, Rab8 и хангтингином. Оптиневрин экспрессируется в трабекулярном аппарате, цилиарном теле, сетчатке, мозге, коре надпочечников, в лимфоцитах, фибробластах, скелетных мышцах, сердце, печени, в плаценте и у плода (uniprot.org).



Рис. 7. Ген оптиневрин OPTN и его 16 экзонов

С гена оптиневрина считываются 12 различных белков (варианты сплайсинга). При мутациях в гене оптиневрина описаны следующие глазные состояния: первичная открытоугольная глаукома, атрофия зрительных нервов, слепота, офтальмогипертензия, глаукома нормального давления, а также мутации в гене оптиневрина приводят к боковому амиотрофическому склерозу.

2. Функция белка, синтезируемого с гена OPTN в норме и при мутациях

Оптиневрин подавляет индукцию интерферона бета в ответ на инфекцию РНК вирусом. Играет нейротрофическую роль в глазу и зрительном нерве. Возможно, является частью сигнального пути, который сдвигает равновесие в сторону индукции клеточной смерти. Может являться клеточной мишенью для аденовируса E3 14.7, ингибитора функции TNF-альфа, влияя, таким образом, на клеточную смерть. Взаимодействует с фактором транскрипции IIIA (GTF3A). Взаимодействует с TRAF3, TBK1 и MYO6. Связывается с убиквитином. Следует обратить внимание, что в клетке оптиневрин располагается в основном вокруг ядра и связан с комплексом Гольджи, а также в везикулах рядом с клеточной мембраной.

3. Какую роль играет оптиневрин в развитии глаукомы

При нарушении функции белка оптиневрина из-за мутации в нем координация внутриклеточных структур, связанных с комплексом Гольджи и транспорт в клетке изменяются, что приводит к замедлению метаболизма и гибели нервных клеток зрительной системы, давая картину

глаукоматозного изменения зрительного нерва в отсутствии повышенного внутриглазного давления.

4. Описанные мутации

- частота мутаций
- особенности российской популяции
- серьезность последствий различных мутаций

Наиболее четкая взаимосвязь между мутацией и развитием нормотензивной глаукомы прослеживается в случае замены глутамина на лизин в 50-м положении (Glu50Lys) rs28939688 из-за замены гуанина на аденин в 458 позиции (458G>A) (Tin Aung, 2005). Также довольно стабильно при мутациях, приводящих к заменам His26Asp, Glu104Asp, Thr202Arg, Ala336Gly, Ala377Thr, His486Arg, Arg545Gln, и с.691-692insAG развивается глаукома (Baird PN, 2004).

Что касается остальных полиморфизмов в гене миоцилина, то их достаточно много, они разнообразны и четкой взаимосвязи между мутацией и развитием глаукомной оптической нейропатии выявить пока не удается.

В нашей лаборатории мы проводим анализ на наличие замены глутамина на лизин в 50-м положении (Glu50Lys) rs28939688 путем секвенирования данного участка ДНК.

5. Подходы к лечению генетических аномалий в гене OPTN

Публикаций, подробно рассматривающих подходы к замене мутированного гена CYP1B1 на нормальный или блокировку гена с патологической функцией, пока нет. Однако, на мой взгляд, общие принципы генной терапии в данном случае такие же, как и при коррекции функции других генов. Уже открывается новая эра, новая волна исследований и публикаций об особенностях и последствиях вмешательства в экспрессию генов, приводящих к развитию глаукомы. Дойдет очередь и до оптиневрина, а пока следует лучше разобраться с его функциями, полиморфизмами и клиническими признаками генетических вариаций.

В табл. 5 рассмотрены параметры генов, описанных в статье.

Таблица 5. Длина рассмотренных в статье генов и количество экзонов в них

	Размер гена, кб	Количество экзонов	Длина экзонов (с какого по какой нуклеотид)
MYOC	17,22	3	1..626,13912..14037,15925..17217
CYP1B1	8,58	3	1..401,792..1835,4871..8578
OPTN	38,20	16	1..221,8057..8208,8881..8934,9016..9207,10193..10395,12372..12554,16186..16259,18807..18959,22304..22406,23914..24029,25337..25486,25865..25958,27664..27822,31986..32116,33421..33500,36664..38195

Диагнозы, при которых показан поиск мутаций в генах MYOC, CYP1B1 и OPTN.

MYOC – MIM 601652 ПОУГ ювенильная

CYP1B1 – MIM 601771 ПОУГ ювенильная

OPTN – MIM137760 нормотензивная глаукома, атрофия зрительных нервов

Зачем делать генетический анализ на наличие мутаций в генах?

Во-первых, чтобы лечить заболевание наиболее эффективно, нужно его сначала диагностировать, как наставлял Козьма Прутков «зри в корень». Во-вторых, здесь мне хочется привести аналогию с сотовыми телефонами. Согласитесь, удобная вещь, особенно смартфон. Ведь каких-то 20 лет назад люди говорили: «Зачем нам такие дорогие телефонные аппараты, ну и что, если они без провода?» Чем больше пользователей становится у технологии, тем быстрее она развивается. Поэтому каждый проведенный генетический анализ вносит свой вклад в копилку знаний человечества о себе и приближает день, когда мы научимся справляться с глаукомой. Именно поэтому у нас такая гибкая ценовая политика проведения тестов.

Какой биоматериал необходим для проведения анализа?

Любой, содержащий ДНК исследуемого человека: кровь (венозная или капиллярная), буккальный эпителий, биопсийный материал или уже непосредственная выделенная ДНК. Наиболее предпочтительным для нас материалом является венозная кровь 2,0 мл + 0,5М ЭДТА.

Как проводится генетическая диагностика:

1. Максимально точно диагностируем болезнь по клиническим проявлениям.
2. Собираем семейный анамнез встречаемости этой болезни и по возможности проводим данный тест у всех членов семьи с патологией.
3. Для более полных и точных результатов генетической диагностики нужно учитывать то обстоятельство, что разные мутации могут приводить к похожим симптомам и при схожем наборе мутаций могут быть разные клинические проявления. Поэтому важно назначать **правильный набор тестов**, исходя из имеющихся на текущий момент знаний о мутациях, приводящих к болезни и вероятности проявления болезни.
4. Проводим забор биоматериала и выделение ДНК
5. Секвенируем (узнаем последовательность гена) по методу Сенгера кодирующие участки генов-мишеней
6. Сравниваем с референсным геном/генами, отмечаем изменения в гене и степень их влияния на течение болезни
7. Выдаем заключение с комментариями, интерпретацией результатов, заключением и рекомендациями.

Заключение:

1. Связь мутаций в генах миоцилина (MYOC), цитохрома P450 (CYP1B1) и оптиневрина (OPTN) с развитием глаукомы доказана.
2. Разнообразие и особенности мутаций в генах MYOC, CYP1B1 и OPTN в Российской популяции пока не описаны. Есть все основания полагать, что набор мутаций отличается от такового с США, Японии или Скандинавии, что делает актуальной разработку подходящих для России тест-систем.
3. Разрабатываются эффективные, нацеленные на устранение причин развития глаукомы методы лечения при мутациях в генах MYOC, CYP1B1 и OPTN. Первые клинические испытания дают обнадеживающие результаты.

Список использованных ресурсов:

1. <https://sph.uth.edu/Retnet/sum-dis.htm>
2. www.ensembl.org
3. www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank
4. www.myocilin.com
5. www.uniprot.org
6. USA patent #US7700575
7. Астахов Ю.С., Васильев В.Б., Рахманов В.В. Мутации и полиморфизмы генов миоцилина и оптиневрина: значение для ранней диагностики первичной открытоугольной глаукомы // Клиническая офтальмология. 2005. Т 6. № 2. С. 48–51.
8. Бикбов М.М., Суркова В.К., Калентьева А.З., Хуснутдинова Э.К., Джемилева Л.У. Молекулярно-генетический анализ и его значение в диагностике первичной открытоугольной глаукомы. // Российский офтальмологический журнал, 2010, №1
9. Aroca-Aguilar J., Sánchez-Sánchez F., Martínez-Redondo F., Coca-Prados M., Escribano J., Heterozygous expression of myocilin glaucoma mutants increases secretion of the mutant forms and reduces extracellular processed myocilin Molecular Vision 2008; 14:2097-2108
10. Baird PN, Richardson AJ, Craig JE, Mackey DA, Rochtchina E, Mitchell P. Analysis of optineurin (OPTN) gene mutations in subjects with and without glaucoma: the Blue Mountains Eye Study. Clin Experiment Ophthalmol. 2004 Oct;32(5):518-22.
11. Choudhary D, Jansson I, Schenkman JB. CYP1B1, a developmental gene with a potential role in glaucoma therapy. Xenobiotica. 2009 Aug;39(8):606-15. PMID: 19622003
12. Colak D, Morales J, Bosley TM, Al-Bakheet A, Alyounes B, Kaya N, Abu-Amero KK. Genome-wide expression profiling of patients with primary open angle glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Aug 27;53(9):5899-904. Print 2012. PMID: 22871836

13. Gibson J, Griffiths H, De Salvo G, Cole M, Jacob A, Macleod A, Yang Y, Menon G, Cree A, Ennis S, Lotery A. Genome-wide association study of primary open angle glaucoma risk and quantitative traits. *Mol Vis.* 2012;18:1083-92. PMID: 22605921
14. Goldwich A, Baulmann DC, Ohlmann A, Flügel-Koch C, Schöcklmann H, Tamm ER. Myocilin is expressed in the glomerulus of the kidney and induced in mesangioproliferative glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2005 Jan;67(1):140-51.
15. Fuse N. Genetic bases for glaucoma. *Tohoku J Exp Med.* 2010;221(1):1-10.
16. Kumar A., Basavaraj MG, Gupta SK, et al. Role of CYP1B1, MYOC, OPTN and OPTC genes in adult-onset primary open-angle glaucoma: predominance of CYP1B1 mutations in Indian patients *Mol Vis.* 2007; 13: 667–676. PMCID: PMC2765475
17. Kwon HS, Lee HS, Ji Y, Rubin JS, Tomarev SI. Myocilin is a modulator of Wnt signaling. *Mol Cell Biol.* 2009 Apr;29(8):2139-54.
18. Kwon HS, Tomarev SI. Myocilin, a glaucoma-associated protein, promotes cell migration through activation of integrin-focal adhesion kinase-serine/threonine kinase signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2011 Dec;226(12):3392-402.
19. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001 Feb 15;409(6822):860-921.
20. Mookherjee S, Acharya M, Banerjee D, Bhattacharjee A, Ray K. Molecular Basis for Involvement of CYP1B1 in MYOC Upregulation and Its Potential Implication in Glaucoma Pathogenesis. *PLoS One.* 2012;7(9):e45077
21. Rozsa FW, Reed DM, Scott KM, Gene expression profile of human trabecular meshwork cells in response to long-term dexamethasone exposure. *Mol Vis.* 2006 Feb 27;12:125-41. PMID: 16541013
22. Xin GH, Zhao XH, Liu D, Gong Q, Hou L, Li JY, Pan BR, Li X, Cheng YJ. Effect of VEGF-targeted antisense gene therapy on retinoblastoma cell line SO-RB50 in vitro and in vivo. *Int J Ophthalmol.* 2012;5(4):440-7.
23. Yuan He, Kar Wah Leung, Ye-Hong Zhuo, Jian Ge Pro370Leu mutant myocilin impairs mitochondrial functions in human trabecular meshwork cells *Molecular Vision* 2009; **15**:815-825.